



BIO **tecnologia**

Fundamentos

FATEC - FACULDADE DE TEOLOGIA E CIÊNCIAS

BIOTECNOLOGIA: FUNDAMENTOS

SUMÁRIO

<p>CAPÍTULO 1. O QUE É BIOTECNOLOGIA? A BIOTECNOLOGIA TRADICIONAL A BIOTECNOLOGIA MODERNA AS DEFINIÇÕES DE BIOTECNOLOGIA O IMPACTO DA BIOTECNOLOGIA BIOTECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO CRONOLOGIA DE ALGUNS ACONTECIMENTOS MARCANTES NA HISTÓRIA DA BIOTECNOLOGIA</p>	Pág. 1
<p>CAPÍTULO 2. AS CÉLULAS E OS CROMOSSOMOS A CÉLULA COMO UNIDADE DOS SERES VIVOS Unidade estrutural Unidade funcional Relação entre as estruturas celulares e sua função Técnicas laboratoriais Toda célula deriva de outra preexistente OS CROMOSSOMOS A TEORIA CROMOSSÔMICA DA HEREDITARIEDADE AS CÉLULAS E OS CROMOSSOMOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS</p>	Pág. 9
<p>CAPÍTULO 3. OS MICRORGANISMOS A DIVERSIDADE MICROBIANA As eubactérias As arqueas Os protistas Os fungos Os vírus, na fronteira do vivo e do não vivo AS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS BIOSSEGURANÇA E BIOSSEGURIDADE OS MICRORGANISMOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS</p>	Pág. 21
<p>CAPÍTULO 4. AS ENZIMAS E OS ANTICORPOS AS PROTEÍNAS Estrutura As bases de algumas técnicas laboratoriais (Cromatografia, eletroforese, espectrometria de massa) AS ENZIMAS A catálise enzimática Os diversos tipos de enzimas Importância econômica OS ANTICORPOS A molécula de anticorpo A produção de anticorpos no organismo A produção de anticorpos no laboratório A utilização dos anticorpos</p>	Pág. 31
<p>CAPÍTULO 5. OS ÁCIDOS NUCLEICOS E OS GENES OS ÁCIDOS NUCLEICOS A DUPLA HÉLICE O CÓDIGO GENÉTICO A AÇÃO GÊNICA A REGULAÇÃO DA AÇÃO GÊNICA Células procarióticas Células eucarióticas A GENÔMICA O genoma humano A genômica brasileira</p>	Pág. 43

<p>CAPÍTULO 6: OS PROCESSOS FERMENTATIVOS OS PROCESSOS FERMENTATIVOS E A INDÚSTRIA OS MICRORGANISMOS INDUSTRIAIS Noções sobre o metabolismo As linhagens industriais A ESCOLHA DA MATÉRIA-PRIMA OS PROCESSOS TRADICIONAIS OS PROCESSOS SUBMERSOS Os fermentadores ou biorreatores A mudança de escala A condução do processo A recuperação do produto OS BIOPROCESSOS NA INDÚSTRIA DE BIOFERTILIZANTES</p>	<p>Pág. 53</p>
<p>CAPÍTULO 7: A CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS A MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS As etapas Os meios de cultura As diferentes modalidades Melhoramento e conservação da biodiversidade vegetal A difusão da tecnologia A CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS A manipulação <i>in vitro</i> das células animais As aplicações da cultura <i>in vitro</i> de células de mamíferos</p>	<p>Pág. 63</p>
<p>CAPÍTULO 8: A TECNOLOGIA DO DNA AS FERRAMENTAS DISPONÍVEIS AS NUCLEASES OU ENZIMAS DE RESTRIÇÃO A ELETROFORESE DO DNA Hibridização e sondas gênicas A técnica de Southern O fingerprint A SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DE DNA Síntese de oligonucleotídeos Síntese de cDNA A reação em cadeia da polimerase O SEQUENCIAMENTO DO DNA OS ARRAYS</p>	<p>Pág. 73</p>
<p>CAPÍTULO 9: A ENGENHARIA GENÉTICA O NASCIMENTO DA BIOTECNOLOGIA MODERNA As primeiras experiências Mitos e realidades As bibliotecas de genes A CONSTRUÇÃO DE UM MICRORGANISMO RECOMBINANTE Encontrar o gene Inserir o gene Identificar os microrganismos recombinantes A CONSTRUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS O transgene A transferência dos genes a células vegetais O problema dos marcadores seletivos Do laboratório ao campo CÉLULAS E ANIMAIS TRANSGÊNICOS O supermouse Os animais como modelos para a experimentação Os animais como biofábricas O TAMBO FARMACÊUTICO ARGENTINO</p>	<p>Pág. 83</p>
<p>BIBLIOGRAFIA</p>	<p>Pág. 99</p>

CAPÍTULO 1. O QUE É BIOTECNOLOGIA?

A BIOTECNOLOGIA TRADICIONAL

Cultivar vegetais, domesticar animais, transformar os alimentos ou aproveitar as propriedades curativas de algumas plantas são atividades que remontam à alvorada da humanidade e se desenvolveram com base no conhecimento empírico, ignorando a existência dos microrganismos ou das leis da hereditariedade.

No início do século XIX, a demanda de mão de obra por uma indústria incipiente estimula a migração da população do campo para a cidade. Em condições sanitárias cada vez mais degradadas, as doenças e a fome acompanham o homem. Ao mesmo tempo, o progresso exige processos industriais mais eficientes. A compreensão dos fenômenos naturais torna-se indispensável para responder às necessidades da sociedade.

A partir de 1850 surgem novas áreas do conhecimento; nascem a Microbiologia, a Imunologia, a Bioquímica e a Genética. A Química Industrial se desenvolve aceleradamente e, também, aumenta a intervenção da Engenharia Agrícola e da Pecuária no gerenciamento do campo.

Em 1914, Karl Ereky, um engenheiro agrícola húngaro, desenvolve um gigantesco plano de criação de suínos visando substituir as práticas tradicionais por uma indústria agrícola capitalista baseada no conhecimento científico. Deve-se a Ereky (1919) a primeira definição de biotecnologia, como "a ciência e os métodos que permitem a obtenção de produtos a partir de matéria-prima, mediante a intervenção de organismos vivos". Para ele, a era bioquímica substituiria a era da pedra e do ferro.

O século XX assiste a um desenvolvimento extraordinário da ciência e da tecnologia (eletrônica, informática). Da convergência entre ambas resultam logros extraordinários em vários setores produtivos, onde os seres vivos constituem a base de itens tão diversos como a produção de variedades vegetais mais produtivas, a fabricação de novos alimentos, o tratamento do lixo, a produção de enzimas e os antibióticos.

A BIOTECNOLOGIA MODERNA

A proposta de Watson e Crick (1953) de um modelo helicoidal para a molécula de DNA representa, sem dúvida, um marco fundamental na história da Biologia Molecular. Mas a divisória entre a Biotecnologia clássica e a Biotecnologia moderna é uma série de experiências realizadas por H. Boyer e S. Cohen que culmina em 1973 com a transferência de um gene de sapo a uma bactéria. A partir desse momento é possível mudar o programa genético de um organismo transferindo-lhe genes de outra espécie.

A importância e os riscos inerentes à nova tecnologia não passaram despercebidos para as pessoas envolvidas. Fato inédito na história, em 1975 os cientistas reunidos em Asilomar (USA) estabeleceram uma moratória em seus trabalhos até serem definidas as condições de segurança adequadas, o que aconteceu pouco tempo mais tarde.

Na passagem de uma biotecnologia de laboratório a uma biotecnologia industrial, a Engenharia Genética ocupa um lugar de destaque como tecnologia inovadora. Em alguns casos, como os da insulina e do hormônio do crescimento, a inovação consiste em substituir os métodos de obtenção tradicionais. Em outros casos, como o dos anticorpos monoclonais ou do *Golden Rice*, um arroz com vitamina A, trata-se de produtos inteiramente novos.

Entretanto, a manipulação gênica não é a única ferramenta disponível. A Biotecnologia abrange hoje uma área ampla do conhecimento que decorre da ciência básica (biologia molecular, microbiologia, biologia celular, genética etc.), da ciência aplicada (técnicas imunológicas e bioquímicas, assim como técnicas decorrentes da física e da eletrônica), e de outras tecnologias (fermentações, separações, purificações, informática, robótica e controle de processos). Trata-se de uma rede complexa de conhecimentos onde ciência e tecnologia se entrelaçam e complementam.

AS DEFINIÇÕES DE BIOTECNOLOGIA

O impacto causado pelas primeiras experiências de Engenharia Genética estimulou numerosas tentativas de redefinição do campo da Biotecnologia. Mediante a substituição da expressão "intervenção de organismos vivos" por "utilização de processos celulares e moleculares" tratou-se de diferenciar a Biotecnologia clássica da moderna. Porém, devido à enorme difusão das técnicas de manipulação gênica, elas acabam se superpondo, e, fora do contexto histórico, é difícil distinguir o limite entre ambas.

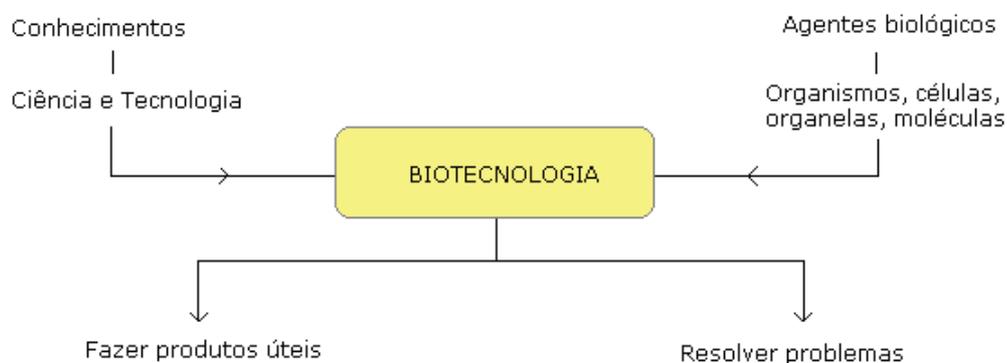
Por outro lado, como a definição de um setor de atividades depende dos interesses dos grupos envolvidos, muitas vezes reflete a visão dos setores profissionais predominantes. Por isso, se revisitarmos os textos da década de 1980, anos em que a expressão "biotecnologia" se expande, encontraremos mais de uma dúzia de definições diferentes do termo. Levantamos, entre as definições encontradas com maior frequência, as seguintes:

- OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development: A aplicação dos princípios da ciência e da engenharia no tratamento de matérias por agentes biológicos na produção de bens e serviços (1982).
- OTA - Office of Technology Assessment: Biotecnologia, de uma forma abrangente, inclui qualquer técnica que utiliza organismos vivos (ou partes deles) para obter ou modificar produtos, melhorar plantas e animais, ou desenvolver microrganismos para usos específicos (1984).
- EFB - European Federation of Biotechnology: Uso integrado da bioquímica, da microbiologia e da engenharia para conseguir aplicar as capacidades de microrganismos, células cultivadas animais ou vegetais ou parte dos mesmos na indústria, na saúde e nos processos relativos ao meio ambiente (1988).
- E.H. Houwink: o uso controlado da informação biológica (1989).
- Biotechnology Industry Organization: em sentido amplo, Biotecnologia é "bio" + "tecnologia", isto é o uso de processos biológicos para resolver problemas ou fazer produtos úteis (2003).

Observa-se que, com o tempo, o conceito ganha uma expressão mais simples. As definições mais recentes não fazem mais referência aos processos tecnológicos envolvidos; talvez porque, além de complexos e diversos, estes evoluam muito rapidamente.

Neste texto consideraremos a biotecnologia de uma maneira ampla, definida como uma atividade baseada em conhecimentos multidisciplinares, que utiliza agentes biológicos para fazer produtos úteis ou resolver problemas. Esta definição é suficientemente abrangente para englobar atividades tão variadas como as de engenheiros, químicos, agrônomos, veterinários, microbiologistas, biólogos, médicos, advogados, empresários, economistas etc.

Figura 1.1: O campo da Biotecnologia.



O IMPACTO DA BIOTECNOLOGIA

Já não se trata de promessas ou de perspectivas futuras; os produtos e processos biotecnológicos fazem parte de nosso dia a dia, trazendo oportunidades de emprego e investimentos. Trata-se de plantas resistentes a doenças, plásticos biodegradáveis, detergentes mais eficientes, biocombustíveis, e também processos industriais menos poluentes, menor necessidade de pesticidas, biorremediação de poluentes, centenas de testes de diagnóstico e de medicamentos novos.

Tabela 1.1: Produtos e serviços de origem biotecnológica, em diferentes setores.

SETORES	TIPOS DE PRODUTOS OU SERVIÇOS
ENERGIA	Etanol, biogás e outros combustíveis (a partir de biomassa).
INDÚSTRIA	Butanol, acetona, glicerol, ácidos, vitaminas etc. Numerosas enzimas para outras indústrias (têxtil, de detergentes etc.).
MEIO AMBIENTE	Recuperação de petróleo, biorremediação (tratamento de águas servidas e de lixo, eliminação de poluentes).
AGRICULTURA	Adubo, silagem, biopesticidas, biofertilizantes, mudas de plantas livres de doenças, mudas de árvores para reflorestamento. Plantas com características novas incorporadas (transgênicas): maior valor nutritivo, resistência a pragas e condições de cultivo adversas (seca, salinidade, etc.).
PECUÁRIA	Embriões, animais com características novas (transgênicos), vacinas e medicamentos para uso veterinário e humano.
ALIMENTAÇÃO	Panificação (pães e biscoitos), laticínios (queijos, iogurtes e outras bebidas lácteas), bebidas (cervejas, vinhos e bebidas destiladas) e aditivos diversos (shoyu, monoglutamato de sódio, adoçantes etc.); proteína de célula única (PUC) para rações, alimentos de origem transgênica com propriedades novas.
SAÚDE	Antibióticos e medicamentos para diversas doenças, hormônios, vacinas, reagentes e testes para diagnóstico, tratamentos novos etc.

BIOTECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO

Por se tratar de uma coleção de tecnologias diversas, o uso das biotecnologias não se restringe necessariamente aos países desenvolvidos. Existe um espaço que os países emergentes podem ocupar, em função de suas riquezas naturais, desde que existam prioridades econômicas e políticas definidas claramente. A condição fundamental é contar com instituições competentes que formem uma massa crítica de pesquisadores e pessoal técnico treinado.

A China e a Índia contam hoje com uma indústria biotecnológica avançada e diversificada. Assim como a América Latina, onde esta se concentra principalmente na Argentina, no Brasil, no Chile, na Colômbia, em Cuba e no México. Países como Uruguai e Venezuela também têm atividade em algumas áreas, assim como, em menor escala, Equador, Costa Rica, Paraguai, Peru e Bolívia. Na região, umas 500 empresas incidem em vários setores: meio ambiente e indústria, agroalimentos e pecuária, saúde animal e humana.

No entanto, a Biotecnologia suscita ainda opiniões e sentimentos controversos. Enquanto alguns setores a percebem como uma tecnologia baseada em um sólido conhecimento científico, para outros se trata de uma atividade antinatural e perigosa. O enfrentamento de partidários e opositores ocorre com menos frequência no terreno das razões que no das paixões, sejam elas políticas, religiosas ou ideológicas. Ao discutir se a biotecnologia é progressista ou reacionária, boa ou ruim, se esquece que o que caracteriza uma tecnologia é o uso que fazemos dela.

Produtos e processos inimagináveis trinta anos atrás entram em nosso cotidiano antes que os alicerces científicos e tecnológicos correspondentes se insiram em nossa cultura, através de uma divulgação ampla que atinja também o sistema educativo em todos os seus níveis. Não existe possibilidade alguma de construir uma sociedade moderna se os seus integrantes ignorarem os aspectos mais gerais de ciência e tecnologia. O desconhecimento aumenta o risco de rejeitar tecnologias promissoras, capazes de abrir perspectivas novas, com vistas a um desenvolvimento sustentável em áreas tão críticas como a saúde, a produção de alimentos, a energia e o meio ambiente.

A proposta deste livro é revisar os fundamentos das biotecnologias e mostrar como esses se aplicam em diversos setores produtivos da sociedade, destacando como exemplos alguns empreendimentos latino-americanos bem sucedidos. Esperamos que ele seja de ajuda para todos os que nos preocupamos com os alcances desta fascinante (r)evolução tecnológica.

CRONOLOGIA DE ALGUNS ACONTECIMENTOS MARCANTES NA HISTÓRIA DA BIOTECNOLOGIA

DATA	ACONTECIMENTOS FUNDAMENTAIS
ANTIGUIDADE	Preparação e conservação de alimentos e bebidas por fermentação (pão, queijo, cerveja, vinho e vinagre); cultivo de plantas (batata, milho, cevada, trigo etc.); domesticação de animais; tratamento de infecções (com produtos de origem vegetal tais como pó de crisântemo e derivados de soja com fungos).
IDADE MÉDIA	
Século XII	Destilação do álcool.
IDADE MODERNA	
Século XVI	Cronistas registram a colheita de algas para alimentação, nos lagos de México, pelos astecas.
Século XVII	Início da produção comercial de cerveja; extração de metais por ação microbiana na Espanha; cultivo de fungos na França; Hooke descobre a existência de células (1665).
Século XVIII	Invento da máquina a vapor (1752). Entre 1750 e 1850, aumenta o cultivo de leguminosas na Europa e se difunde a prática de rotação de cultivos que aumenta a produtividade e melhora o uso da terra.
IDADE CONTEMPORÂNEA	
1797	Jenner inocula uma criança com um vírus que o protege contra a varíola.
1809	Appert utiliza o calor para esterilizar e conservar comida, processo que será utilizado nas campanhas napoleônicas.
1835 a 1855	Schleiden, Schwann e Virchow enunciam a teoria celular.
1863 a 1886	Pasteur inventa um processo para conservar alimentos sem alterar suas propriedades organolépticas (Pasteurização, 1863), derruba a teoria da abiogênese (1864), investiga as doenças do bicho-da-seda (1865), identifica a levedura como o agente responsável pela fermentação alcoólica (1876), usa microrganismos atenuados para obter vacinas contra o antraz e a cólera (1881), faz os primeiros testes de uma vacina contra a raiva (1881). Paralelamente, Koch inicia o desenvolvimento de técnicas fundamentais para o estudo dos microrganismos (1876), e enuncia quatro postulados sobre os agentes infecciosos como causa de doenças. Em 1865 Mendel apresenta o seu trabalho "Experiências de hibridização em plantas".
1887	Inauguração em Paris do Instituto Pasteur.

1892	Descoberta do vírus do mosaico do tabaco; introdução do trator na agricultura.
1897	Büchner mostra que enzimas extraídas da levedura podem transformar açúcar em álcool.
1899	Primeiro transplante de um órgão: o rim de um cachorro a outro cachorro.
1900	Redescobrimto das leis da hereditariedade, já enunciadas por Mendel em 1865, porém esquecidas.
1905	O primeiro transplante de córnea se realiza com sucesso; isto porque a córnea não tem antígenos.
1906	Ehrlich descobre o primeiro agente quimioterápico, chamado Salvarsan, que será utilizado contra sífilis.
1910	Em Manchester, na Inglaterra, começam a ser introduzidos os sistemas de purificação de esgoto baseados na atividade microbiana.
1912 a 1914	Rhöm obtém a patente de uma preparação enzimática para a lavagem de roupas; Weizmann consegue a produção de acetona e butanol por microrganismos.
1915	Morgan publica "Mechanism of Mendelian Heredity".
1916	Imobilizam-se as enzimas, uma técnica que facilita sua utilização em processos industriais.
1918	Morrem de gripe espanhola mais de vinte milhões de pessoas, um número de vítimas superior ao da Primeira Guerra Mundial. Constroem-se biodigestores para a produção de metano (China e Índia).
1919	O engenheiro agrícola húngaro Ereky utiliza pela primeira vez a palavra biotecnologia.
1927	Muller descobre que os raios X causam mutações.
1928	F. Griffith descobre a transformação, isto é a transferência de informação genética de uma linhagem bacteriana a outra.
1933	Comercialização do milho híbrido, isto é de sementes de um milho mais produtivo.
1936	Obtenção de ácido cítrico por fermentação.
1938	Na França, produção comercial de um biopesticida (<i>Bacillus thuringiensis</i>).
1940 a 1950	Avanços na mecanização do trabalho agrícola.
1944	Produção em grande escala da penicilina (descoberta por Fleming em 1928, desenvolvida por Florey e Chain).
1951	Inseminação artificial de gado utilizando sêmen congelado. Descoberta da presença de genes saltatórios no milho por Bárbara Mc Clintock.
1953	Watson e Crick propõem um modelo da estrutura do ADN
1959	Reinart regenera plantas de cenoura a partir de uma cultura de células (calo).
1960	Aumento da produção de ácido láctico, ácido cítrico, acetona e butanol por via fermentativa.
1961	Descoberta do código genético. Desenvolvimento de uma protease alcalina para uso em sabões para a lavagem de roupas pela empresa dinamarquesa Novo.
1962	Plantio de novas variedades de trigo mais produtivas, no México, dando início ao que será chamado de Revolução Verde.
1967	Primeiro transplante de coração, na África do Sul. O paciente sobrevive 18 dias.
1968	Produção industrial de aminoácidos utilizando enzimas imobilizadas.
1973	Havendo desenvolvido técnicas de corte e reunião do DNA, Cohen e Boyer transferem um gene a um organismo de outra espécie. Lançado no Brasil o programa de produção de álcool a partir de biomassa (Pró-Álcool)
1975	Köhler e Milstein desenvolvem a tecnologia de hibridomas e obtêm anticorpos monoclonais. A empresa Novo produz xarope com alto conteúdo de frutose por via enzimática como adoçante alternativo à sacarose. A Conferência de Asilomar pede ao National Institute of Health (NIH) que sejam estabelecidas normas para a regulação dos experimentos com DNA-recombinante, o que acontecerá meses mais tarde.
1976	Utilização da técnica de hibridização molecular no diagnóstico pré-natal da alfa talassemia.

1978	Genentech, Inc., a primeira empresa biotecnológica, fundada um ano antes por Boyer e Swanson, obtém a proteína somatostatina (hormônio de crescimento) mediante a tecnologia do DNA-recombinante.
1979	Nasce na Inglaterra Louise Brown, o primeiro bebê de proveta. Produção do hormônio de crescimento humano, utilizando a tecnologia do DNA-recombinante.
1980	A Suprema Corte de Justiça dos Estados Unidos aprova o princípio de patentes para as formas de vida de origem recombinante. As primeiras patentes são de Chakrabarty, para um microrganismo para biorremediação de petróleo, e de Cohen e Boyer, pelo processo de 1973. Mullis inventa a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) cuja patente será obtida por Cetus, Inc. em 1985 e vendida em 1991 a Hoffman-LaRoche, Inc. por 300 milhões de dólares.
1981	Obtenção da primeira planta geneticamente modificada. Obtenção da primeira linhagem de células-tronco de camundongo.
1982	A insulina humana de origem recombinante da Genentech, Inc. é comercializada. Uma licença será obtida mais tarde pela empresa Ely Lilly, que a venderá com o nome de Humulina®. A primeira vacina de DNA-recombinante para o gado é comercializada na Europa.
1983	Realizam-se as primeiras experiências de Engenharia Genética em plantas (petúnia). Syntex Corporation recebe a aprovação da Food and Drug Administration (FDA) de um teste para <i>Chlamydia trachomatis</i> baseado na utilização de anticorpos monoclonais. Isolado o vírus HIV no Instituto Pasteur (França) e no NIH (National Institute of Health, Estados Unidos).
1984	Jeffrey introduz a técnica do Fingerprint (impressões digitais), que, um ano depois, será utilizada pelos tribunais para a identificação de suspeitos. Clonagem e sequenciamento do genoma do HIV pela empresa Chiron Corp.
1986	A Environmental Protection Agency (EPA) dos Estados Unidos aprova a liberação de plantas de tabaco transgênicas. Um grupo de especialistas em segurança em Biotecnologia da Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento (OECD) declara que a previsibilidade das mudanças genéticas obtidas por Engenharia Genética é frequentemente maior que a correspondente às técnicas tradicionais, e que os riscos associados com organismos transgênicos podem ser avaliados do mesmo modo que os riscos associados aos outros organismos. Aprovada a primeira vacina biotecnológica para uso humano, trata-se de Recombivax-HB, contra a hepatite B.
1987	Advanced Genetic Sciences libera em campo bactérias DNA-recombinante (Frostban) que inibem a formação de gelo nos cultivos de morango, na Califórnia; a FDA aprova o fator ativador de plasminogênio, obtido por engenharia genética, para o tratamento de ataques cardíacos.
1988	A Universidade de Harvard obtém a patente de um rato transgênico desenvolvido especialmente para o estudo do câncer; na mesma década, os europeus obterão a patente de outro rato transgênico, sensível a substâncias carcinogênicas. Genencor International Inc. obtém a patente de um processo que permite obter enzimas (proteases) resistentes a alvejantes (processo <i>bleach</i>) para a fabricação de sabões para a lavagem de roupa.
1989	Com a criação do National Center for Human Genome Research se inicia o mapeamento do genoma humano.
1990	Primeira experiência de terapia gênica para uma doença rara (ADA) em uma menina de quatro anos. Pfizer comercializa Chy-Max™, uma enzima de origem recombinante para a preparação de queijos. GenPharm International, Inc. consegue uma vaca transgênica que produz no leite proteínas humanas para alimentação infantil. A Universidade da Califórnia (UCSF) e a Universidade de Stanford contabilizam 100 patentes relativas ao DNA-recombinante.
1992	Uma técnica, elaborada por cientistas americanos e britânicos, permite testar anormalidades como a fibrose cística e a hemofilia em embriões <i>in vitro</i> . A FDA declara que os alimentos de origem transgênica não demandam uma regulação especial.

1993	Aprovada a utilização do hormônio de crescimento bovino rBGH/rBST, produzido por Monsanto Co., para aumentar da produção de leite.
1994	Lançamento no mercado do tomate FlavSavr®, que, devido à inativação de um gene, amadurece na planta.
1995	Decifrado o primeiro genoma de uma bactéria, <i>Haemophilus influenzae</i> .
1996	Sequenciado o primeiro genoma de um organismo eucarionte, a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Desenvolve-se o primeiro GeneChip (Stanford, Affymetrix).
1997	Nasce Dolly, uma ovelha clonada, e, meses mais tarde, uma segunda ovelha, Polly, clonada e geneticamente modificada. Os cultivos transgênicos são introduzidos em vários países.
1998	Contabilizam-se mais de 1.500 empresas de Biotecnologia nos Estados Unidos e mais de 3.000 no mundo. Células-tronco embrionárias são utilizadas para regenerar tecidos. Sequenciamento do primeiro genoma animal, o verme <i>Caenorhabditis elegans</i> . Isolada a primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas.
1999	Sequenciamento do primeiro cromossomo humano. Pesquisadores descobrem que as células-tronco podem ser induzidas a se diferenciar em diversos tipos celulares.
2000	O rascunho do sequenciamento do genoma humano é anunciado simultaneamente por Collins, do Consórcio do Genoma Humano, e Venter, da Celera Inc. Sequenciados também o genoma da mosca <i>Drosophila melanogaster</i> , o primeiro genoma de uma planta (<i>Arabidopsis thaliana</i>) e, no Brasil, o de uma bactéria que ataca os cítricos (<i>Xylella fastidiosa</i>).
2001	O rascunho do sequenciamento do Genoma Humano é publicado simultaneamente nas revistas <i>Science</i> e <i>Nature</i> . Sequenciamento do genoma de plantas de interesse agrônomo para os países em desenvolvimento (arroz, banana). Sequenciamento do genoma de bactérias de importância agrônoma. Obtenção de células sanguíneas a partir de células-tronco embrionárias.
2002	Completados o rascunho do proteoma funcional da levedura e o sequenciamento do genoma do agente e do vetor transmissor da malária. Identificam-se mais de 200 genes envolvidos na diferenciação das células-tronco. Descoberta da participação de moléculas de RNA na regulação de vários processos celulares. Em diversos países inicia-se a utilização de células-tronco adultas para o tratamento experimental de diversas doenças (leucemia, mal de Chagas, diabetes e anemia falciforme).
2003	A venda, como mascote, do GloFish, um peixe transgênico que brilha na escuridão, originalmente criado para detectar poluentes. Clonagem de vários tipos de animais e de espécies ameaçadas de extinção.
2004	Sequenciado o genoma do frango. Um grupo de pesquisadores coreanos anuncia a obtenção de uma linhagem de células-tronco embrionárias pluripotentes, após uma transferência nuclear; descobrindo-se mais tarde que este resultado era uma fraude. Novos medicamentos e testes de diagnósticos entram no mercado.
2005	A Alemanha aprova os primeiros cultivos de plantas transgênicas. Publicado o genoma da vaca. Obtenção de células-tronco a partir de células da pele.
2006	Videiras geneticamente modificadas são testadas na África do Sul. O grupo de pesquisadores liderado por S. Yamanaka consegue induzir a pluripotencialidade celular introduzindo, mediante um vetor viral, quatro genes em células somáticas murinas.
2007	As autoridades europeias de segurança alimentar concluem que os genes marcadores de resistência aos antibióticos não apresentam riscos relevantes para a saúde humana ou animal nem para o meio ambiente.
2008	Pesquisadores japoneses desenvolvem a primeira rosa azul, geneticamente modificada. Cultivam-se plantas transgênicas em 25 países, incluídos sete da União Europeia. Yamanaka anuncia a obtenção de células pluripotentes induzidas utilizando um plasmídeo como vetor.
2009	Pesquisadores canadenses e britânicos conseguem reprogramar células da pele, murinas e humanas, utilizando um transposon como vetor de um pacote de quatro genes.

CAPÍTULO 2. AS CÉLULAS E OS CROMOSSOMOS

A CÉLULA COMO UNIDADE DOS SERES VIVOS

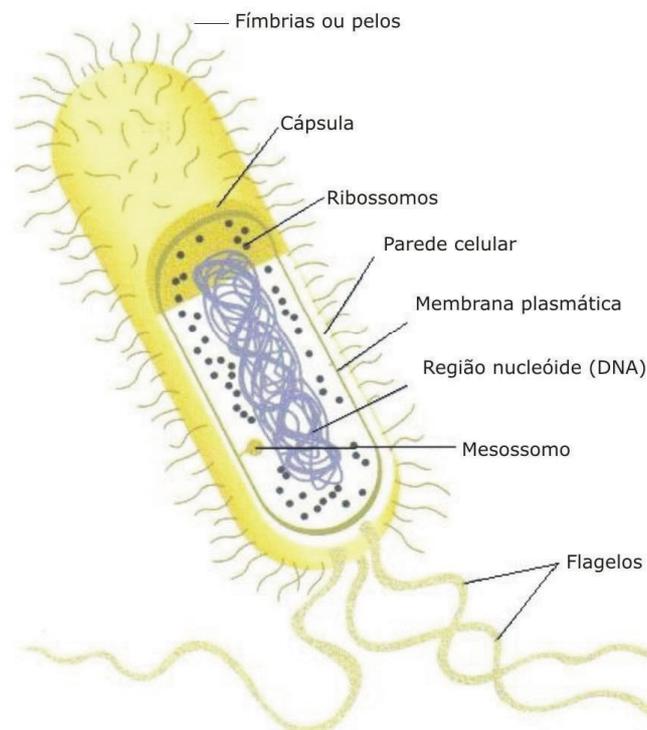
UNIDADE ESTRUTURAL

A célula é a unidade estrutural dos seres vivos. Trate-se de bactérias, amebas, espermatozoides ou neurônios, todas as células são formadas por água, íons inorgânicos e moléculas orgânicas (proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos). E todas elas apresentam uma membrana plasmática que separa o citoplasma do meio externo e permite o intercâmbio de moléculas entre ambos.

As células procarióticas se encontram exclusivamente no Reino Monera. Pequenas (0,001 a 0,005 mm) e com requerimentos nutricionais simples, estas células se multiplicam rapidamente. A informação genética se encontra em um cromossomo circular formado por uma molécula de DNA e associado a uma invaginação da membrana plasmática (mesossomo); pequenas moléculas circulares adicionais (plasmídeos) podem também estar presentes. Numerosos ribossomos asseguram a síntese proteica (Figura 2.1).

Bem mais complexa é a estrutura das células eucarióticas, presentes nos quatro Reinos restantes (Protista, Fungo, Planta e Animal). Com um tamanho variando entre 0,01 e 0,10 mm, estas células são dez vezes maiores que as procarióticas. A presença de compartimentos diferenciados, ou organelas, que cumprem atividades específicas, resulta em uma subdivisão do trabalho que garante a eficiência do funcionamento celular (Figura 2.2).

Figura 2.1: Representação esquemática de uma célula procariótica.

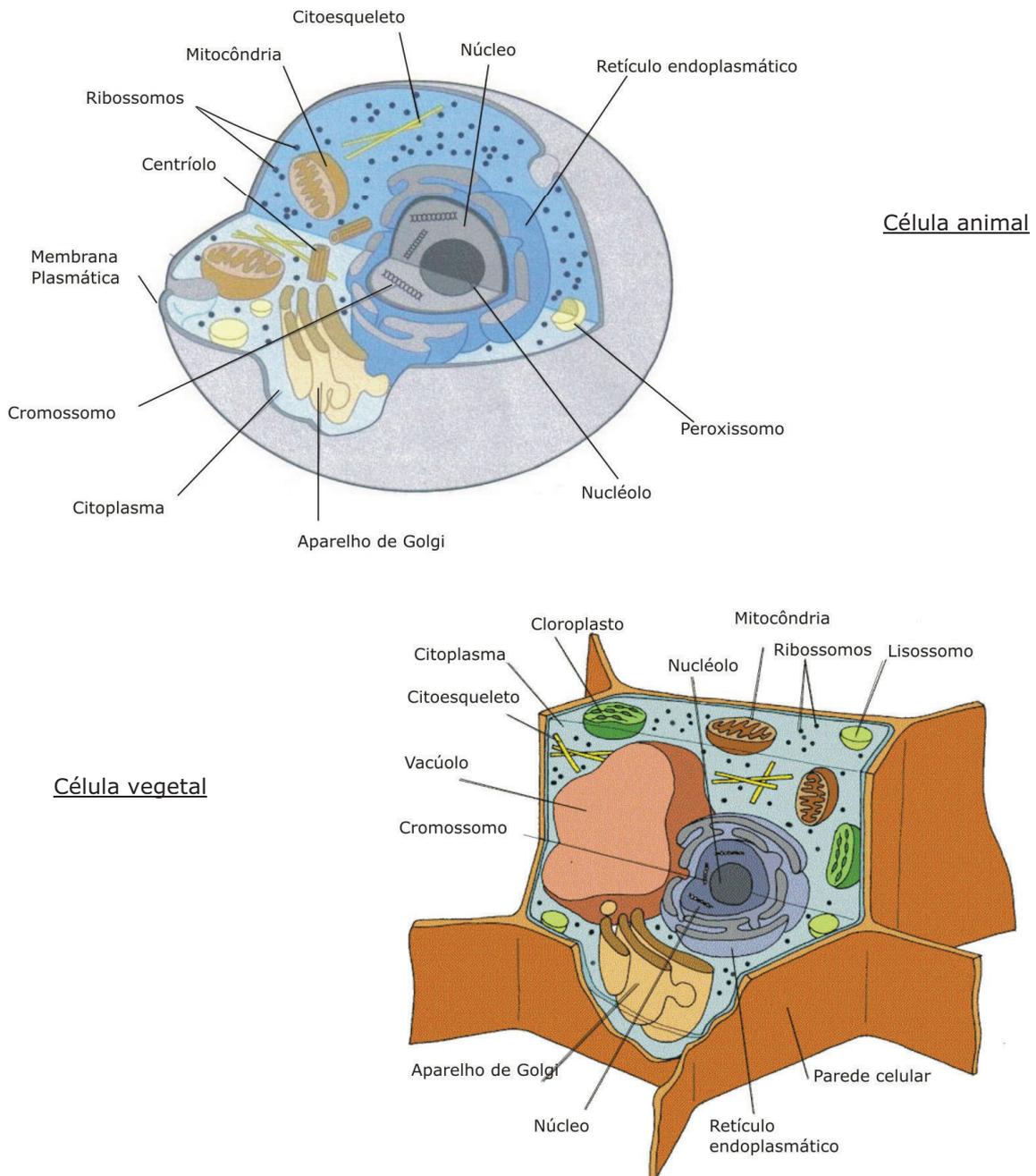


O citoplasma é percorrido por um sistema de membranas, o retículo endoplasmático, que está associado aos ribossomos e, por conseguinte, à síntese de proteínas. Processados no aparelho de Golgi, os produtos celulares são secretados ou distribuídos em outras estruturas (lisossomos, membrana celular). O metabolismo energético está associado a organelas citoplasmáticas, complexas e rodeadas de membranas (mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos). Um citoesqueleto, formado por túbulos e filamentos proteicos, mantém a forma da célula, além de assegurar o transporte interno das organelas e os movimentos celulares.

A informação genética está distribuída em cromossomos, cada um deles formado por uma molécula linear de DNA associada a proteínas. Os cromossomos e o nucléolo se encontram no núcleo, que funciona como um centro de controle celular. A membrana nuclear, um envoltório com poros que separa o núcleo do citoplasma, permite o intercâmbio de substâncias entre ambos.

Apesar de ter uma organização muito parecida, as células animais diferem das células vegetais em alguns aspectos. Nas células vegetais encontramos uma parede celular ao redor da membrana plasmática; o citoplasma contém cloroplastos, onde ocorre a fotossíntese, e grandes vacúolos, onde se armazenam substâncias e degradam macromoléculas. Nenhuma dessas estruturas se observa nas células animais; estas têm um centríolo que falta nas células vegetais.

Figura 2.2: Representações esquemáticas da estrutura celular eucariótica, animal e vegetal.



UNIDADE FUNCIONAL

A célula também é a unidade funcional de um organismo. O citoplasma é uma solução viscosa onde continuamente ocorrem reações de síntese e degradação de substâncias, consumindo ou liberando energia. Estas reações constituem o que denominamos metabolismo.

As reações metabólicas são facilitadas por proteínas com atividade catalítica, denominadas enzimas. Assim como as proteínas estruturais, as enzimas se sintetizam nos ribossomos, que são organelas citoplasmáticas pequenas não membranosas. A estrutura das proteínas depende da informação genética codificada no ácido desoxirribonucleico (DNA) e transcrita no ácido ribonucleico (RNA), que a leva do núcleo até o citoplasma.

As semelhanças de estrutura e funcionamento celulares decorrem de uma origem evolutiva comum, aproximadamente 3,8 milhões de anos atrás. Os dois tipos celulares que reconhecemos hoje, as células procarióticas e as eucarióticas, apareceram entre um e um milhão e meio de anos mais tarde.

RELAÇÃO ENTRE AS ESTRUTURAS CELULARES E SUA FUNÇÃO

Tabela 2.1: A função e a distribuição das estruturas celulares.

ESTRUTURA	FUNÇÃO	CÉLULA BACTERIANA	CÉLULA ANIMAL	CÉLULA VEGETAL
PAREDE CELULAR	Manutenção da forma e proteção da célula.	Presente ou ausente	Ausente	Presente
MEMBRANA PLASMÁTICA	Manutenção da estabilidade do meio intracelular; controle das trocas entre a célula e o meio extracelular.	Presente		
CARIOTECA ou MEMBRANA NUCLEAR	Controle do fluxo de substâncias entre o núcleo e o citoplasma.	Ausente	Presente	
CROMOSSOMO(S)	Controle da estrutura e do funcionamento celular.	Único e circular; apenas DNA.	Múltiplos e lineares; ADN e proteínas.	
NUCLÉOLO(S)	Formação de ribossomos.	Ausente	Presente	
CENTRÍOLOS	Formação de cílios e flagelos; participação na divisão celular.	Ausente	Presente	Ausente
RIBOSSOMOS	Síntese de proteínas.	Presente		
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO	Síntese de proteínas.	Ausente	Presente	
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO LISO	Síntese de lipídios; armazenamento e inativação de substâncias.			
COMPLEXO DE GOLGI	Secreção celular.			
LISOSSOMOS	Digestão intracelular.			
VACÚOLO CENTRAL	Equilíbrio osmótico e armazenamento.	Ausente		Presente
MITOCÔNDRIAS	Respiração celular aeróbia.	Ausente	Presente	Presente
CLOROPLASTOS	Fotossíntese.		Ausente	Presente
CITOESQUELETO	Manutenção da forma celular; contração; ancoragem de organelas.	Ausente	Presente	

TÉCNICAS LABORATORIAIS

O estudo das células se vê facilitado por um conjunto de técnicas laboratoriais, tais como:

- Técnicas microscópicas que permitem uma visualização detalhada da célula:
 - Microscopia óptica, que se utiliza para observar os cortes de tecidos. Geralmente, estes são fixados (álcool, ácido acético, formaldeído) e tingidos com corantes que reagem com as proteínas ou com os ácidos nucleicos, aumentando o contraste da imagem.
 - Microscopia de contraste de fase, que transforma as diferenças de espessura ou de densidade do fragmento observado em diferenças de contraste.
 - Microscopia fluorescente, que associa anticorpos específicos a um reagente como o PVF (proteína verde fluorescente de medusa), de forma a marcar as moléculas e visualizar sua distribuição nas células.
 - Microscopia confocal, que combina a microscopia fluorescente com a análise eletrônica da imagem, fornecendo uma imagem tridimensional.
 - Microscopia eletrônica, que permite a observação em um plano de cortes tingidos com sais de metais pesados (microscopia de transmissão) e a observação tridimensional de células (microscopia de varredura).
 - Microscopia de tunelamento, com os diversos tipos de microscópios de varredura por sonda (SPM, do inglês *scanning probe microscope*) que, além de fornecer uma imagem de moléculas e átomos, permitem medições e a manipulação de moléculas e átomos.
- Técnicas físicas como a centrifugação diferencial (ultracentrifugação, centrifugação em gradiente) para separar os componentes celulares para estudos bioquímicos posteriores.
- Técnicas instrumentais que possibilitam a contagem de células e a separação de populações celulares (*cell sorter*) ou de cromossomos (*flow sorter*).
- Técnicas de cultura de células com objetivos diversos.

TODA CÉLULA DERIVA DE OUTRA PREEXISTENTE

Assim como uma planta se forma a partir de outra planta e um animal de outro animal, toda célula deriva de outra preexistente. Este conceito, enunciado por R. Virchow em 1855, não foi plenamente aceito até dez anos mais tarde, quando L. Pasteur mostrou experimentalmente que a proliferação de microrganismos em um meio orgânico estéril se deve à contaminação deste com os microrganismos presentes no ar, que, ao encontrar um meio propício, se multiplicam rapidamente.

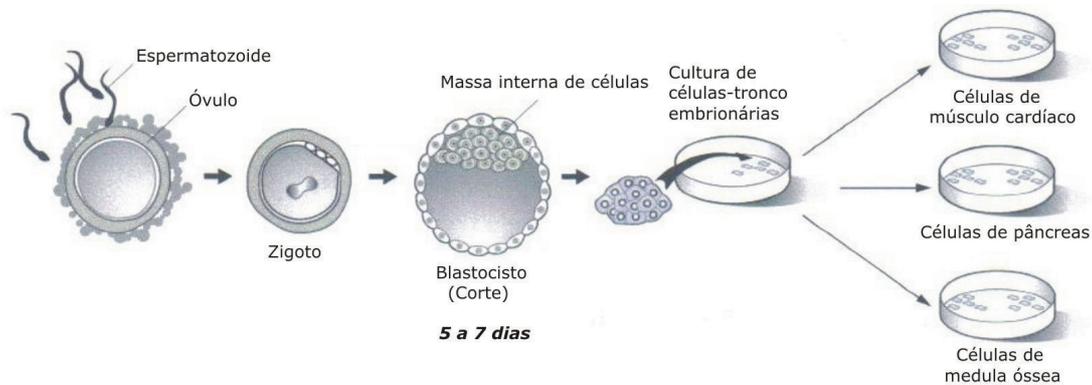
Todo organismo multicelular se forma a partir da multiplicação de uma única célula-ovo ou zigoto. As contribuições dos genes maternos e paternos para o desenvolvimento do embrião não são idênticas (*imprinting*). As células embrionárias se diferenciam, formando mais de 200 tipos de células em animais, e um pouco menos nos vegetais. Os diferentes tipos celulares cumprem funções específicas que, integradas, asseguram a unidade do organismo.

Nos vegetais, a persistência de tecidos embrionários totipotentes (meristemas) na planta adulta permite o crescimento e a regeneração durante a vida toda do organismo. Em condições apropriadas, células especializadas podem reverter a um estado não diferenciado e regenerar um organismo completo e diferenciado. Nessas propriedades se fundamenta a propagação de plantas *in vitro*.

Nos animais superiores, a totipotência se restringe às células do embrião com menos de quatro dias, que são as únicas capazes de regenerar um organismo inteiro. No entanto, no embrião de mais de quatro dias, algumas células internas do blastócito (células-tronco embrionárias) podem originar todos os tecidos do organismo, sendo consideradas pluripotentes (Figura 2.3).

Figura 2.3: As células-tronco embrionárias.

As células-tronco podem ser extraídas do blastócito com 5 a 7 dias e cultivadas *in vitro*; colocadas em condições experimentais adequadas, diferenciam-se nos distintos tipos celulares.



Também tecidos adultos (medula óssea, sangue, córnea e retina, polpa dentária, fígado, pele, trato digestivo e pâncreas) apresentam células-tronco. Elas podem permanecer nos tecidos, multiplicando-se durante longos períodos de tempo sem que ocorra a diferenciação. No entanto, em determinadas condições fisiológicas, estas células-tronco adultas originam células especializadas de vários tipos, assegurando a manutenção e o reparo do tecido onde se encontram. Um único tipo de célula-tronco multipotente da medula óssea, por exemplo, gera todas as células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas). Células-tronco unipotentes se diferenciam em uma única linhagem celular como, por exemplo, os queratinócitos da pele.

Por ser mais fáceis de conseguir, as células-tronco adultas encontraram rapidamente aplicações terapêuticas promissoras. Não aconteceu o mesmo com as células-tronco embrionárias. Estas podem ser obtidas seja a partir de um embrião, obtido por transferência de um núcleo a um ovócito anucleado, seja a partir dos embriões supernumerários congelados nas clínicas de fertilização assistida. Os dois métodos suscitaram grandes debates éticos em torno de quem forneceria os ovócitos e do *status* do embrião.

A polêmica deveria esmorecer com o desenvolvimento de uma tecnologia que permite obter, a partir de células somáticas, a obtenção de células iPS (do inglês, *induced pluripotent stem cells*) com propriedades equivalentes às das células-tronco embrionárias.

A indução de pluripotencialidade mediante a inserção de alguns genes em células adultas é um passo importante para acabar com a necessidade de dispor de embriões congelados. Entender os mecanismos que controlam o crescimento e a diferenciação celular é um dos maiores desafios atuais, porque as células-tronco possibilitarão novos tratamentos de regeneração celular para doenças cardíacas, diabetes e doença de Parkinson.

A tecnologia de reprogramação celular se desenvolve rapidamente, aumentando nosso conhecimento sobre o controle genético da diferenciação e abrindo uma nova senda para a implementação de testes, medicamentos e tratamentos novos.

OS CROMOSSOMOS

Cada cromossomo está formado por um filamento de DNA enrolado, a espaços regulares, sobre proteínas (histonas). Durante a maior parte do ciclo celular, os cromossomos se encontram distendidos, formando uma rede de filamentos finos (cromatina). Na divisão celular, a cromatina se condensa, possibilitando a observação microscópica dos cromossomos. Do ponto de vista morfológico, estes se caracterizam pelo tamanho e a posição do centrômero, uma constrição que divide o cromossomo em dois braços.

O número de cromossomos n é constante em todos os indivíduos de uma mesma espécie; $n = 4$ em *Drosophila melanogaster* e $n = 23$ no homem, por exemplo. Como nas células somáticas os cromossomos se encontram sempre em pares, na espécie humana o número de cromossomos ($2n$) é de 46, sendo que um par determina o sexo. Os cromossomos sexuais são idênticos na mulher (46, XX) e diferentes no homem (46, XY). Em outras espécies, a determinação do sexo segue mecanismos diversos.

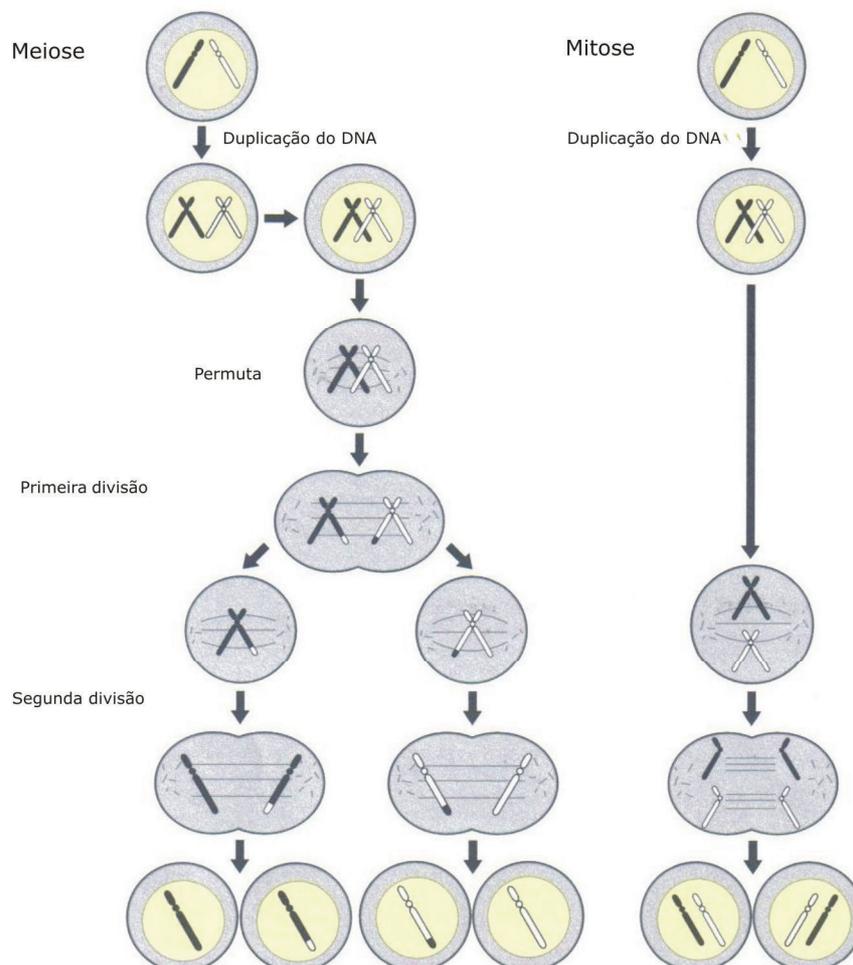
Um pouco antes da divisão de uma célula, os cromossomos se duplicam, de maneira que cada uma das células filhas recebe $2n$ cromossomos. A mitose mantém constante o número de cromossomos nas células somáticas dos indivíduos de uma mesma espécie. Já nas células reprodutivas, a meiose reduz a n o número de cromossomos; na fecundação, a fusão dos gametas irá restaurar o número n característico da espécie. Durante a meiose, o entrecruzamento dos cromossomos permite a permuta e recombinação dos genes (Figura 2.4).

Durante a formação dos gametas, erros na disjunção dos cromossomos podem dar origem a indivíduos com fórmulas cromossômicas alteradas. Na síndrome de Down, por exemplo, a pessoa apresenta geralmente um cromossomo 21 adicional. (mulheres 47, XX + 21; homens 47, XY + 21).

Estima-se que a porcentagem de recém-nascidos com alguma anomalia cromossômica estaria em torno de 0,85%, dos quais 0,65% apresentariam algum sintoma. Alterações cromossômicas também podem ser relacionadas com alguns tipos de câncer. Na leucemia mieloide crônica, por exemplo, se observa a translocação recíproca de dois pedaços dos cromossomos 9 e 22. De um modo geral, é frequente encontrar alterações no número de cromossomos das células cancerosas.

Figura 2.4: Mitose e meiose.

Durante a meiose, a permuta de fragmentos cromossômicos homólogos possibilita a recombinação dos genes.



A TEORIA CROMOSSÔMICA DA HEREDITARIEDADE

Em 1865, Gregor Mendel apresentou seu trabalho "Experiências de hibridização em plantas"; este reunia os resultados experimentais realizados com ervilhas (*Pisum sativum*), durante sete anos, no jardim do monastério Agostino de Brno (Morávia). Apesar de passar quase despercebido, o trabalho acabou sendo distribuído por várias bibliotecas da Europa e América, graças a sua publicação um ano mais tarde nos Anais da Sociedade de História Natural.

No texto figuram algumas generalizações. Conhecida como Primeira Lei de Mendel, Lei de Segregação ou Monoibridismo, a primeira delas se refere à segregação dos fatores (alelos) de um par (um gene) na formação de gametas. A segunda, que é conhecida como Segunda Lei de Mendel, Lei de Segregação Independente ou Diibridismo, se refere à segregação dos fatores (alelos) de dois ou mais pares (dois ou mais genes) independentes na formação de gametas.

Em 1900, depois de chegar de maneira independente a conclusões semelhantes, os pesquisadores K. Correns, E. Von Tschermak e H. de Vries redescobriram nas bibliotecas o trabalho de Mendel. Nesse intervalo de 35 anos tinha sido descrita a divisão celular (mitose, 1875; meiose, 1890); o próximo passo correspondeu a Sutton e Boveri (1902), sugerindo que os fatores hereditários de Mendel estariam nos cromossomos.

A confirmação desta hipótese decorreu dos trabalhos de T.H.Morgan e sua brilhante equipe na Universidade de Columbia (Nova York), com a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (Figura 2.5).

Figura 2.5: *Drosophila melanogaster*, a mosca do vinagre.



Em 1910, depois de uma série de cruzamentos e de análises estatísticas, Morgan mostrou que a herança da cor branca do olho do mutante *white* está associada à transmissão do cromossomo X, que determina o sexo.

Morgan e seus colaboradores identificaram numerosos outros mutantes de *Drosophila melanogaster* com um padrão mendeliano de hereditariedade (Figura 2.4). Além de moscas com olhos brancos em vez de vermelhos, encontraram outras com asas curtas em vez de longas, com corpo de cor marrom ou preta em vez de amarela etc. Os genes correspondentes se classificam em quatro grupos de ligação, sendo que cada um deles está associado a um dos quatro pares de cromossomos da *Drosophila*.

Como durante a meiose se produzem permutas entre segmentos cromossômicos, nos cruzamentos aparecem indivíduos recombinantes, isto é, com outras combinações gênicas diferentes das previstas pelas leis mendelianas. A partir dos dados obtidos em milhares de cruzamentos sobre a recombinação dos genes de um mesmo grupo de ligação chega-se a estabelecer a distância genética entre estes.

Com a descoberta de células com cromossomos gigantes (politênicos) nas glândulas salivares das larvas de *Drosophila*, começaram os primeiros trabalhos de mapeamento, associando os dados genéticos aos dados físicos.

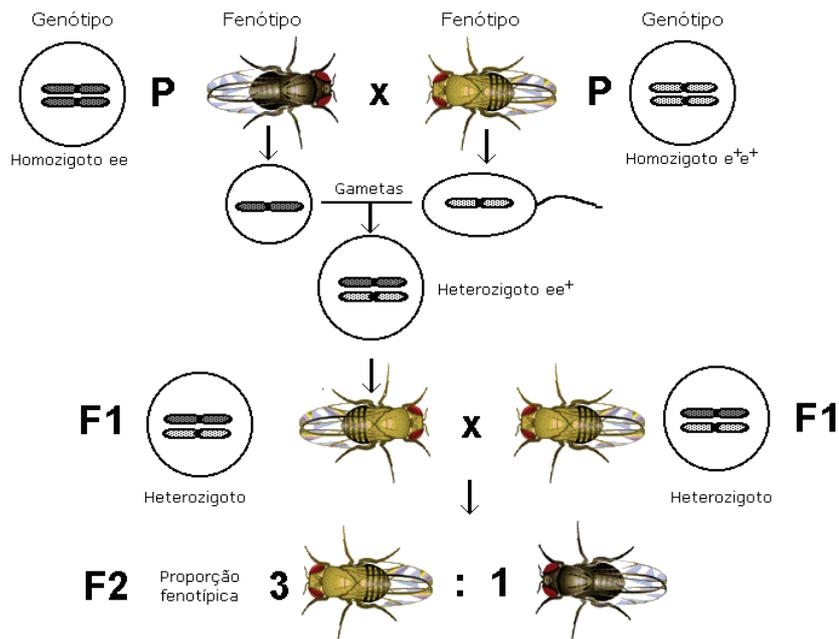
A observação microscópica das bandas nos cromossomos mostrou com enorme riqueza de detalhes uma sucessão consistente de bandas largas e estreitas. Da associação entre os métodos genéticos e os métodos citológicos surgiram os primeiros mapas físicos, associando uma região cromossômica a cada gene.

Das descobertas de Morgan e sua equipe, nasce a Teoria do Gene, segundo a qual:

- Os caracteres de um indivíduo correspondem a elementos pares, os genes.
- Os genes estão ligados uns aos outros nos cromossomos, formando um determinado número de grupos de ligação.
- Os genes de cada par se separam durante a gametogênese, de acordo com a Primeira Lei de Mendel e, em consequência, cada gameta fica contendo apenas um conjunto de genes (Figura 2.5).
- Os genes pertencentes a grupos de ligação diferentes segregam independentemente, de acordo com a Segunda Lei de Mendel (Figura 2.6).
- Entre os elementos pertencentes a cada grupo de ligação, ocorre uma troca ordenada chamada permuta ou *crossing-over*, que leva à recombinação dos genes (Figura 2.4).
- A frequência da permuta fornece a prova da linearidade dos genes em cada grupo de ligação e permite determinar sua posição relativa.

Figura 2.5: Monoibridismo.

A cor do corpo da *Drosophila* depende de um gene, localizado no cromossomo III, com dois alelos (e = corpo preto ou *ebony*, e^+ = corpo amarelo). O cruzamento entre duas linhagens puras de moscas que diferem pela cor do corpo (amarelo ou preto) gera, na primeira geração (F1), moscas de corpo amarelo, mostrando a recessividade do alelo e . Do cruzamento entre indivíduos da F1 nasce uma segunda geração (F2) com uma proporção fenotípica de 3 moscas amarelas: 1 mosca preta. Esta proporção decorre da segregação dos alelos de um gene, na formação de gametas.

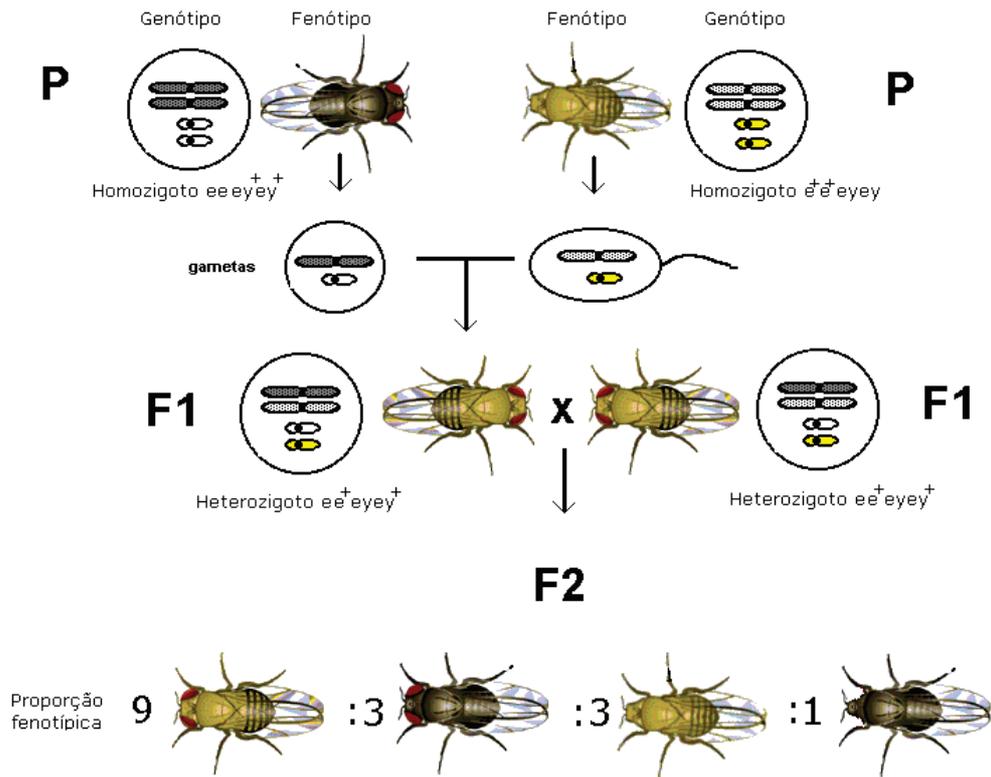


Quadro representativo do cruzamento F1 x F1

Gametas	e^+	e
e^+		
e		

Figura 2.6: Diíbridismo.

A cor do corpo da *Drosophila* depende de um gene, localizado no cromossomo III, com dois alelos (e = corpo preto ou *ebony*; e^+ = corpo amarelo). A presença ou ausência de olhos depende de um gene, localizado no cromossomo IV, com dois alelos (ey = sem olhos, ey^+ = com olhos). O cruzamento entre duas linhagens puras de moscas que diferem pela cor do corpo (amarelo ou preto) e a presença ou ausência de olhos gera, na primeira geração (F1), moscas com olhos e de corpo amarelo, mostrando a recessividade dos alelos ey e e . Do cruzamento entre moscas da F1 nasce uma segunda geração (F2) com uma proporção fenotípica de 9 moscas amarelas com olhos: 3 moscas amarelas sem olhos, 3 moscas pretas com olhos: 1 mosca preta sem olhos. Esta proporção decorre da segregação independente dos alelos dos genes localizados em diferentes cromossomos homólogos na formação de gametas.



Quadro representativo do cruzamento F1 x F1

Gametas	Gametas	Gametas	Gametas	Gametas
Gametas				

Os estudos posteriores mostraram a complexidade dos padrões de hereditariedade, que incluem casos de:

- Alelismo múltiplo, quando um gene admite múltiplos alelos; dominantes, recessivos ou codominantes (Sistema ABO, por exemplo).
- Pleiotropia, quando um gene determina diversos caracteres (pelagem e sobrevivência em ratos, por exemplo).
- Herança poligênica, quando um caráter está determinado por vários genes de efeito cumulativo (altura, cor dos olhos).
- Interação gênica, quando uma característica depende da ação de muitos genes.

Finalmente, deve-se destacar que o fenótipo de um indivíduo é o resultado da interação entre o genótipo e o ambiente em que este se expressa.

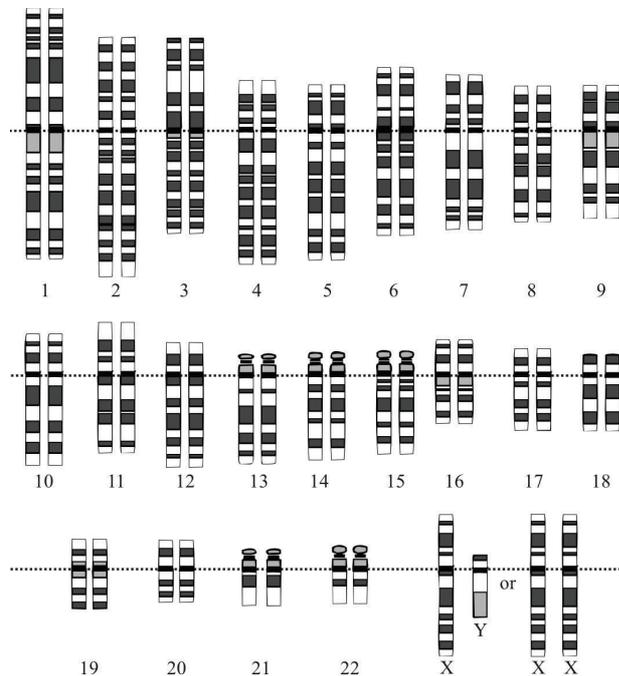
CÉLULAS E CROMOSSOMOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS

Um dos testes pioneiros de diagnóstico genético está baseado na observação microscópica dos cromossomos de células somáticas durante a divisão celular (mitose). A identificação se vê facilitada pela presença de regiões ou bandas reveladas mediante algumas técnicas de coloração. O número e a estrutura dos cromossomos são analisados e apresentados em um arranjo (cariótipo) que segue uma classificação convencional (Figura 2.7).

Figura 2.7: Representação dos cromossomos humanos.

O arranjo segue uma classificação convencional que leva em conta o tamanho, a posição do centrômero (tracejado no esquema) e o padrão das bandas de cada cromossomo.

Fonte: <http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/data/502/karyotype.png>



Os testes de diagnóstico genético envolvendo a análise de cariótipos estão amplamente difundidos na prática médica, sendo facilitados atualmente pela utilização de corantes específicos para cada par cromossômico.

Como agentes biológicos, as células encontram outras aplicações (Tabela 2.2). Células vegetais cultivadas *in vitro* produzem substâncias de alto valor agregado, importantes para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Também se utilizam para regenerar plantas. A multiplicação de vírus em cultivos de células de insetos permite a comercialização de práticas de controle biológico.

A síntese de algumas substâncias importantes para a indústria farmacêutica, como o fator ativador de plasminogênio, depende do cultivo *in vitro* de células animais. Estas também substituem os animais nos testes toxicológicos e são utilizadas na multiplicação de vírus para a preparação de vacinas. Também possibilitam a produção de anticorpos.

Combinando as técnicas de cultivo celular com o desenvolvimento de materiais biológicos semelhantes ao colágeno, uma área nova de engenharia de tecidos visa a reparação ou substituição de tecidos lesionados. Os enxertos de pele artificial, cultivada *in vitro*, saram ferimentos e/ou queimaduras em seres humanos.

Tabela 2.2: As células como agentes biológicos.

CÉLULAS	Vegetais	Indústria alimentar e cosmética (Adoçantes, corantes, flavorizantes e aromatizantes)
		Indústria farmacêutica (Alcaloides e esteroides)
	Animais e/ou humanas	Estudos toxicológicos
		Diagnóstico clínico
		Indústria farmacêutica (Produção de anticorpos, soros e vacinas)
		Medicina regenerativa (Produção de tecidos de substituição)

CAPÍTULO 3. OS MICRORGANISMOS

A DIVERSIDADE MICROBIANA

O termo "microrganismos" se aplica a um grupo heterogêneo de seres que vivem como células independentes ou como agregados celulares: bactérias, arqueas, protozoários, algas e fungos e, também, vírus. Salvo estes últimos, que estão na fronteira entre o vivo e o não vivo, os encontramos dentro dos três domínios em que se classificam os seres vivos: Bacteria, Archaea e Eukarya (Tabela 3.1).

Os microrganismos mostram uma diversidade surpreendente de estrutura e modos de vida. Alguns são procariontes, como as bactérias; outros eucariontes, como os protozoários, as algas e os fungos. Os aeróbios crescem se houver oxigênio, os anaeróbios se não o houver. Formas livres colonizam todos os ambientes terrestres, desde o cume das montanhas até as profundidades dos oceanos. Mas há também parasitas que crescem à custa de outros seres vivos, onde encontram abrigo e alimento, e os que mostram diversos graus de dependência de outros seres vivos.

Os autótrofos sintetizam seus alimentos a partir de dióxido de carbono; os fotossintéticos utilizam a luz como fonte de energia e os quimiossintéticos, algumas reações químicas inorgânicas. Os heterótrofos dependem das moléculas orgânicas elaboradas pelos autótrofos, que absorvem ou ingerem.

O fato de mantê-los agrupados sob a denominação de "microrganismos" talvez obedeça menos a uma questão de semelhança que a razões práticas; já que os mesmos métodos básicos de estudo (isolamento, cultura *in vitro*, identificação) podem ser aplicados, com pequenas variações, a esses grupos.

Tabela 3.1: Os microrganismos dentro do marco da uma classificação biológica atual.

DOMÍNIO	BACTERIA	ARCHAEA	EUKARYA			
REINO	EUBACTERIA	ARCHAEBACTERIA	PROTISTA	FUNGI	PLANTAE	ANIMALIA
TIPO DE CÉLULA	Procariótica	Procariótica	Eucariótica	Eucariótica	Eucariótica	Eucariótica
ESTRUTURA CELULAR	Parede celular com peptidoglicano	Parede celular sem peptidoglicano	Parede celular de celulose, em alguns; cloroplastos, em alguns	Parede celular de quitina	Parede celular de celulose; cloroplastos	Sem parede celular nem cloroplastos
ORGANIZAÇÃO	Unicelular	Unicelular	Uni ou pluricelular	Uni ou pluricelular	Pluricelular	Pluricelular
NUTRIÇÃO	Autotrófica (*) ou Heterotrófica (**)	Autotrófica (*) ou Heterotrófica (**)	Autotrófica ou Heterotrófica	Heterotrófica (absorção)***	Autotrófica	Heterotrófica (ingestão)***
EXEMPLOS	Eubactérias	Arqueas	Protozoários e Algas	Leveduras, Mofos, Bolores e Cogumelos.	Briófitas (musgos), Pteridófitas (samambaias), Gimnospermas e Angiospermas.	Invertebrados e Cordados

* Nutrição heterotrófica: o organismo se alimenta de moléculas orgânicas elaboradas por outros seres vivos por absorção (captação de nutrientes dissolvidos na água), ou ingestão (entrada de partículas de alimentos não dissolvidas).

** Nutrição autotrófica: o organismo produz seu próprio alimento a partir de substâncias inorgânicas e de uma fonte de energia. Os seres autotróficos podem realizar fotossíntese (para a qual a fonte de energia é a luz solar) ou quimiossíntese (para a qual a fonte de energia é uma reação química exotérmica).

*** A absorção permite a captação de nutrientes dissolvidos na água; a ingestão se refere às partículas de alimentos não dissolvidas.

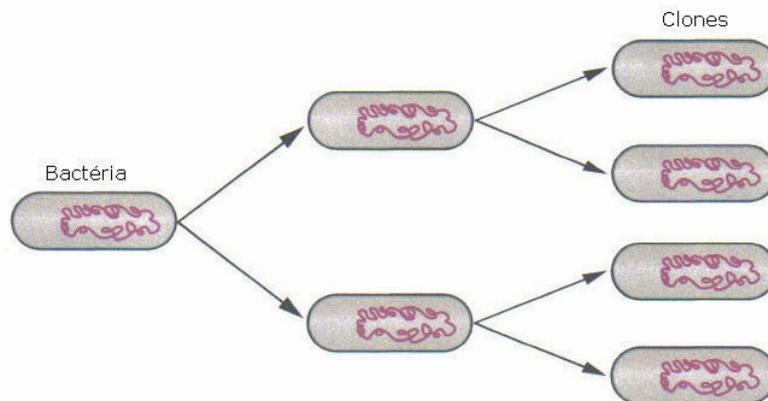
AS EUBACTÉRIAS

As eubactérias ou bactérias são organismos unicelulares procarióticos em que uma parede celular pode cumprir uma função protetora. Além do DNA cromossômico, podem apresentar moléculas circulares extras de DNA denominadas plasmídeos.

Em condições favoráveis de umidade, acidez e temperatura, as bactérias se multiplicam rapidamente por fissão celular produzindo milhões de células em poucas horas (Figura 3.1). Em uma de suas acepções, a palavra clone se aplica às células que derivam de uma única célula. Algumas espécies bacterianas também mantêm formas de reprodução sexuada, possibilitando a recombinação do material genético.

Figura 3.1: Bactérias e clones.

Por divisão binária de uma bactéria gera-se um clone de bactérias semelhantes.



As eubactérias formam um grupo com mais de 5.000 espécies conhecidas. Pequenas (0,0005-0,005 mm) e de formas diversas (esféricas, bastonetes, helicoidais), elas podem ser encontradas isoladas ou em pares, cadeias ou agregados. Algumas se locomovem livremente, mediante um ou mais flagelos distribuídos na superfície celular, outras se aderem mediante pelos ou fímbrias a um organismo hospedeiro. O grupo inclui também as cianobactérias, que serão comentadas mais adiante junto com as algas.

Em condições desfavoráveis, algumas bactérias formam esporos que resistem em forma latente até que a situação mude, germinando e retomando sua atividade fisiológica. Um exemplo interessante, na Europa do século XIX, é o da existência de "campos malditos", campos em que as ovelhas não deviam transitar, devido ao alto risco de contrair o carbúnculo ou antraz. De fato, os bacilos presentes nos animais vitimados pela doença e enterrados nesses campos formavam esporos que, trazidos à superfície pelas minhocas, contaminavam as pastagens.

Uma técnica laboratorial (coloração de Gram) permite diferenciar as bactérias pela estrutura da parede celular. Entre as Gram-positivas, cuja parede celular é mais simples, encontramos gêneros como *Clostridium*, *Bacillus*, *Mycobacterium* (com algumas espécies que causam a tuberculose e a lepra) e os Actinomicetes, como *Streptomyces*, produtora de antibióticos como a estreptomicina.

Entre as Gram-negativas, encontramos os micoplasmas, *Escherichia coli*, uma colonizadora do trato digestivo de muitos organismos, *Salmonella*, um agente de muitas intoxicações alimentares, as cianobactérias fotossintéticas, os espiroquetas (*Treponema pallidum* e *Borrelia burgdorferi*, causa da sífilis e da doença de Lyme, respectivamente) e as clamídias (responsáveis por tracoma e uretrites).

Estima-se que as bactérias sejam responsáveis por aproximadamente metade das doenças humanas. As Gram-negativas resultam mais difíceis de tratar que as Gram-positivas, devido a uma camada adicional na parede celular que as protege e dificulta a entrada de antibióticos. Assim como o homem, os animais e as plantas também são afetados por patógenos bacterianos. O dano decorre da invasão dos tecidos do hospedeiro ou da liberação de substâncias tóxicas (exo e endotoxinas). Mas nem todas são patogênicas.

A participação das bactérias na reciclagem dos elementos é fundamental do ponto de vista ecológico, possibilitando o tratamento de resíduos e de águas servidas e, também, a eliminação de compostos recalcitrantes (biorremediação) e a extração de minérios (biolixívia). Por outro lado, a fixação de nitrogênio e a produção de toxinas pesticidas contribuem para melhorar as práticas agrícolas.

Devido a suas propriedades metabólicas, muitas eubactérias são utilizadas na produção de alimentos (laticínios, vinagre, picles e azeitonas) e de aditivos (vitaminas, aminoácidos, gomas emulsificantes e estabilizantes), na indústria química (acetona, butanol e plásticos biodegradáveis) e na indústria farmacêutica (vacinas, toxinas e antibióticos). Também se utilizam na produção de enzimas para uso industrial e médico (Tabela 3.2).

AS ARQUEAS

As arqueobactérias, ou arqueas, diferem das eubactérias pela estrutura da parede celular e, também, por alguns aspectos metabólicos relacionados com a síntese de proteínas que as aproximam dos eucariontes.

Algumas vivem em habitats inóspitos, como as *solfataras* dos vulcões ou gêiseres, a temperaturas superiores a 60-80°C (Islândia, Costa Rica). Outras prosperam em lagos onde a concentração salina é altíssima, como o Grande Lago Salgado (Estados Unidos) ou o Mar Morto (Israel). Entre as arqueas existem também gêneros com vias metabólicas peculiares que as tornam dependentes de enxofre ou produtoras de metano.

Devido a estas propriedades, nos últimos anos tem-se acelerado a prospecção de arqueas com propriedades potencialmente interessantes, para serem utilizadas em processos industriais que exijam condições ambientais extremas.

No entanto, estudos recentes de ecologia molecular mostram que as arqueas não se limitam a ambientes extremos, sendo sua diversidade bem maior do imaginado previamente.

Tabela 3.2: As bactérias (Eubactérias e Arqueas) como agentes biológicos.

BACTÉRIAS	Tratamento de resíduos e de águas servidas
	Produção de energia Ex: Metano
	Biorremediação, extração de minério
	Indústria química Ex: Acetona, butanol, ácido láctico, ácido acético
	Enzimas industriais
	Agricultura Ex: Rizóbios, biopesticidas
	Alimentos Ex: Laticínios, vinagres, picles, azeitonas, silagem
	Indústria de alimentos Ex: Vitaminas B ₁₂ e β-caroteno, aminoácidos lisina e ácido glutâmico; polissacarídeos xantana e dextrana*
	Indústria farmacêutica Ex: Enzimas de uso médico, antibióticos, vacinas e toxinas

(*) A dextrana também tem usos médicos

OS PROTISTAS

Os Protozoários se classificam no reino Protista, um grupo mal definido de seres eucarióticos unicelulares ou pluricelulares, autótrofos ou heterótrofos, de reprodução sexuada ou assexuada.

Trata-se de organismos unicelulares heterotróficos, cujo tamanho varia entre 0,002 e 1mm. Alguns vivem livres em ambientes marinhos, de água doce, ou simplesmente muito úmidos. Outros parasitam outras espécies, nas quais causam doenças: *Giárdia*, *Amoeba*, *Trichomonas*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* etc. De importância fundamental para o ser humano do ponto de vista médico, sua caracterização molecular pode dar origem a testes diagnósticos e vacinas.

Classificadas junto com os protozoários no reino Protista, as algas são organismos uni ou pluricelulares, autótrofos e aquáticos. Situadas na base das cadeias alimentícias aquáticas, as algas cumprem um papel fundamental na biosfera por serem capazes de fixar gás carbônico e produzir oxigênio. Algumas participam na formação de solos e na fixação de nitrogênio.

Apesar de não ter órgãos diferenciados, as macroalgas marinhas (algas pardas, algas vermelhas e parte das algas verdes) formam filamentos e talos que podem chegar a medir mais de trinta metros. São utilizadas na alimentação humana (*Porphyra* ou *nori* e *Laminaria*, como o *kombu*, no Oriente; *cochayuyo* no Chile); e, também, como adubo. Devido a sua capacidade de formar géis e emulsões, os ficocoloides extraídos delas (Agar, carragenina, alginato) são empregados em análises clínicas (preparação de meios de cultivo para cultivo de bactérias e fungos) e em várias indústrias, tais como a alimentícia (sorvetes, cremes, geleias etc.), a farmacêutica (laxantes, cápsulas de remédios) e a cosmética (cremes, sabonetes, xampus, dentifrícios etc.).

As microalgas representam um grupo extremamente diversificado de umas 25.000 espécies das quais só um pequeno grupo está bem estudado. Este compreende aproximadamente cinquenta espécies de microrganismos fotossintéticos, tanto eucariontes (diatomáceas, dinoflagelados, euglenoides e outras algas verdes) como procariontes (cianobactérias, antigamente algas azul-esverdeadas).

Tabela 3.3: As algas como agentes biológicos.

ALGAS	Biomassa	Tratamento de efluentes, biomonitoramento de poluição, energia Ex: Biomassa para a produção de energia.
		Agricultura Ex: Adubo.
		Produção de alimentos Ex: Alimentação humana, ração para avicultura e aquicultura.
	Moléculas	Indústria de alimentos Ex: Aditivos, espessantes e emulsionantes, substitutos proteicos e complementos nutricionais.
		Indústria de cosméticos Ex: Ácidos graxos e outras substâncias tais como ficocoloides, pigmentos, glicerol, abrasivos finos etc.
		Indústria farmacêutica Ex: Compostos biologicamente ativos, tais como toxinas, antibióticos, antivirais e antitumorais.

A proliferação de microalgas como florações na natureza (marés vermelhas) ou em reservatórios, geralmente devido à eutrofização das águas, causa a morte de outros organismos, sendo muito perigosa se estiver acompanhada pela liberação de toxinas. Porém, em alguns sistemas de tratamento de efluentes as microalgas são incorporadas nos tanques para remover nutrientes inorgânicos e adicionar oxigênio. Também são usadas como indicadores de poluição.

O metano, um gás combustível, resulta da degradação de biomassa de algas por microrganismos anaeróbios. Por outro lado, a produção de hidrogênio por algas representa uma alternativa energética promissora.

As microalgas são aproveitadas na alimentação animal como ração para a avicultura e a aquicultura. Algumas das substâncias que elas sintetizam são incluídas na alimentação humana como complementos nutricionais e substitutos proteicos; trata-se de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas (B12, β -caroteno ou provitamina A). Também são utilizadas na formulação de cosméticos e na indústria farmacêutica (Tabela 3.3).

OS FUNGOS

O Reino Fungi comporta mais de 100.000 espécies. Os fungos são organismos eucarióticos, uni ou pluricelulares, com uma parede celular formada por quitina. Todos eles são heterótrofos e podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente.

As leveduras são fungos unicelulares que se desenvolvem em lugares úmidos e se reproduzem por brotamento. Pertence a este grupo um dos microrganismos de maior importância econômica: *Saccharomyces cerevisiae*, o popular levedo de cerveja (ou, simplesmente, levedura) utilizado tradicionalmente na preparação de alimentos e de bebidas, assim como na produção de etanol, vitaminas e outros metabólitos. Transformada mediante técnicas de engenharia genética, esta levedura produz uma vacina contra a hepatite B (Tabela 3.4). Entretanto, nem todas as leveduras são benéficas; *Candida albicans*, um microrganismo oportunista da flora normal humana pode, em certas condições, proliferar de maneira anormal, tornando-se patogênica.

Tabela 3.4: Os fungos como agentes biológicos.

FUNGOS	Agricultura Ex: Controle biológico de insetos e nematoides, micorrizas.
	Produtos de fermentação Ex: Etanol, glicerol, ácido cítrico.
	Enzimas industriais
	Biomassa Ex: Fermento de padaria, micoproteína.
	Indústria de alimentos Ex: Panificação, queijaria.
	Indústria de bebidas Ex: Cervejas e vinhos, destilados.
	Produtos metabólicos Ex: Extrato de levedura, hormônios de crescimento vegetal.
	Indústria farmacêutica Ex: Antibióticos, vitaminas, vacinas, esteroides.

Nos bolores e mofos, as células formam um emaranhado de filamentos ou hifas, denominado micélio. Os mofos crescem rapidamente por fragmentação do micélio e se disseminam mediante esporos; como *Aspergillus niger*, um produtor de ácido cítrico; ou como *Rhizopus*, o fungo preto do pão, que se expande sobre a superfície deste apesar dos conservantes acrescentados; ou ainda como *Aspergillus flavus*, um bolor que ataca as sementes de leguminosas (amendoim, feijão, soja) e produz uma toxina poderosa, a aflatoxina, causando graves intoxicações.

Neste grupo também se encontra o *Penicillium*, um gênero que conta com diversas espécies, uma das quais é utilizada na indústria farmacêutica, para a produção de penicilina, e outras na indústria de alimentos, para a maturação de queijos como o Roquefort, o Gorgonzola e o Camembert.

Os cogumelos são os corpos reprodutivos de muitos fungos. Alguns são venenosos (*Ammanita*), outros produzem substância alucinógena, tais como a psilocibina, utilizada por grupos nativos mexicanos em rituais religiosos, ou a ergotamina, sintetizada quimicamente no século XX com o nome de LSD (ácido lisérgico). Mas também os há comestíveis como o *Agaricus* ou champignon, o *Shiitake* e o *Pleurotus*, que são cultivados e comercializados pelo homem.

Em termos ambientais, um quarto da colheita de frutas e vegetais é destruído pelos fungos; pragas como a ferrugem do café, o esporão do centeio e a vassoura-de-bruxa afetam gravemente a agricultura. Na Irlanda no século XIX, o *Phytophthora infestans* atacou a batata, destruindo a fonte básica de alimentação; a praga causou um milhão de mortes e a emigração forçada de boa parte da população.

Os líquens resultam da simbiose entre um fungo e uma alga. Alguns são comestíveis, supondo-se que a *Lecanora esculenta* seja o maná referido na Bíblia. O grupo não tem sido muito explorado economicamente, apesar de ter encontrado aplicações como corantes (tintura de tornassol, um indicador de pH), no tingimento de tecidos e como fixadores na indústria de perfumes. Também são indicadores de poluição (biomonitoramento).

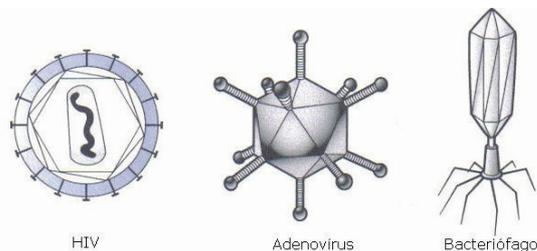
Em contrapartida, outra associação, desta vez entre um fungo filamentoso e as raízes das plantas vasculares, as micorrizas, ocupam um lugar de destaque na agricultura em solos tropicais por facilitarem a solubilização dos fosfatos.

OS VÍRUS, NA FRONTEIRA DO VIVO E DO NÃO VIVO

Os vírus são partículas inertes sem nenhuma atividade metabólica, no limite entre o "vivo" e o "não vivo". Os menores medem 20 nanômetros ($1\text{nm} = 10^{-4}\text{mm}$). Podem atravessar filtros extremamente finos e cristalizar. Sua estrutura é muito simples: um ácido nucleico (ADN ou ARN, como filamento simples ou duplo) dentro de uma capa proteica ou capsídeo. Muitos possuem enzimas que serão liberadas dentro da célula hospedeira (Figura 3.2)

Figura 3.2: Alguns tipos de vírus.

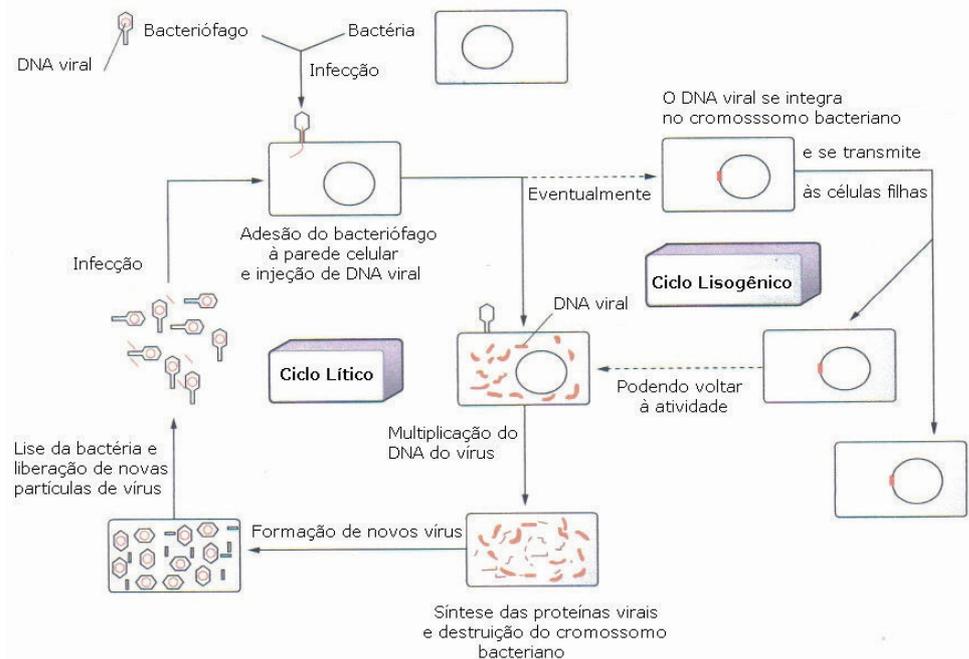
Os adenovírus e o HIV parasitam células humanas; o bacteriófago, bactérias.



Como parasitas obrigatórios de bactérias, plantas ou animais, ao infectar uma célula viva passam a utilizá-la para sua própria reprodução. Alguns se integram no genoma da célula infectada (bacteriófagos, retrovírus). Devido a esta propriedade, os vírus têm sido utilizados como vetores para introduzir genes em uma célula hospedeira (Figura 3.3).

Figura 3.3: A multiplicação de um bacteriófago.

A infecção da bactéria pelo bacteriófago destrói a célula (ciclo lítico). Em alguns casos, o DNA viral se integra no cromossomo sendo transmitido às células filhas; em determinadas condições o vírus retoma sua atividade, reiniciando o ciclo lítico.



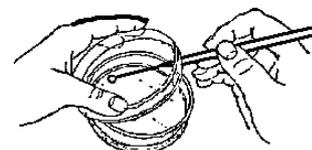
Várias doenças humanas são causadas por vírus, tais como o poliovírus, o HIV, o coronavírus responsável pela SAR (síndrome aguda respiratória) etc. Ao infectar as células animais normais, alguns vírus as transformam em células cancerosas.

Os vírus que infectam insetos podem ser utilizados no controle de pragas. Na luta contra a lagarta da soja, o Baculovírus evita a aplicação de 1,2 milhão de litros de inseticidas por ano nas lavouras brasileiras.

AS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

Diversos tipos de técnicas, muitas das quais datam do século XIX, facilitam o trabalho laboratorial. A identificação de um microrganismo demanda a observação microscópica e a utilização de alguns métodos específicos de coloração, complementados por testes bioquímicos e eventualmente genéticos e imunológicos. Encontrar e manter um microrganismo no laboratório demanda a aplicação de técnicas bacteriológicas aplicáveis também, com algumas variações, a fungos e algas.

Cultivar microrganismos exige, além do desenho de um meio nutriente que satisfaça suas necessidades metabólicas, um cuidado especial com as condições de temperatura e iluminação em que este será incubado. Os meios nutrientes se empregam líquidos ou solidificados com agar, uma substância que lhes confere uma consistência gelatinosa. Os recipientes mais comuns são tubos de ensaio e placas circulares de vidro com tampa (Placas de Petri); e, para inocular os meios, se utilizam alças de platina e pipetas de diferentes tipos (Figura 3.4).

Figura 3.4: Material clássico de Microbiologia

A grande dificuldade do laboratório microbiológico está em | do

microrganismo desejado evitando as contaminações, isto é a multiplicação de outros microrganismos.

Trabalha-se em condições assépticas, o que demanda a esterilização prévia do material de vidro, dos meios nutrientes e dos instrumentos (alças, pipetas) que serão utilizados. E na transferência do material biológico, evita-se cuidadosamente toda contaminação com os microrganismos do ar. Equipamentos especialmente desenhados para trabalhar sob um fluxo de ar esterilizado ajudam o profissional. Também se evitam as contaminações na hora de eliminar o material utilizado, a fim de não liberar microrganismos prejudiciais no ambiente.

Os microrganismos são isolados a partir de amostras de solo, água, ar ou fluidos corporais. As linhagens obtidas se conservam como culturas puras. Microrganismos com características diferentes são obtidos induzindo mutações e selecionando as linhagens mutantes. Cada laboratório mantém os estoques microbianos necessários, que também podem ser solicitados a centros especializados (Coleções de cultura).

O número de microrganismos em uma amostra pode ser estimado por diversos métodos: contagem microscópica, contagem eletrônica, contagem em placa, turvação do meio, massa seca, conteúdo de nitrogênio ou medidas indiretas da atividade microbiológica.

Em geral, as técnicas clássicas são trabalhosas e muito demoradas para o diagnóstico clínico, por isso estão sendo substituídas por técnicas miniaturizadas mais rápidas que identificam os microrganismos com base em algumas reações bioquímicas em *kits* padronizados. A tendência geral é de automatização do laboratório microbiológico.

Em outra linha de ação, a partir do início do século XX surge a Microbiologia Ambiental, trazendo uma nova visão em relação às populações microbianas presentes na natureza. No entanto, nossa ignorância em relação aos microrganismos ainda é enorme. O número de espécies que conseguimos cultivar no laboratório não representa ainda mais do que 1 a 5 % da totalidade existente; dependemos dos avanços na área da genômica para ampliar nosso conhecimento das comunidades microbianas do ambiente.

BIOSSEGURANÇA E BIOSSEGURIDADE

Os microrganismos são classificados segundo o risco de causarem danos aos profissionais que trabalham com eles e à coletividade. Os critérios são: a patogenicidade para o homem, a virulência, o modo de transmissão, a endemicidade e a existência ou não de uma terapêutica eficaz. Definem-se assim quatro grupos de risco:

- Grupo 1: Baixo risco individual e coletivo. Microrganismos que nunca foram descritos como agente causador de doenças para o homem e que não constituem risco para o meio ambiente. Exemplos: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (algumas linhagens).
- Grupo 2: Risco individual moderado, risco coletivo limitado. Microrganismos que podem causar doenças no homem, com pouca probabilidade de alto risco para os profissionais do laboratório. Exemplos: *Salmonella*, *Toxoplasma*, *Schistosoma mansoni*, vírus do sarampo, vírus da hepatite B.
- Grupo 3: Risco individual elevado, risco coletivo baixo. Microrganismos que podem causar doenças graves aos profissionais do laboratório. Exemplos: *Mycobacterium tuberculosis* e HIV.
- Grupo 4: Sério risco para os profissionais do laboratório e para a coletividade. Microrganismos que causam doenças graves para o homem. Exemplos: vírus Ebola, vírus Marburg.

A cada grupo de microrganismos correspondem normas estritas de trabalho, que abrangem desde a arquitetura do laboratório e as características dos equipamentos até as precauções que devem ser tomadas pelos profissionais e a forma em que o lixo será descartado.

O conceito de biossegurança se complementa com o de biosseguridade, isto é, o conjunto de medidas necessárias para evitar a remoção intencional de material biológico valioso como, por exemplo, em caso de bioterrorismo.

OS MICRORGANISMOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS

Tabela 3.5: Principais destaques entre os agentes biológicos microbianos.

EUBACTÉRIAS	UTILIZAÇÃO
Bactérias lácticas	Os gêneros <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i> são responsáveis por vários processos, tais como a elaboração de queijos e de iogurtes, o envelhecimento dos vinhos, a conservação de alimentos (<i>sauerkraut</i> ou repolho fermentado, silagem para o gado); a produção de ácido láctico, um aditivo utilizado na indústria de alimentos como acidulante e estabilizante.
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Este microrganismo prolifera no solo e na superfície das plantas, sintetizando uma toxina fatal para as larvas de insetos. Esta é produzida comercialmente há mais de 40 anos, representando 90% das vendas de inseticidas biológicos e reduzindo a necessidade de aplicação de pesticidas químicos nas lavouras. Nos últimos anos, o gene codificador da toxina tem sido transferido a plantas (algodão, milho) para que estas sintetizem diretamente o inseticida.
<i>Streptomyces</i>	Além do cheiro característico da terra removida, este gênero de bactérias do solo produz substâncias antibióticas (estreptomicina, tetraciclina, eritromicina), antifúngicas (nistatina), herbicidas, antitumorais e supressoras de rejeição a transplantes.
<i>Pseudomonas</i>	Várias linhagens se utilizam na eliminação de poluentes. Algumas quebram moléculas de hidrocarbonetos, como os existentes nos acidentes de derramamento de petróleo; outras podem remover o mercúrio aquático.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agente patogênico para as plantas dicotiledôneas que desenvolvem um tumor ou galha quando infetadas. Com a remoção de um gene, perde a capacidade de provocar tumores, conservando a capacidade infecciosa, utilizada na engenharia genética de vegetais.
Bactérias butíricas	Na indústria têxtil, <i>Clostridium butyricum</i> libera as fibras vegetais durante a maceração do cânhamo e do linho. <i>Clostridium acetobutyricum</i> é utilizado na produção industrial de acetona e butanol. <i>Clostridium botulinum</i> produz uma toxina poderosíssima; calcula-se que um grama desta bastaria para matar um milhão de pessoas. A ingestão de conservas contaminadas e mal esterilizadas resulta quase sempre em um desfecho fatal. Devido a sua ação inibitória da contração muscular, a toxina botulínica é utilizada em concentrações muito pequenas, para reduzir as rugas e marcas de expressão durante certo tempo (efeito cosmético).
<i>Escherichia coli</i>	<p>Descoberta em 1855, esta bactéria Gram-negativa vive no trato digestivo do homem e de outros animais. Têm forma de bastonete (0,002 mm de comprimento, 0,0008 mm de diâmetro), 1 a 4 moléculas de DNA e 15.000 a 30.000 ribossomos. Flagelos e pelos lhe permitem movimentar-se rapidamente. Algumas linhagens são patogênicas, podendo contaminar os alimentos (carne, leite, vegetais) que devem ser cozidos adequadamente. Os seus requerimentos nutricionais básicos são simples: água, sais minerais, uma fonte de nitrogênio e uma fonte de energia. Em condições adequadas, se divide a cada 20-40 minutos; também pode se reproduzir de maneira sexuada (conjugação).</p> <p>Devido à facilidade com que ela pode ser cultivada no laboratório, <i>Escherichia coli</i> tem se tornado uma ferramenta indispensável para estudos bioquímicos e genéticos, incluindo a Engenharia Genética. O seu genoma compreende 4,6 milhões de pares de bases que codificam em torno de 4.000 proteínas diferentes.</p> <p>A introdução de transgenes em <i>Escherichia coli</i> K12, uma linhagem inofensiva de laboratório, possibilitou os primeiros processos de produção de insulina, de interferon e de hormônio de crescimento. Entretanto, por se tratar de uma célula procariótica, nem sempre é a melhor opção de "fábrica" para a síntese de produtos de origem animal ou vegetal, tendo sido aos poucos substituída por outras células eucarióticas, como a levedura.</p>

ARQUEOBACTÉRIAS	UTILIZAÇÃO
<i>Thermus aquaticus</i>	Isolada em uma poça do parque nacional de Yellowstone (Estados Unidos), esta bactéria produz uma enzima que copia o DNA a uma temperatura alta. Esta enzima permite obter milhões de cópias de um fragmento de DNA em um processo automatizado que revolucionou a Biotecnologia, chamado PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase).
Bactérias metanogênicas	Vivem em lugares onde há ausência de oxigênio, seja no tubo digestivo de alguns animais (gado, cupins) ou nos pântanos. Estas bactérias transformam o acetato resultante da degradação de celulose por outras bactérias em metano, um gás combustível.
ALGAS	UTILIZAÇÃO
<i>Spirulina</i>	O seu alto teor proteico, que corresponde a 60% do peso seco, lhe confere um elevado valor nutritivo; as proteínas representam aproximadamente 2% do peso seco da batata e 6-10% do trigo. Quando da chegada dos espanhóis, os astecas já preparavam umas bolachas (<i>tecuilatli</i>) com a <i>Spirulina</i> coletada no lago Texcoco. Na África, no lago Tchad, ainda hoje ela é coletada e consumida como alimento. <i>Spirulina</i> , assim como <i>Chlorella</i> , são vendidas em tabletes como complemento nutritivo.
<i>Dunaliella</i>	Acumula glicerol em condições de alta salinidade, com o qual consegue evitar a desidratação. Pode crescer no Mar Morto, sendo também cultivada em tanques ou lagoas, perto do Mar Vermelho, para extração do glicerol e de β -caroteno, outro produto metabólico.
FUNGOS	UTILIZAÇÃO
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Conhecido como levedo de cerveja ou levedura, é utilizado na preparação de alimentos (pão, biscoitos, fermento de padaria) e de bebidas (cerveja, vinho e destilados), assim como na produção de outras substâncias de importância industrial (etanol, vitaminas e outros metabólitos). A levedura cresce facilmente em laboratório. Também pode ser manipulada geneticamente. Nos fermentadores ou biorreatores industriais onde se multiplica rapidamente a partir de matérias-primas de baixo custo, ela permanece ativa durante períodos longos e, ao concluir o processo, pode ser separada por filtração ou centrifugação. Com 12.000.000 de pares de bases e 6.000 genes em 16 cromossomos, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> foi, em 1997, o primeiro organismo eucariótico a ter o seu genoma sequenciado.
<i>Aspergillus</i>	Algumas espécies alcançam grande importância industrial, como <i>A.niger</i> , utilizada para a produção de ácido cítrico ou de enzimas (em linhagens modificadas geneticamente).
<i>Penicillium</i>	Algumas espécies são utilizadas na indústria farmacêutica (penicilina) ou indústria de alimentos (queijos azuis, como o Roquefort e o Gorgonzola; queijo Camembert).

CAPÍTULO 4. AS ENZIMAS E OS ANTICORPOS

AS PROTEÍNAS

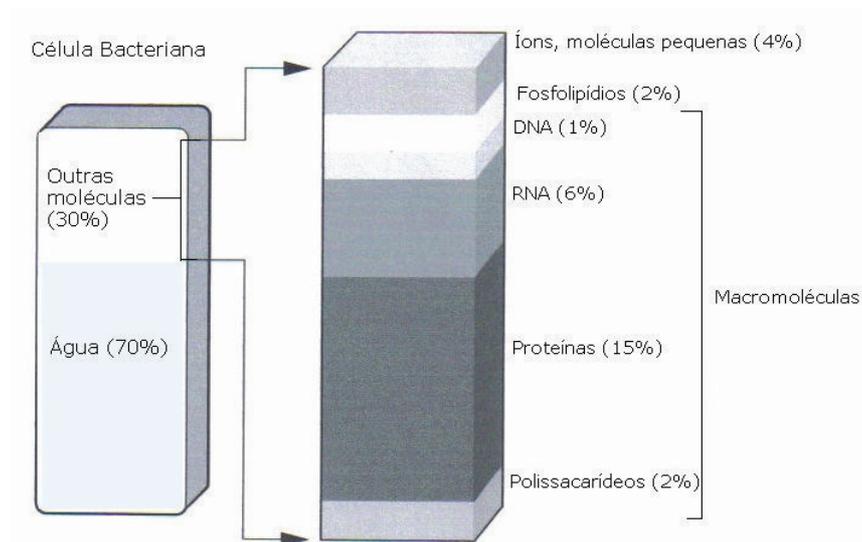
Todos os organismos estão formados por água e moléculas de diversos tipos, inorgânicas e orgânicas (Figura 4.1). Entre estas últimas, se encontra um grupo de macromoléculas, as proteínas, que participam em numerosas atividades, cumprindo um papel fundamental para os seres vivos. Pertencem a este grupo as enzimas, moléculas de ação catalítica, e os anticorpos, moléculas que participam na defesa do organismo.

Tabela 4.1: As funções das proteínas no organismo.

FUNÇÃO	EXEMPLOS
Componentes estruturais	Queratina do cabelo, colágeno da derme, actina e miosina das fibras musculares.
Substâncias de reserva	Albumina do ovo, caseína do leite.
Ação catalítica	Enzimas que controlam as reações químicas celulares.
Outras	Transmissão de informação (hormônios proteicos), participação nos mecanismos de defesa (anticorpos, citocinas), transporte e armazenamento de pequenas moléculas (hemoglobina).

Figura 4.1: A composição química de uma bactéria.

Apesar de algumas diferenças nas proporções de alguns componentes, a composição química de outros microrganismos ou das células eucariontes é comparável à de uma bactéria.



ESTRUTURA

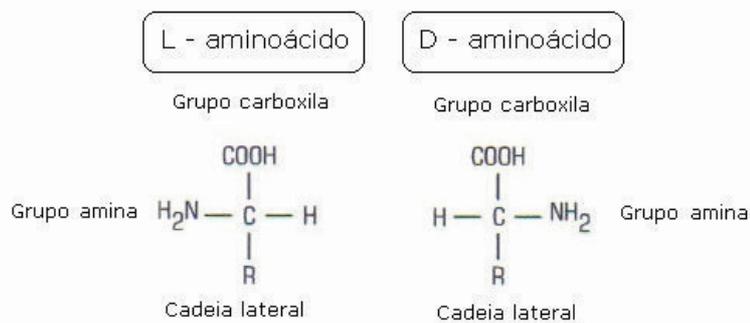
As proteínas são macromoléculas formadas por 20 aminoácidos diferentes. Estes se caracterizam por ter, unidos ao átomo de carbono, um grupo amino (básico), um grupo carboxila (ácido) e um radical variável (Figura 4.2 A). A presença de um carbono assimétrico resulta em duas formas moleculares (L) e (D) que diferem por suas propriedades ópticas. Os aminoácidos que compõem as proteínas correspondem à forma (L).

A reação de condensação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro cria uma ligação peptídica (Fig.4.2 B). A união de vários aminoácidos forma uma cadeia peptídica que se caracteriza não só pelo número e tipo de aminoácidos que a compõem, como pela sequência em que estes se encontram, denominada estrutura primária. Ao se estabelecerem ligações entre os grupos que formam os enlaces peptídicos, a cadeia adota uma estrutura regular ou estrutura secundária, geralmente em forma de hélice ou de folha. As interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos causam o dobramento da proteína, resultando uma configuração espacial que é chamada de estrutura terciária. A forma final de uma proteína dependerá ainda da associação entre vários polipeptídios, no que se denomina de estrutura quaternária (Figura 4.2 C).

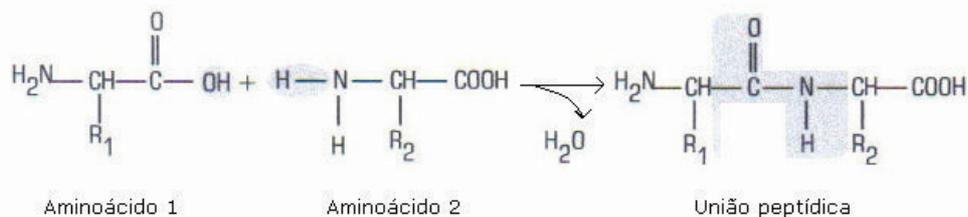
Quando sintetizada dentro da célula, uma proteína adotarà espontaneamente a configuração espacial que decorre de sua estrutura primária. Entretanto, fatores ambientais como o pH, a concentração salina ou a temperatura podem causar alterações momentâneas ou definitivas na forma da molécula.

Figura 4.2: Aminoácidos e proteínas

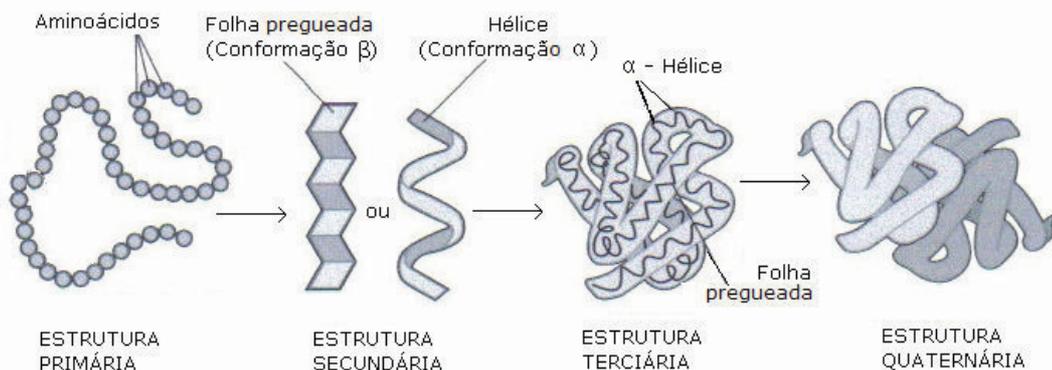
A) A fórmula dos aminoácidos



B) Formação de uma ligação peptídica



C) A estrutura de uma proteína



AS BASES DE ALGUMAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

Cromatografia

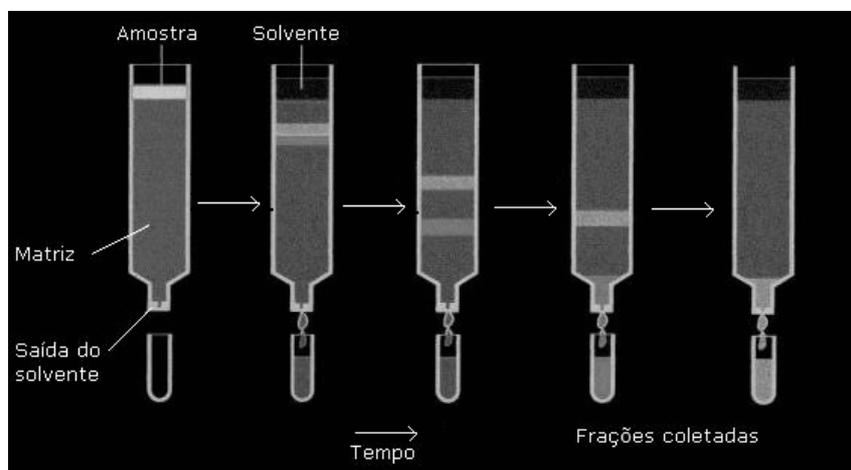
Esta técnica permite separar as substâncias de uma mistura com fins analíticos e preparativos. Está baseada na migração diferencial das moléculas de uma mistura, colocada em uma fase móvel, sobre um suporte estacionário ou matriz. Em função das características da fase estacionária, distinguem-se diferentes modalidades: cromatografia em papel, em camada delgada, cromatografia em gás, cromatografia líquida etc.

Na cromatografia em coluna, por exemplo, a separação das proteínas de uma mistura depende da estrutura da matriz, sólida e permeável, que se encontra imersa em um solvente (Figura 4.3). A separação obedece a três tipos de mecanismos:

- Troca iônica. A matriz está formada por pequenas partículas carregadas que retêm as moléculas de carga contrária. Como a associação depende de fatores como o pH e a força iônica da solução, a modificação destes fatores permite controlar a separação.
- Filtração em gel. A matriz consiste em partículas porosas que separam as proteínas em função de seu tamanho, como uma peneira molecular.
- Afinidade. As partículas da matriz estão unidas por ligações covalentes a moléculas (enzimas, anticorpos) que interagem com a proteína de interesse. Para liberar a proteína retida na coluna, muda-se o pH ou a concentração salina. Desse modo se consegue a proteína purificada.

Figura 4.3: Cromatografia em coluna

O processo está baseado na velocidade de migração diferencial das moléculas proteicas em uma matriz imersa em um solvente.



Eletroforese

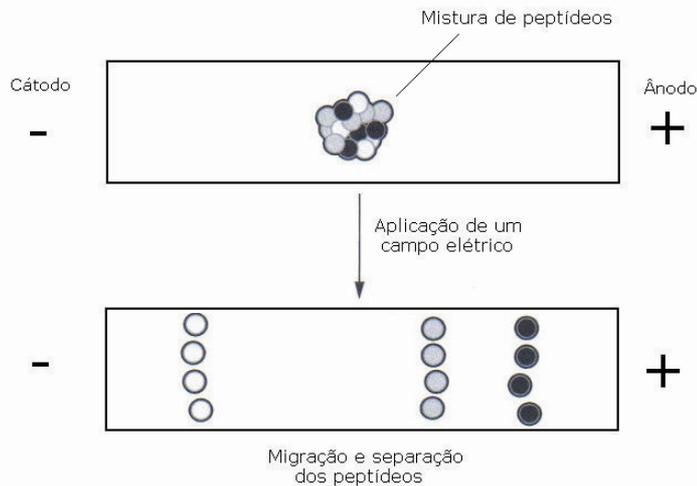
Moléculas ionizadas colocadas em um campo elétrico migram de acordo com suas cargas e pesos moleculares. Se a carga for positiva, elas migrarão para o pólo negativo ou cátodo e, inversamente, se ela for negativa, a migração ocorrerá na direção do pólo positivo ou ânodo. Este é o fundamento de outra técnica analítica, a eletroforese.

Se uma mistura de peptídeos for colocada em um campo elétrico, eles migrarão de acordo com sua carga, forma e tamanho, formando cada um deles uma banda característica que será visualizada mediante um corante ou uma reação química específica (Figura 4.4). Observe-se que a carga de um peptídeo resulta da soma das cargas correspondentes aos grupos amina e carboxila terminais e dos radicais dos aminoácidos que o compõem, e que essa carga varia com o pH do meio.

A eletroforese permite separar os componentes de uma mistura. Existem numerosas variações desta técnica em função do suporte (papel de filtro, sílica-gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido ou poliacrilamida), da disposição da cuba (horizontal ou vertical), da direção da migração (unidirecional ou bidirecional) etc.

Figura 4.4: Eletroforese

Separação dos peptídeos de uma mistura, por migração diferencial em um campo elétrico.



Espectrometria de massa

Esta técnica analítica mede a massa molecular a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas, medida que permite a identificação de uma substância. Com a descoberta de métodos de ionização adaptados às moléculas biológicas como o MALDI (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*), a espectrometria de massa se tornou nos últimos anos uma ferramenta indispensável na identificação de proteínas, açúcares, ácidos nucleicos, lipídios e outros compostos orgânicos.

Aplicada às proteínas, a espectrometria de massa identifica a molécula por comparação com outras de um banco de dados. Também fornece uma análise estrutural da molécula indicando a sequência de aminoácidos. Com esta técnica é possível estudar o conjunto de proteínas de um organismo (proteoma) e dissecar as interações das proteínas com outras moléculas. Por ser um método automatizado e rápido, tem alcançado múltiplas aplicações em farmacologia e diagnóstico.

AS ENZIMAS

A CATÁLISE ENZIMÁTICA

As reações químicas que ocorrem nos seres vivos dependem da atividade catalítica das enzimas. Estas moléculas agem diminuindo a energia de ativação necessária de uma reação química, sendo capazes de promovê-las e acelerá-las, sem ser alteradas ou destruídas.

A molécula de enzima reconhece um substrato específico, formando com ele um complexo molecular ou estado de transição. O encaixe no sítio ativo da molécula facilita a transformação do substrato no(s) produto(s) da reação. A enzima é recuperada no fim da reação, podendo atuar inúmeras vezes. O processo pode ser representado como a seguir:



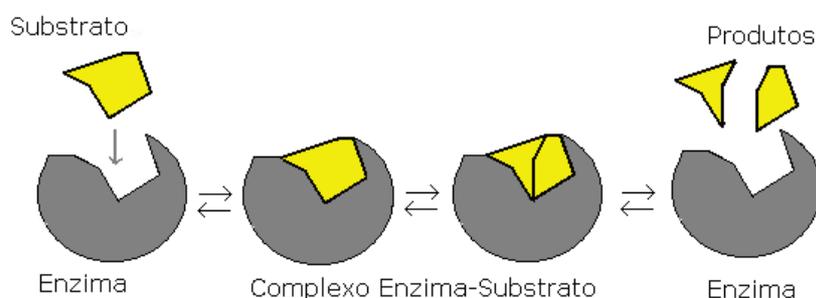
A primeira característica das enzimas é a especificidade; uma enzima como a lactase, que opera sobre a lactose, não agirá sobre a sacarose; duas enzimas que hidrolisem o amido poderão fazê-lo cortando a molécula de maneira diferente, como a α -amilase e a β -amilase. A segunda é que, em função de sua origem biológica, as enzimas são biodegradáveis e agem em condições brandas de temperatura e pH.

A ação enzimática depende do pH, da temperatura, da presença de cofatores inorgânicos (zinco, ferro, cobre) e/ou orgânicos (coenzimas, muitas das quais são vitaminas). Os metais pesados alteram a estrutura molecular da enzima de maneira irreversível impedindo sua ação catalítica (desnaturação).

Uma inibição da atividade enzimática ocorre quando moléculas muito parecidas com o substrato competem com este para ocupar o sítio ativo da enzima (inibição competitiva). Ou quando outras moléculas se ligam a determinadas partes da enzima, alterando a estrutura espacial e dificultando o encaixe com o substrato (inibição não competitiva).

Figura 4.5: O mecanismo da atividade enzimática.

A atividade enzimática não modifica o equilíbrio da reação.



OS DIVERSOS TIPOS DE ENZIMAS

Uma forma de classificar as enzimas é pelo tipo de reação que catalisam, acrescentando o sufixo "ase" ao nome do substrato que é transformado: protease, lactase, amilase, lipase, celulase. Também se pode adicionar "ase" ao nome da reação catalisada: hidrolase, oxirredutase. Quando combinadas as duas regras anteriores, se mencionam o nome do substrato e da reação catalisada adicionando "ase" como, por exemplo, em DNA-polimerase. Porém, algumas enzimas, como a renina ou a trombina, conservam seus nomes tradicionais.

Tabela 4.2: A classificação internacional das enzimas

CLASSE	TIPO DE REAÇÃO CATALISADA	EXEMPLOS
Oxirredutases	Reações onde se transferem elétrons.	Desidrogenases, oxidases.
Transferases	Reações onde se transferem grupos químicos.	Transaminases, fosforilases.
Hidrolases	Reações de hidrólise, isto é, de transferência de grupos funcionais para a água.	Proteases, carboidrases, peptidases, lipases.
Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou formação de duplas ligações por eliminação de grupos.	Decarboxilases (renina, trombina).
Isomerases	Produção de isômeros por transferência de grupos dentro de moléculas.	Isomerases, mutases.
Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação.	Sintetases.

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

As enzimas apresentam numerosas vantagens quando utilizadas como agentes biológicos em processos tecnológicos: especificidade, operação em condições facilmente controláveis e biodegradabilidade. De um modo geral, os tratamentos enzimáticos diminuem a carga poluidora dos efluentes industriais.

Das 25.000 enzimas que, segundo as estimativas, existiriam na natureza, até o momento só foram classificadas umas 2.800, sendo comercializadas 400. O mercado se distribui fundamentalmente entre as proteases (59%), as carboidrases (28%) e as lipases (3%), três grandes conjuntos de enzimas que são utilizadas por diversas indústrias; os 10% restantes do mercado correspondem às enzimas analíticas e farmacêuticas (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: As enzimas como agente biológico

ENZIMAS	Indústria de alimentos e bebidas Ex: clarificação de vinhos e sucos de frutas, substituição da maltagem pelo tratamento do amido na elaboração de cervejas, fabricação de pão, biscoitos e bolachas, produção de adoçantes, fabricação de laticínios, suplementação de rações animais.
	Produtos de limpeza Ex: detergentes e lava-roupas para a remoção de manchas difíceis, produtos para limpar dentaduras e lentes de contato.
	Indústria têxtil Ex: desengomador de tecidos, acabamento de jeans.
	Curtumes Ex: amaciamento de couros.
	Indústrias de papel e celulose Ex: branqueamento de polpa de celulose.
	Indústria farmacêutica Ex: reagentes para uso em análises clínicas, nucleases para a manipulação gênica.
	Tratamentos médicos Ex: combate de inflamações, edemas e lesões; dissolventes de coágulos sanguíneos, agentes terapêuticos em transtornos digestivos.

Nos sabões lava-roupas, as enzimas prometem ao consumidor roupas limpas e com aparência de novas. Um exército constituído por proteases, amilases e lipases digere as manchas difíceis (sangue, leite, molho de tomate, capim, chocolate, batom etc.), enquanto que as celulasas removem as microfibrilas de celulose das roupas. Não sendo mais necessário esfregar as manchas, a limpeza se realiza com pouco esforço e sem desgaste do tecido; como estas moléculas trabalham a temperaturas baixas, o consumo de energia é menor. Com mais uma vantagem para o fabricante: as enzimas não representam mais que uma fração muito pequena do sabão (0,4-0,8%), correspondente a 1% do seu custo.

As enzimas são empregadas também no acabamento de roupas. Para conseguir o aspecto usado, os jeans eram lavados com pedras (*stone washed*), um processo que tinha o inconveniente de causar a abrasão da maquinaria e o desgaste do tecido. Nos últimos anos, as pedras foram substituídas por celulasas, com resultados satisfatórios.

Os curtumes, em vez de excrementos de cachorro ou de pombo, se valem hoje de enzimas pancreáticas para amaciar e desengordurar as peles.

Na indústria de alimentos e bebidas, as enzimas participam na produção de adoçantes, de pão, biscoitos e bolachas, de queijos. Na extração de sucos de frutas, as pectinases aumentam substancialmente o rendimento do processo, ao liberar o suco retido na pectina das paredes celulares vegetais. Também facilitam a clarificação de vinhos e cervejas.

Como medicamentos, as enzimas se aplicam em vários contextos, especialmente em quimioterapia e nas terapias trombolíticas. E muitos entre os mais corriqueiros testes de diagnóstico dependem de reagentes enzimáticos.

As enzimas permitem a resolução de misturas de moléculas racêmicas, nas que há duas formas isoméricas, tipo "mão direita" e "mão esquerda", com diferente atividade biológica. Desse modo, poderão ser evitados problemas como o da talidomida, um medicamento que causou o nascimento de numerosos bebês com deformações congênitas, na década de 1960. A tragédia teria sido consequência da presença no produto comercial da forma molecular tipo "mão direita", de ação teratogênica, junto ao tipo "mão esquerda", de ação calmante.

Atualmente, estão sendo estudados métodos enzimáticos para eliminar os príons responsáveis pela denominada "doença da vaca louca". Também se cogita a utilização de enzimas para limpar áreas contaminadas com agentes químicos como o gás sarin.

OS ANTICORPOS

Dentro da estratégia de defesa de um organismo, os anticorpos são elementos importantes no reconhecimento do "eu" e na eliminação do "não eu" (antígeno). Uma parte importante da resposta imune envolve a produção de anticorpos que reconhecem o antígeno, desencadeando os mecanismos de destruição adequados.

Em condições experimentais de laboratório, a reação antígeno-anticorpo ocorre quando os reagentes se encontram em meio líquido e nas concentrações adequadas, sendo visualizada como:

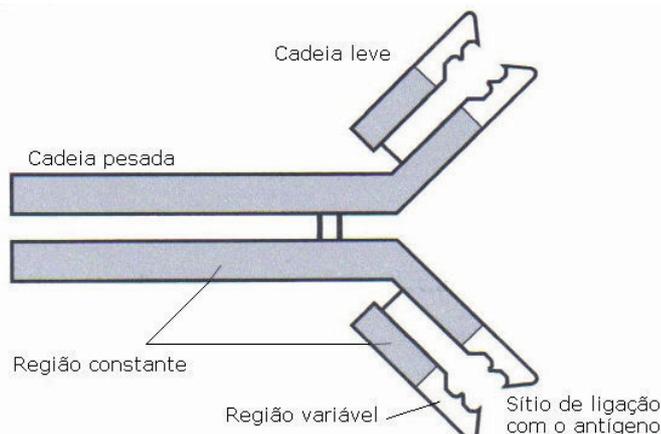
- Uma precipitação, se os antígenos estiverem dissolvidos em um meio líquido ou em um gel (poliacrilamida).
- Uma aglutinação, se os antígenos estiverem localizados sobre partículas (hemácias ou bactérias).

A MOLÉCULA DE ANTICORPO

A molécula de anticorpo denominada IgG (Imunoglobulina G) é formada por duas cadeias polipeptídicas leves e duas pesadas em forma de Y, ao qual se associa um pequeno número de grupos carboidrato. Uma parte da molécula é constante; as regiões variáveis localizadas nas extremidades dos braços do Y respondem pelo reconhecimento do antígeno (Figura 4.6).

Este tipo de anticorpo se encontra no soro sanguíneo, na fração proteica caracterizada por eletroforese como γ -globulina.

Figura 4.6: A estrutura da molécula de anticorpo (IgG).

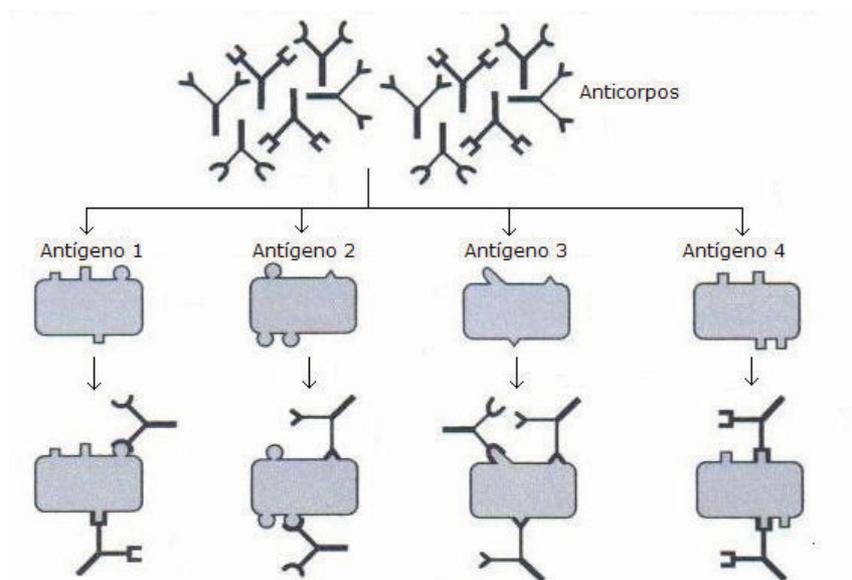


A UNIÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

A união antígeno-anticorpo ocorre quando um anticorpo encontra no antígeno uma forma complementar, geralmente parte de uma molécula livre ou ancorada na membrana celular. Um antígeno pode ter várias destas formas (epítomos ou determinantes antigênicos) e ser reconhecido por anticorpos diferentes (Figura 4.7).

Figura 4.7: Os anticorpos e o reconhecimento do antígeno.

Observe-se que, ao compartilhar estruturas (determinantes antigênicos ou epítomos), alguns antígenos podem ser reconhecidos por um mesmo anticorpo, dando origem a uma reação cruzada.



A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NO ORGANISMO

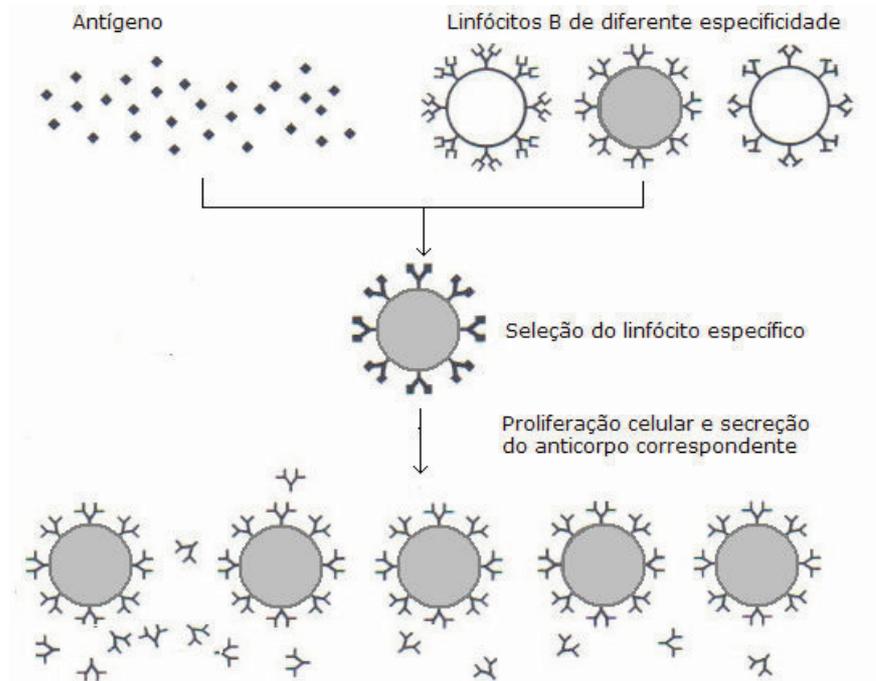
As células responsáveis pela produção de anticorpos são os linfócitos B, que se formam na medula óssea. Depois de um processo de diferenciação que envolve uma série de rearranjos genéticos, cada linfócito pode reconhecer um único epítopo (Figura 4.8).

Ao encontrar o epítopo específico, o linfócito B prolifera, originando um clone de células secretoras de anticorpos

Uma vez eliminado o antígeno, algumas células desse clone permanecerão no organismo como células-memória. Em um contato posterior com o mesmo epítopo, as células-memória darão início à resposta imune, que será mais rápida e mais intensa que a primeira.

Apesar de cada linfócito ser capaz de reconhecer um único epítopo, todos os linfócitos podem reconhecer aproximadamente 10^8 epítomos diferentes, o que explica a eficiência da resposta imune.

Figura 4.8: O encontro do linfócito B e do antígeno, e a seleção clonal.



A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NO LABORATÓRIO

Os anticorpos ocupam um lugar de destaque nos testes de diagnóstico clínico, por reunir duas propriedades que os transformam em uma ferramenta ideal: especificidade e diversidade.

Ao injetar animais (ratos, ovelhas, coelhos) com um antígeno, se induz em pouco tempo uma resposta imune. Esta envolve a produção de anticorpos contra o antígeno, sendo possível separá-los do soro sanguíneo do animal.

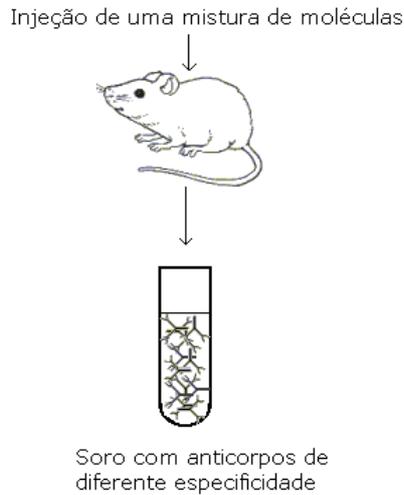
Se o antígeno utilizado possuir vários epítopos, no soro extraído se encontrará uma mistura de anticorpos, chamados "policlonais". Estes resultam da ativação de vários clones de linfócitos B, cada um dos quais reconhece um dos epítopos do antígeno. Observe-se que o soro também terá anticorpos contra eventuais impurezas do antígeno, assim como anticorpos contra outros antígenos aos que o animal esteve exposto anteriormente. A purificação de um soro é um processo longo e complexo, que deverá ser repetido a cada extração de sangue do animal. Apesar destes problemas, reagentes de laboratório deste tipo foram utilizados normalmente até a década de 1980.

Não é possível cultivar separadamente os linfócitos porque estes sobrevivem pouco tempo *in vitro*. A obtenção de clones que sintetizem anticorpos específicos contra um único epítipo, isto é "monoclonais", só se tornou possível com o desenvolvimento da tecnologia de hibridomas (Kohler, Milstein, 1975).

Um hibridoma resulta da fusão entre um linfócito B e uma célula cancerosa de mieloma. Reunindo as propriedades de ambas as células, cada hibridoma é capaz de sintetizar um único tipo de anticorpo (monoclonal) e de se multiplicar indefinidamente no laboratório, seja em cultivo de tecidos, seja na cavidade do peritoneu de um animal hospedeiro (Figura 4.9).

Figura 4.9: A produção de anticorpos no laboratório

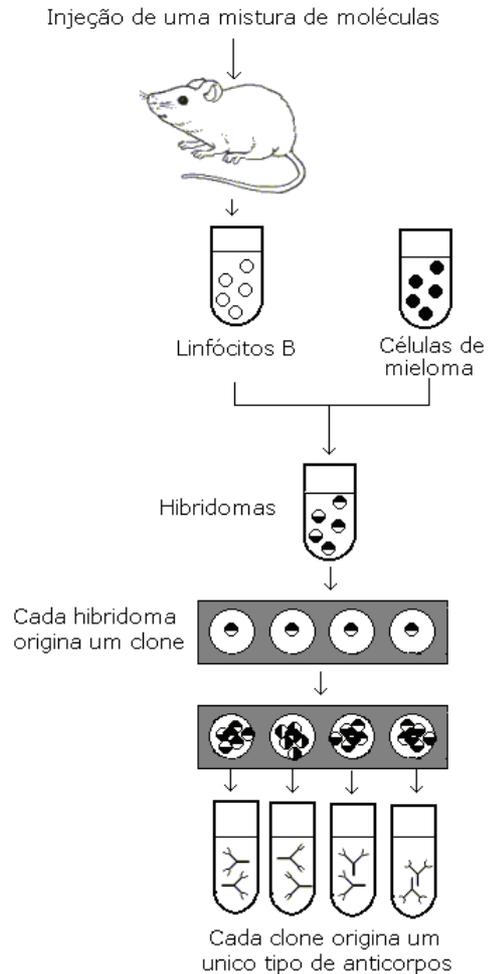
A. Obtenção de anticorpos policlonais



4.9.A: A produção de anticorpos policlonais. Recolhe-se o soro de um animal imunizado contra uma mistura de moléculas entre as quais está a molécula X. No soro se encontrarão misturados anticorpos de diferente especificidade, um dos quais reconhece X.

4.9.B: A produção de anticorpos monoclonais. Injeta-se em um rato a mesma mistura de moléculas; dias mais tarde, extrai-se o baço do animal e fusionam-se os linfócitos B (alguns dos quais reconhecem a molécula X) com células de mieloma. Os híbridos são separados, cultivados e testados para identificar os que produzem anticorpos contra X.

B. Obtenção de anticorpos monoclonais



A UTILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS

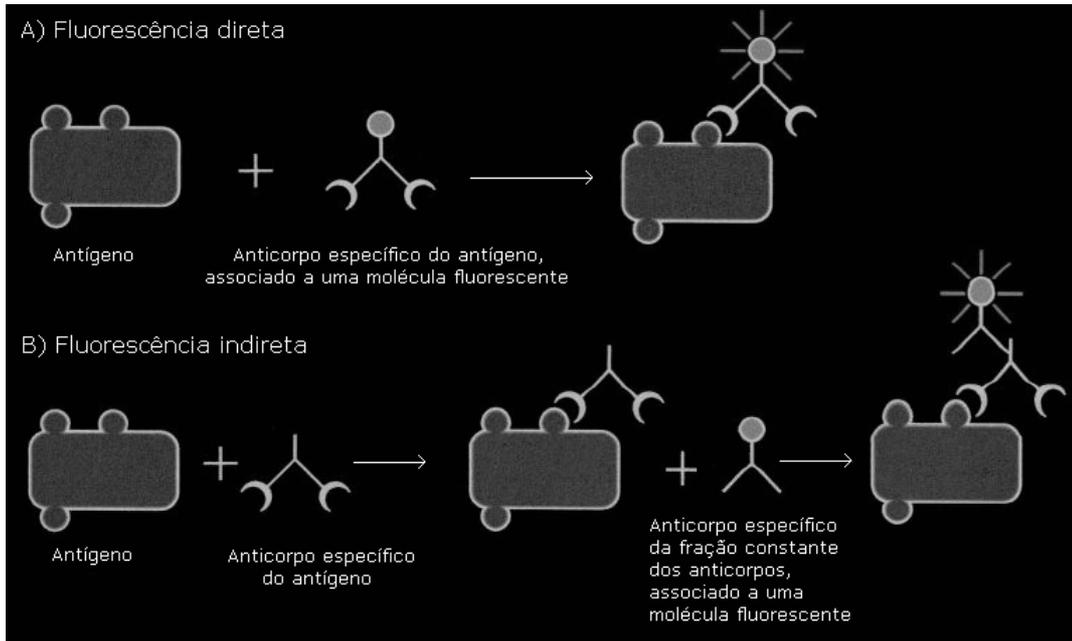
Os anticorpos monoclonais encontraram imediatamente aplicações, substituindo praticamente os anticorpos policlonais, tanto na purificação de biomoléculas e células como nos testes de diagnóstico clínico ou ambiental ou no controle de qualidade dos alimentos.

Anticorpos específicos fixados nas partículas de uma coluna de afinidade permitem separar moléculas de uma mistura que circule por ela. Outra utilização extremamente engenhosa está na separação de populações celulares em um aparelho denominado *cell sorter*. As células são marcadas com anticorpos ligados a uma molécula fluorescente; ao passar através de raios *laser*, adquirem cargas elétricas, sendo separadas mediante uma placa defletora do equipamento.

A visualização da reação entre o antígeno e o anticorpo se vê facilitada quando estes últimos recebem alguma marcação. Em cortes histológicos, o antígeno é localizado pelos anticorpos acoplados a uma molécula fluorescente que possa ser identificada microscopicamente (Figura 4.10). Associados a uma molécula radiativa, os anticorpos são utilizados na dosagem de substâncias presentes nos fluidos corporais, sendo quantificada a radioatividade por exposição de uma placa sensível.

Figura 4.10: Ensaios imunofluorescentes

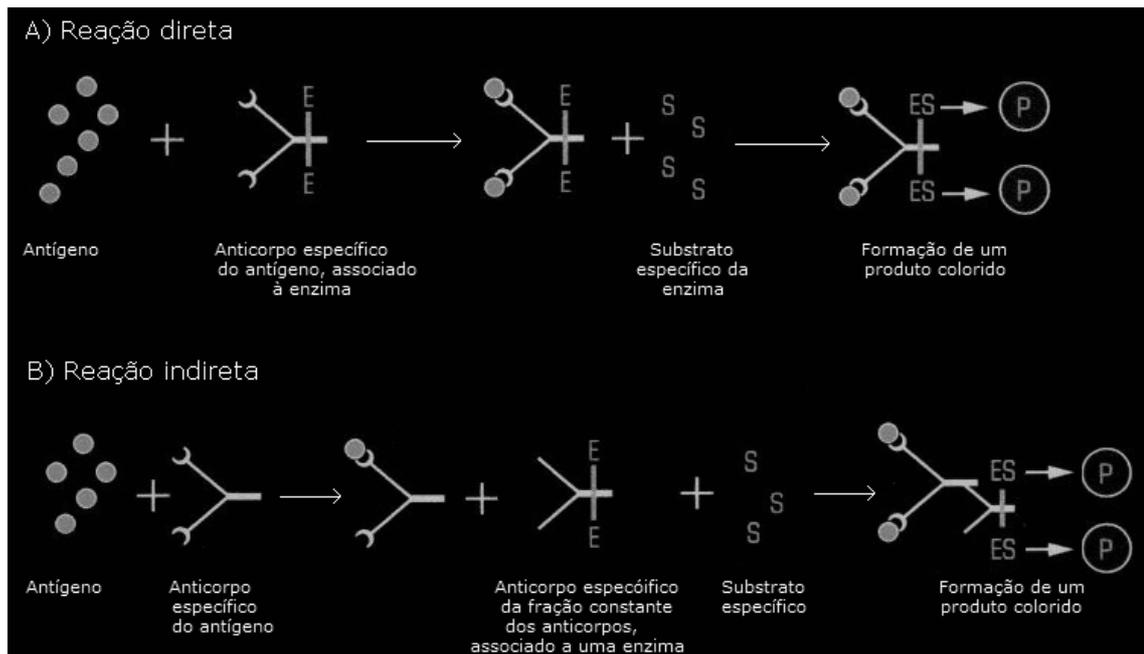
O anticorpo marcado pode reconhecer diretamente o antígeno (reação direta) ou reconhecer o anticorpo unido ao antígeno (reação indireta).



A obtenção de anticorpos contra a fração constante da molécula de anticorpos humanos representa um avanço considerável na produção de reagentes para o diagnóstico clínico. Nos ensaios imunoenzimáticos, utilizam-se estes anticorpos acoplados a uma enzima que reage com o seu substrato, formando um produto colorido (Figura 4.11).

Figura 4.11: Ensaios imunoenzimáticos.

O antígeno pode ser reconhecido por um anticorpo associado a uma enzima que reage com o seu substrato, formando um produto colorido (reação direta). Também pode ser reconhecido por um anticorpo específico, e este por um anticorpo que reconhece a fração constante do anticorpo. O segundo anticorpo se associa a uma enzima que, ao reagir com o seu substrato específico, forma um produto colorido (reação indireta).



A utilização de anticorpos monoclonais com fins terapêuticos demorou muito mais que o esperado. Sendo produzidos por células de camundongo ou de rato, eles são reconhecidos como estranhos quando injetados no homem, formando-se complexos imunes que lesionam gravemente os rins.

A fim de evitar essas reações, começaram a serem elaborados anticorpos monoclonais quiméricos (33% de proteína animal) e humanizados (10% de proteína animal). Estes conservam parte das sequências animais, especialmente nas partes que reconhecem o antígeno, sendo o restante da molécula substituído por sequências humanas.

Ultimamente, com a obtenção de anticorpos monoclonais humanos mediante técnicas de engenharia genética, se abriram novos caminhos para o diagnóstico e o tratamento de doenças (Figura 4.12).

Figura 4.12: Os anticorpos como agentes biológicos

ANTICORPOS	Purificação de moléculas
	Reagentes de laboratório
	Reagentes para diagnóstico
	Imunoterapias

CAPÍTULO 5. OS ÁCIDOS NUCLEICOS E OS GENES

OS ÁCIDOS NUCLEICOS

Embora descobertos em 1869, por Miescher, no pus das bandagens de ferimentos, o papel dos ácidos nucleicos na hereditariedade e no controle da atividade celular começou a ser esclarecido apenas em meados do século XX.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) carrega em sua estrutura as instruções necessárias para a construção de um organismo. Estas direcionam o desenvolvimento de suas características bioquímicas, fisiológicas, anatômicas e inclusive de algumas das comportamentais.

Nas células procarióticas, uma molécula grande e circular de DNA forma o cromossomo, havendo também uma ou duas moléculas de DNA extracromossômico, formando estruturas circulares, denominadas plasmídeos.

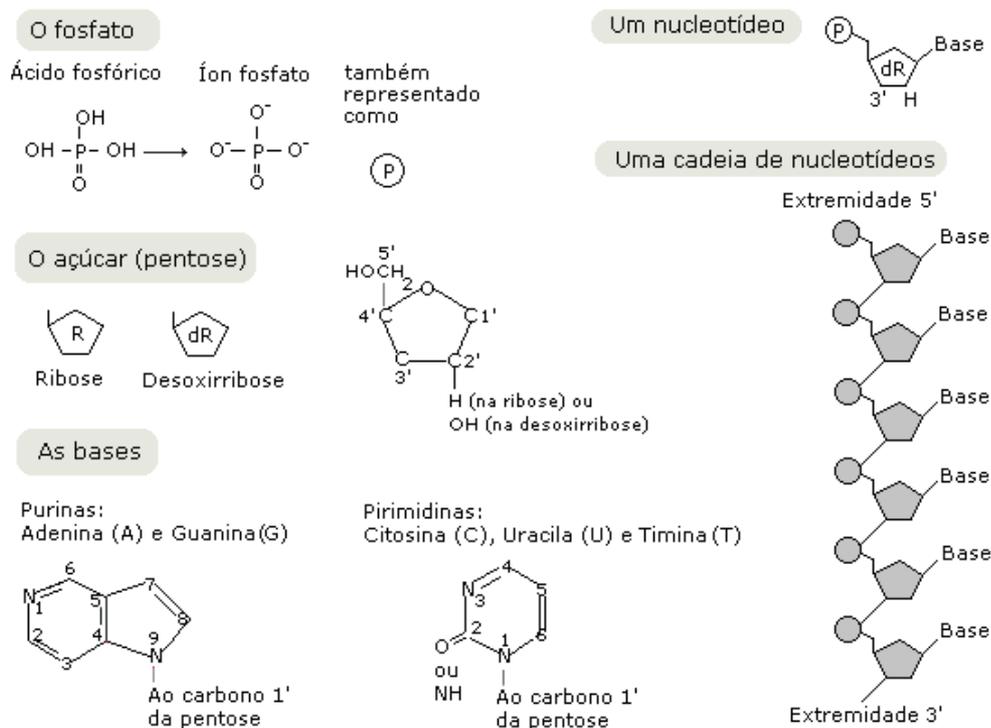
Nas células eucarióticas, várias moléculas lineares de DNA associadas a proteínas formam os cromossomos, localizados dentro do núcleo celular. Também há DNA em algumas organelas, como os cloroplastos e as mitocôndrias. O ácido ribonucleico (RNA) se encontra no núcleo e no citoplasma celular.

Do ponto de vista químico, os ácidos nucleicos (ácido ribonucleico e desoxirribonucleico) são macromoléculas formadas a partir de unidades chamadas nucleotídeos. Um nucleotídeo resulta da associação mediante ligações químicas covalentes de três tipos de elementos: uma molécula de ácido fosfórico, um açúcar de cinco carbonos (pentose: ribose ou desoxirribose) e uma base cíclica nitrogenada: adenina, citosina, guanina, timina ou uracila.

Da união dos nucleotídeos mediante uniões covalentes entre as extremidades 5' e 3', formam-se cadeias (Figura 5.1).

Figura 5.1: A composição dos ácidos nucleicos.

Observe-se a posição dos grupos 3' e 5' no açúcar.



O CÓDIGO GENÉTICO

A autoduplicação do DNA permite que cada célula receba uma cópia do material genético, com as instruções necessárias para a construção e funcionamento do indivíduo.

O funcionamento de uma célula depende, fundamentalmente, de dois tipos de moléculas: os ácidos nucleicos e as proteínas. Ambos estão relacionados, sendo que a estrutura primária de um polipeptídeo é codificada por um gene, isto é, um segmento de DNA. O código é simples, correspondendo um aminoácido a cada trinca de bases.

A tabela a seguir nos mostra quais os aminoácidos correspondentes aos diferentes códons ou trincas de bases do mRNA. Alguns são codificados por uma única trinca, como o triptófano (UGG) ou a metionina (AUG); outros admitem vários códons que geram sinonímia como, por exemplo, a prolina (CCU, CCC, CCA, CCG). O início da sequência é sinalizado por AUG, o códon correspondente a metionina, sendo este aminoácido removido posteriormente; o fim da sequência é sinalizado por UAA, UAG ou UGA, três códons que significam *stop*.

Tabela 5.1: O código genético

Primeira Base	Segunda Base				Terceira Base
	Uracila (C)	Citosina (C)	Adenina (A)	Guanina (G)	
Uracila (U)	Phe	Ser	Tyr	Cys	(U)
	Phe	Ser	Tyr	Cys	(C)
	Leu	Ser	stop	Stop	(A)
	Leu	Ser	stop	Trp	(G)
Citosina (C)	Leu	Pro	His	Arg	(U)
	Leu	Pro	His	Arg	(C)
	Leu	Pro	Gln	Arg	(A)
	Leu	Pro	Gln	Arg	(G)
Adenina (A)	Ile	Thr	Asn	Ser	(U)
	Ile	Thr	Asn	Ser	(C)
	Ile	Thr	Lys	Arg	(A)
	Met	Thr	Lys	Arg	(G)
Guanina (G)	Val	Ala	Asp	Gly	(U)
	Val	Ala	Asp	Gly	(C)
	Val	Ala	Glu	Gly	(A)
	Val	Ala	Glu	Gly	(G)

Abreviaturas: Asp = Ácido Aspártico; Glu = Ácido Glutâmico; Ala = Alanina; Arg = Arginina; Asn = Asparagina; Cys = Cisteína; Phe = Fenilalanina; Gly = Glicina; Gln = Glutamina; His = Histidina; Ile = Isoleucina; Leu = Leucina; Lys = Lisina; Met = Metionina; Pro = Prolina; Ser = Serina; Tyr = Tirosina; Thr = Treonina; Trp = Triptófano; Val = Valina.

Mudanças na sequência de bases do DNA podem ter como consequência a substituição de um aminoácido por outro. No exemplo da figura 5.3, se GUG for substituído por CGU, no peptídeo correspondente a valina será substituído por leucina. Mas, em função da sinonímia do código, se a trinca GUG for substituída por GUA ou GUC, o aminoácido codificado continuará sendo a valina. Perdas ou adições de uma base modificam o resto da sequência do peptídeo.

As pequenas mudanças ou mutações de ponto se devem a erros na duplicação do DNA; sua frequência aumenta em presença de alguns agentes químicos e físicos como a luz UV e os raios X.

A AÇÃO GÊNICA

A informação codificada no DNA é transcrita em uma molécula mensageira que a leva até os ribossomos, onde as indicações serão traduzidas da linguagem dos ácidos nucleicos à linguagem das proteínas, sendo montado o peptídeo correspondente. Deste modo, se estabelece na célula um fluxo da informação genética que segue em uma direção única: do DNA ao RNA, do RNA ao peptídeo (Figura 5.3).

Uma exceção a esta regra é a dos retrovírus, cujo material hereditário é RNA e que contam com uma enzima (transcriptase reversa) que lhes permite transcrever a informação no sentido RNA→DNA.

Na síntese de proteínas intervêm, basicamente, três tipos de RNA: mRNA, rRNA e tRNA.

O ácido ribonucleico mensageiro, ou mRNA, é de tamanho variável e filamento único. A molécula de mRNA leva até os ribossomos a informação genética transcrita em trincas de bases (códon) complementares a algum segmento de uma das cadeias do DNA.

Associado a proteínas, o ácido ribonucleico ribossômico ou rRNA forma as duas subunidades dos ribossomos, que são as estruturas celulares onde ocorre a síntese proteica.

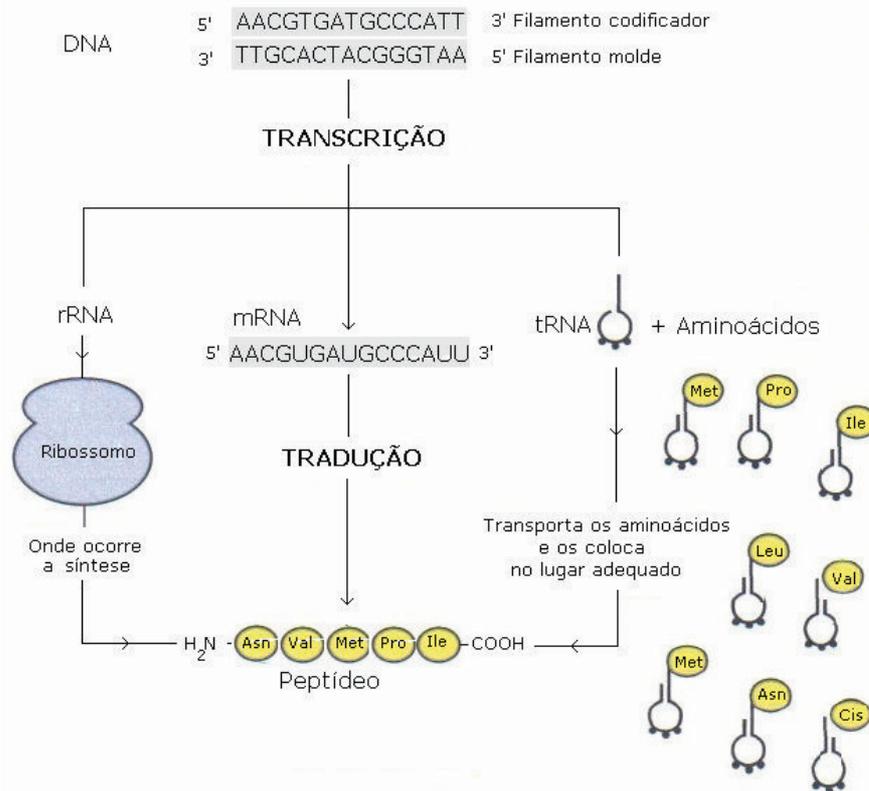
O ácido ribonucleico de transferência tRNA é capaz de reconhecer simultaneamente um aminoácido e um códon de mRNA. Existem 61 tipos moleculares diferentes de tRNA.

Observe-se que, além dos genes codificadores de proteínas, existem também genes codificadores de rRNA e tRNA, ácidos ribonucleicos que não são transformados em proteínas.

Existem outros tipos de RNAs (pequenos RNA nucleares, RNAs nucleolares e microRNAs etc.) que cumprem diversas funções na atividade celular.

Figura 5.3: O fluxo da informação genética

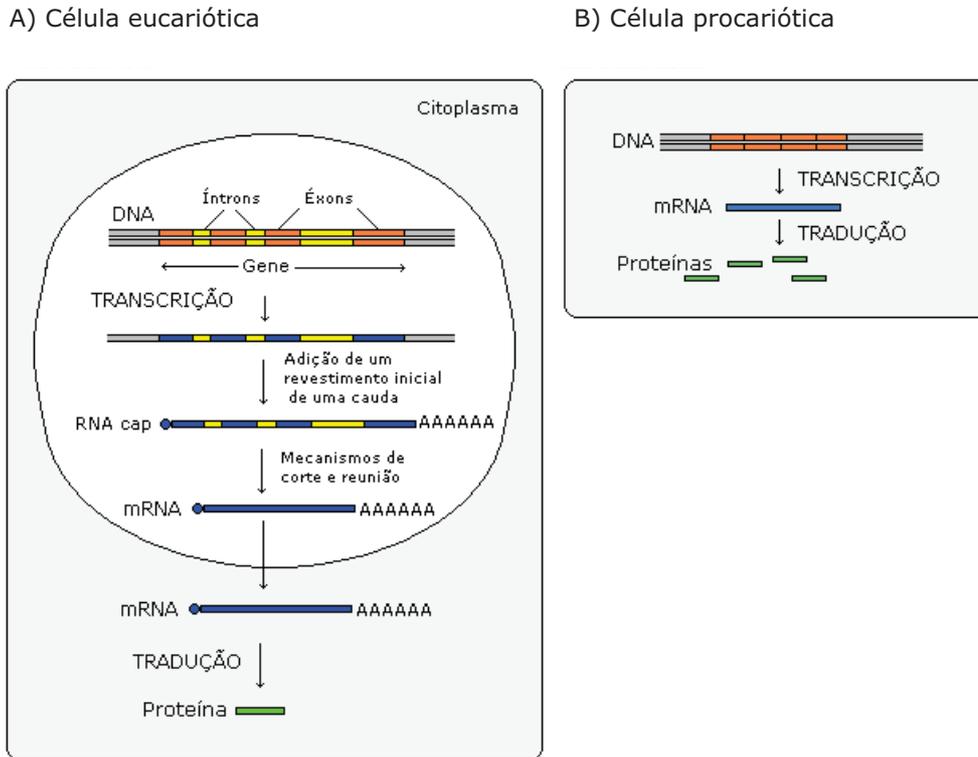
Segundo o Dogma Central da Biologia Molecular, a informação genética codificada no DNA é transcrita no mRNA e traduzida no ribossomo com a participação dos tRNAs. O produto final é um peptídeo.



A REGULAÇÃO DA AÇÃO GÊNICA

Mecanismos diversos de regulação agem em cada uma das etapas da síntese proteica. O processo apresenta algumas diferenças em células procarióticas e eucarióticas (Figura 5.4). Diversos mecanismos regulam cada etapa.

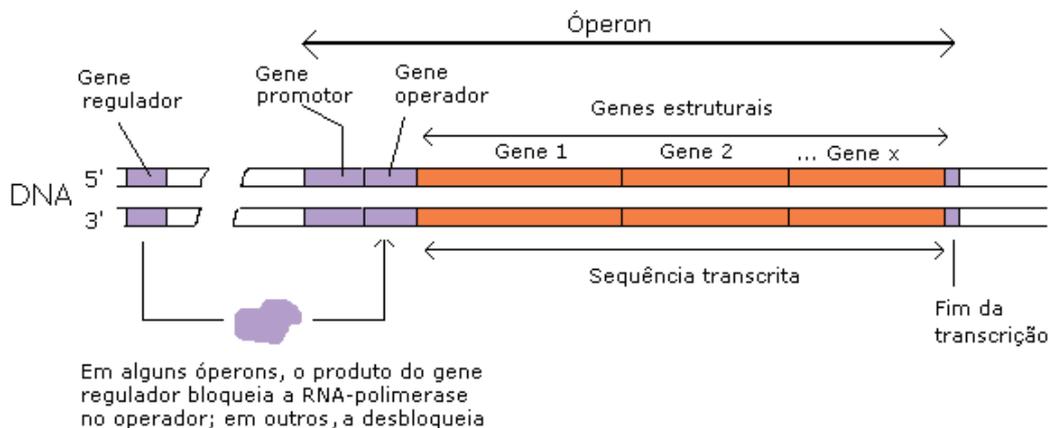
Figura 5.4: A síntese de proteínas em células procarióticas e eucarióticas



CÉLULAS PROCARIÓTICAS

Uma bactéria pode contar com aproximadamente 2.500 genes; nem todos funcionando simultaneamente. Se houver lactose no meio (e faltar glicose), as bactérias sintetizarão aquelas enzimas que possibilitem sua utilização. E se faltar o aminoácido triptófano no meio, produzirão os vários tipos de enzimas necessárias para sintetizá-lo. Isto se vê facilitado pela agrupação dos genes correspondentes em baterias (óperons), que são ligadas ou desligadas em conjunto (Figura 5.4).

Figura 5.4: A organização e regulação dos genes nas células procarióticas.



Neste processo de "ligar e desligar" estão envolvidas três regiões anteriores à sequência codificadora: o promotor, o operador e o regulador. A enzima RNA-polimerase encaixa no promotor, desde onde começará a se deslocar ao longo do gene. Proteínas sintetizadas pelo gene regulador agem no operador, abrindo ou bloqueando a passagem da RNA-polimerase. Este mecanismo possibilita a indução ou repressão da transcrição da sequência codificadora (Figura 5.5).

A organização dos genes de uma mesma via metabólica em óperons permite que a célula se adapte rapidamente às condições ambientais, com certa economia de recursos. O funcionamento do óperon depende da função exercida pelos genes (degradação ou síntese). Por isso, a presença de lactose induz a transcrição do óperon lac, sendo sintetizadas várias enzimas necessárias para degradá-la; em ausência de lactose, o óperon deixa de funcionar. Já no óperon Trp, a presença de triptófano reprime a transcrição das enzimas necessárias para sintetizar esse aminoácido.

Na célula procariótica, além dos genes funcionarem em bloco, a síntese proteica começa quando o mRNA está ainda sendo transcrito, de maneira que a transcrição e a tradução são simultâneas.

CÉLULAS EUCARIÓTICAS

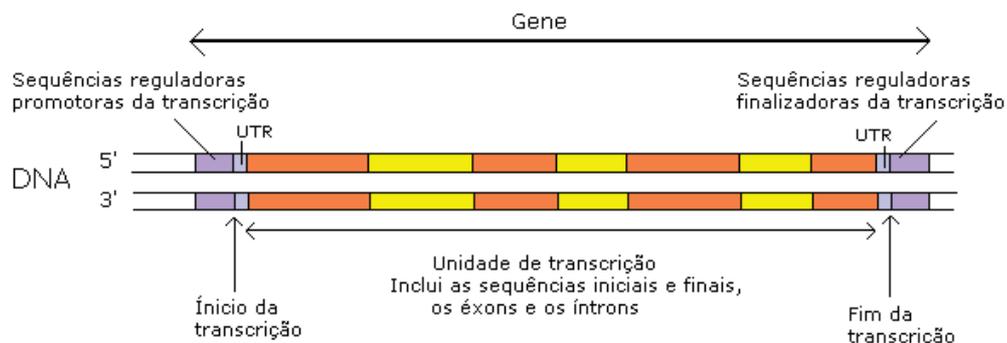
A transcrição

As bactérias não são as únicas que ligam e desligam os seus genes. Uma célula humana com 30.000 a 35.000 genes não expressa mais que 3 a 5% destes, que não serão necessariamente os mesmos ao longo da vida embrionária ou em diferentes tipos celulares. Entretanto, salvo em nematódeos, não foram achados óperons nas células eucarióticas; os genes responsáveis por uma sequência de reações metabólicas se encontram dispersos em um ou em vários cromossomos.

O controle da transcrição começa na compactação do cromossomo e na metilação de algumas bases que podem dificultar o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA. Esta inclui fatores de ativação, fatores de transcrição e proteínas reguladoras, algumas das quais dependem de outras sequências, estimuladoras e inibidoras, distantes do gene em até vários milhares de bases (Figura 5.5). As sequências reguladoras iniciais determinam quando, por quanto tempo e em que células o gene será transcrito.

Figura 5.5: A organização e regulação dos genes nas células eucarióticas

Regiões denominadas UTR (do inglês *untranslated regions*), portadoras de sequências sinalizadoras que não serão traduzidas, se localizam a montante e a jusante da unidade de transcrição.



Ao reconhecer a presença desses fatores e proteínas reguladoras na região anterior ao gene, a RNA-polimerase encaixa nas sequências promotoras da transcrição. Associada a outros fatores adicionais, a enzima se desloca abrindo a dupla hélice e transcrevendo a sequência codificadora de um ou outro filamento no RNA. A enzima avança na direção 5' - 3', sendo que várias moléculas de RNA-polimerase podem estar transcrevendo o mesmo gene simultaneamente em algo parecido com uma fila indiana.

A síntese acaba quando a RNA-polimerase encontra uma sequência finalizadora. Uma vez cumprida sua tarefa, a molécula de RNA-polimerase será liberada. As sequências reguladoras terminais indicam qual será a duração média de vida da molécula.

O processamento do RNA transcrito

Nos organismos eucarióticos, a estrutura do gene é fragmentada (Figura 5.4). A sequência gênica é transcrita por inteiro no RNA e, posteriormente, um mecanismo de "corte e reunião" irá eliminar algumas das sequências intercalares. Estas permanecerão no núcleo (íntrons) em quanto que as restantes (éxons) formarão o RNA mensageiro que sairá do núcleo na direção do citoplasma. Tanto o número como a extensão das sequências intercalares varia em diferentes genes.

As consequências biológicas deste mecanismo são importantes. Proteínas sintetizadas utilizando as vias alternativas de "corte e reunião" permitem que um único gene se expresse de maneira diferente em diversos tecidos.

O corte e reunião dos fragmentos não é a única modificação do RNA transcrito; este recebe um revestimento inicial ou *cap* (7-metilguanossina) que o dirigirá ao ribossomo, e uma cauda de poli(A) que lhe dará estabilidade na sua viagem até a maquinaria de tradução.

A tradução e o destino das proteínas

A síntese proteica se inicia depois do mRNA atravessar a membrana nuclear e migrar para o citoplasma. Assim como a transcrição, a tradução envolve a participação de numerosas enzimas e proteínas reguladoras.

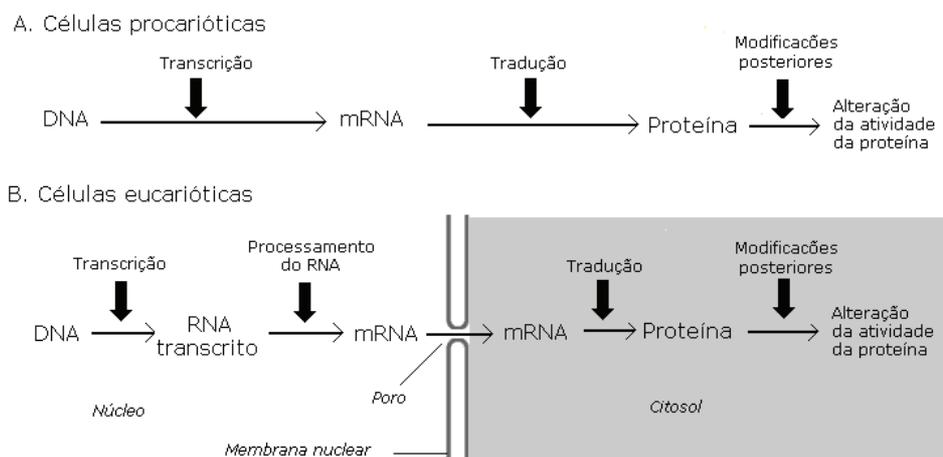
Algumas moléculas de mRNA levam sequências sinalizadoras que as dirigem até os ribossomos associados ao retículo endoplasmático, sendo as proteínas sintetizadas secretadas fora da célula. Outras moléculas de mRNA serão traduzidas nos ribossomos livres no citosol, sendo as proteínas resultantes utilizadas no mesmo lugar ou nas organelas celulares.

O mRNA reconhece o ribossomo mediante uma sequência específica; a associação entre ambos dá início à síntese peptídica. Cada tRNA carrega o aminoácido que lhe corresponde até a cadeia peptídica. A complementaridade entre um dos códons do mRNA e o anticódon do tRNA garante que este coloque o aminoácido no lugar adequado na sequência.

Existem vários mecanismos de regulação envolvendo a ação de proteínas associadas ao complexo ribossômico, variações na vida média do mRNA e inclusive a tradução do mRNA por vários ribossomos ao mesmo tempo. O peptídeo sintetizado passará por diversas modificações e associações, até se constituir no produto final ativo, uma proteína com uma estrutura quaternária determinada.

A Figura 5.6 resume as diferentes etapas da síntese de proteínas em células procarióticas e eucarióticas.

Figura 5.6: As etapas da síntese de proteínas em células procarióticas e eucarióticas



A GENÔMICA

O GENOMA HUMANO

O termo genoma designa o conjunto completo de cromossomos haploides que contém toda a informação genética de um indivíduo. O genoma da espécie humana está representado em 24 cromossomos diferentes (22 autossômicos, X e Y) em cada um dos quais há uma molécula de DNA.

Em 1990, teve início o Projeto Genoma Humano (HGP, do inglês *Human Genome Project*), um dos projetos científicos mais ambiciosos já realizados, envolvendo pesquisadores de mais de 18 países na tarefa de mapear e sequenciar o DNA humano e também o de outros organismos.

Em Junho do ano 2000, o *International Human Genome Sequencing Consortium* e a *Celera Genomics*, uma empresa privada norte-americana, anunciaram simultaneamente ter completado o rascunho do genoma humano. Os resultados foram publicados em fevereiro de 2001, nas revistas *Nature* e *Science*.

Em abril de 2003, cinquenta anos depois da descoberta da dupla hélice, o Consórcio anunciou ter completado 99% do mapeamento. Os seus resultados estão armazenados em bancos de dados públicos que podem ser acessados via Internet.

Entre as principais conclusões:

- O número de bases no genoma humano chega a 3,2 bilhões, e o número de genes a um valor compreendido entre 30.000 e 40.000; só 2% do genoma codificaria proteínas.
- O número de genes em organismos como a mosca *Drosophila melanogaster* ou o verme *Caenorhabditis elegans* é três vezes menor. Compartilhamos com estes organismos alguns genes e contamos com outros que são característicos dos vertebrados como, por exemplo, vários dos genes referentes ao sistema imune.
- A densidade dos genes em diversos cromossomos e em diferentes partes deles varia. Existem grandes espaços entre os genes, às vezes chamados de DNA-lixo. Sequências repetidas, não codificadoras, cuja função direta ainda não é bem conhecida, ocupam pelo menos 50% do genoma.
- O tamanho dos genes é variável, sendo na média de 3.000 bases. Na realidade, o tamanho não parece ter muita importância. Como boa parte dos genes poderia ser lida de diversos modos, o número de proteínas poderia ser bem maior.
- Independentemente de nossa origem étnica, compartilhamos com os outros seres humanos 99,9% da sequência gênica.
- As diferenças entre os seres humanos se devem a variações de uma base em 3.000.000 de pontos dentro e fora dos genes. Estas variações se denominam polimorfismos de um nucleotídeo único ou SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*). Os SNPs podem dar informações sobre a base genética da susceptibilidade a uma série de doenças ou servir como marcadores das mesmas (doença cardiovascular, diabetes, artrite e cânceres).
- Em vários genes foram encontradas sequências associadas a doenças (câncer de mama, cegueira, surdez, doenças musculares).

Os laboratórios de sequenciamento modernos estão altamente automatizados, sendo que muito do trabalho é feito por robôs e computadores. Uma quantidade enorme da informação obtida se encontra na Internet, armazenada em grandes bancos de dados.

O desenvolvimento da Bioinformática, um conjunto de novas tecnologias que utiliza métodos computacionais e matemáticos para analisar as informações, tem sido fundamental para o progresso dos estudos sobre os genomas. Muitos dos estudos atuais não são mais feitos *in vivo* nem *in vitro*, mas *in silico*.

A Genômica surge como uma nova disciplina que tenta responder a algumas questões fundamentais: Onde estão os genes? O que faz cada gene? Como diferem os organismos em relação a seus genes? Cada uma dessas perguntas a subdivide em especialidades como a Genômica estrutural, a Genômica funcional ou a Genômica comparativa.

Paralelamente, se definem outras áreas de estudo, tais como:

- A transcriptômica, concernente ao RNA transcrito ou transcriptoma, isto é, aos padrões de expressão gênica.
- A proteômica, referente ao conjunto de proteínas da célula ou proteoma, que varia ao se diferenciarem as células e em resposta a estímulos ambientais.
- A metabolômica, relativa ao conjunto de substratos e subprodutos de reações enzimáticas que incidem no fenótipo celular.

A genômica tem aplicações imediatas no campo médico e farmacológico, através dos testes genéticos e dos novos medicamentos (Tabela 5.2). Estima-se que, entre os 30.000 a 40.000 genes humanos recentemente descobertos, 5.000 a 10.000 poderiam ser o alvo de novos produtos farmacológicos. Se forem consideradas as proteínas, o número de alvos pode ser multiplicado por dez.

Paralelamente ao mapeamento do genoma humano, mais de 900 outros organismos foram sequenciados (microrganismos, plantas, animais). Em 2009, os mais de 4.500 projetos em andamento abrangem organismos eucariontes (22%), bactérias (53%), arqueas (22%) e metagenomas (3%). Em curto ou médio prazo, esta informação reverte também no desenvolvimento da agricultura, da pecuária e da indústria química.

Tabela 5.2: O DNA como agente biológico.

DNA e GENÔMICA	Identificação de microrganismos patogênicos
	Controle da qualidade dos alimentos
	Medicina molecular Ex: Diagnósticos, tratamentos personalizados, terapias gênicas.
	Testes genéticos Ex: Diagnósticos, avaliação dos riscos de saúde.
	Agronomia e pecuária Ex: Métodos seletivos mais eficientes.
	Indústria farmacológica Ex: Novos medicamentos (proteínas terapêuticas), vacinas recombinantes e de DNA.
	Prática forense Ex: Identificação das pessoas.
	Estudos antropológicos e evolutivos

A GENÔMICA BRASILEIRA

Vários países de América Latina contam com projetos em andamento (Argentina, Brasil, Chile e México). De um modo geral, estes envolvem parcerias entre instituições públicas e privadas, sendo beneficiados por acordos internacionais com países desenvolvidos (Estados Unidos, França, Alemanha) ou por redes de cooperação inter-regionais (Brasil, Argentina, Chile, Uruguai e Paraguai).

Pioneiro na ciência genômica, o Brasil alcança resultados significativos em diversas áreas, tais como:

- Saúde humana: Sequenciamento de *Schistosoma mansoni* (um protozoário causador da esquistossomose), de *Leishmania chagasi* (um protozoário causador do calazar), de *Paracoccidioides brasiliensis* (um fungo causador de micose), de *Trypanosoma cruzi* (um protozoário causador da doença de Chagas), de *Anopheles darlingi* (um mosquito transmissor da malária) de *Leptospira interrogans* (uma bactéria transmitida pela urina do rato e que afeta o homem). Também se desenvolvem importantes estudos sobre o Genoma Humano do Câncer e o Genoma Clínico.
- Saúde animal: Sequenciamento de *Mycoplasma synoviae* (um vírus que afeta os bovinos) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (um vírus que afeta os suínos).
- Pecuária: Mapeamento de *Bos indicus* (gado Nelore adaptado ao Brasil), estudos sobre o genoma funcional do boi, do frango, da abelha.
- Agricultura: Sequenciamento de *Xylella fastidiosa* (causadora da praga do amarelinho das videiras), de *Xanthomonas* (uma bactéria causadora do cancro cítrico ou tristeza), de *Leifsonia xyli* (bactéria que ataca a cana-de-açúcar), de *Crinipellis pernicioso* (um fungo causador da vassoura de bruxa, que ataca o cacau), de *Baculovirus anticarsia* (um vírus que ataca a lagarta da soja), de *Mycosphaerella fijiensis* (que causa a sigatoka negra da banana) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e de *Herbaspirillum seropedicae* (bactérias fixadoras de nitrogênio).
- Indústria: Sequenciamento de *Chromobacterium violaceum* (uma bactéria que pode originar compostos de interesse farmacológico) e de várias plantas industriais (guaraná, café, cana-de-açúcar, eucalipto, além de leguminosas como soja, feijão, feijão-caupi e amendoim).

Estas realizações foram possíveis graças ao envolvimento pioneiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à criação de Rede Nacional de Sequenciamento do Programa Genoma Brasileiro (CNPq, Ministério de Ciência e Tecnologia), com 25 laboratórios regionais e um laboratório de bioinformática (Laboratório Nacional de Computação Científica), a participação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e várias universidades que deram a infraestrutura necessária e possibilitaram a capacitação profissional.

A criação de empresas novas com fundo de capital de risco (Votorantim) visa desenvolver produtos biotecnológicos que gerem e comercializem patentes na área da genômica aplicada, com o qual, em um futuro próximo, a participação do Brasil nesta área se verá aprofundada. Algumas destas empresas (Allelyx, Canavialis) foram adquiridas em 2008 pela multinacional Monsanto.

CAPÍTULO 6: OS PROCESSOS FERMENTATIVOS

OS PROCESSOS FERMENTATIVOS E A INDÚSTRIA

A produção de vinhos e cervejas é o primeiro processo fermentativo desenvolvido em escala industrial. Ao longo do século XX, a expansão da Microbiologia Industrial possibilitou, mediante o desenvolvimento de processos baseados no metabolismo microbiano, a produção de diversas substâncias (acetona, butanol, etanol, ácido cítrico, antibióticos etc.). Atualmente, as fermentações encontram aplicações novas, tanto no tratamento ambiental como na produção de alimentos e aditivos, de produtos químicos e de medicamentos.

Por motivos históricos, ainda hoje o termo *processos fermentativos* se aplica em biotecnologia a qualquer processo microbiano operado em grande escala, independentemente de ser ou não uma fermentação. E o termo fermentador se usa como sinônimo de biorreator, designando o recipiente onde ocorre o processo.

Tradicionais ou revigoradas pelas possibilidades oferecidas pela manipulação gênica, as fermentações ou bioprocessos visam um dos seguintes objetivos:

- A multiplicação de microrganismos para a obtenção de biomassa (leveduras, rizóbios, proteína de célula única).
- A obtenção de produtos microbianos (antibióticos, aditivos, álcool, enzimas etc.).
- A conversão de um substrato em outro, por ação de microrganismos ou de enzimas (transformação de esteroides, isomerização de glicose em frutose).
- A purificação de um solvente (tratamento de efluentes, transformação de algum poluente em alguma substância facilmente degradável etc.).

Um processo fermentativo começa com a escolha do agente biológico adequado (microrganismo ou enzima); segue com a transformação da matéria-prima, em condições que podem exigir esterilização, aeração e controle do processo (pH, temperatura etc.); e finaliza com a separação e purificação do produto final (Fig.6.1).

Figura 6.1: O processo fermentativo genérico.



Para que o processo seja economicamente viável deve-se contar com uma matéria-prima barata, um procedimento passível de ser bem controlado e uma forma de recuperar o produto que simplifique ao máximo sua purificação.

Observe-se que células animais e vegetais também podem ser cultivadas em grande escala, como será visto no próximo capítulo, junto com as técnicas de *cultura de tecidos*.

OS MICRORGANISMOS INDUSTRIAIS

NOÇÕES SOBRE O METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

Denominamos metabolismo o conjunto de reações químicas de degradação (catabolismo) e de síntese (anabolismo) de substâncias em um organismo. As primeiras liberam energia, as outras a consomem.

As células e a maioria dos microrganismos retiram dos compostos orgânicos a energia que precisam, para a manutenção de sua estrutura e para suas atividades. Nas vias catabólicas, a degradação de compostos orgânicos em moléculas menores libera energia; uma parte desta será acumulada sob a forma de ATP (trifosfato de adenosina), e a restante dissipada como calor.

Respiração e fermentação são as principais vias catabólicas (Figura 6.2). A quantidade de energia liberada e os produtos finais diferem se a oxidação do composto orgânico for total ou parcial. Na glicólise, a glicose é degradada até uma molécula de três carbonos, o piruvato. Em presença de oxigênio, a entrada do piruvato no ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa permitem a quebra total da glicose em CO_2 e H_2O , liberando uma grande quantidade de energia sob a forma de ATP (respiração aeróbia).

Mediante a redução do piruvato ou de algum de seus derivados (fermentação), vários microrganismos geram outras substâncias orgânicas: acetona, butanol, etanol, ácido láctico, ácido acético, glicerol etc. Estas reações ocorrem geralmente em ambientes onde o substrato é abundante, sendo pequena a quantidade de energia obtida. Dependendo das condições ambientais, isto é, da presença ou ausência de oxigênio, algumas leveduras e bactérias (assim como as células musculares) podem respirar ou fermentar.

Figura 6.2: Respiração e fermentação.

Na respiração, onde o último receptor de elétrons é o oxigênio, a oxidação de glicose se completa até chegar a CO_2 e H_2O , produzindo 36-38 moléculas de ATP. Na fermentação, o último receptor de elétrons é o piruvato ou algum outro derivado, produzindo 2 ATP.

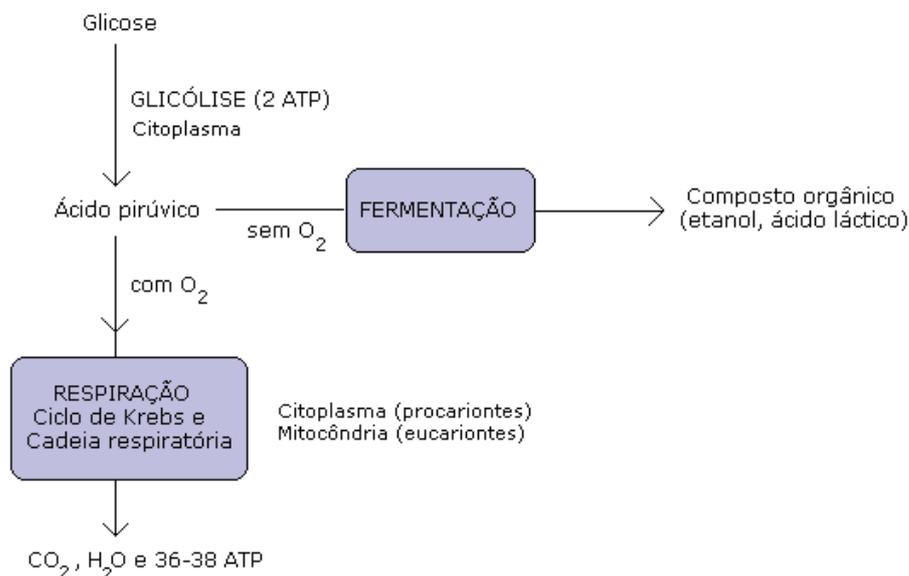
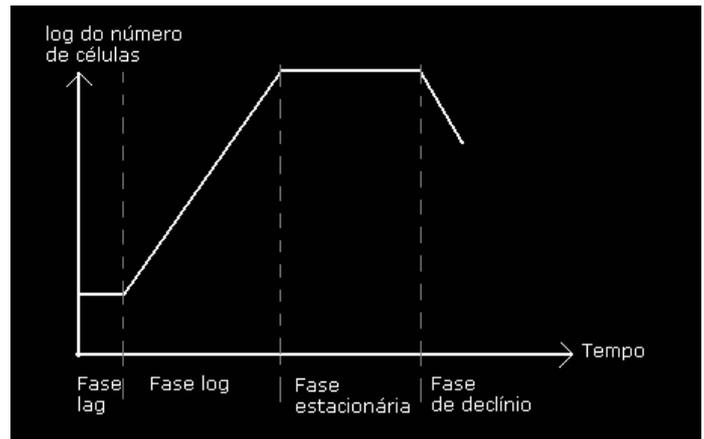


Figura 6.3: As fases de crescimento de uma população.

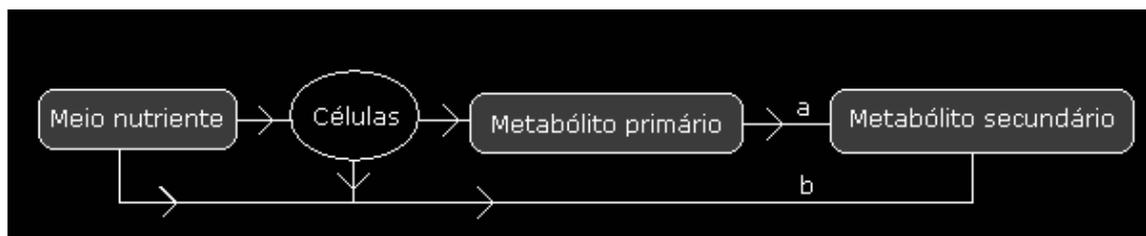
Células e metabólitos primários são produzidos na fase log; os metabólitos secundários no fim da fase log e início da fase estacionária.



Com vistas ao desenvolvimento de um bioprocessamento, a escolha do microrganismo terá que ser feita em função de suas vias metabólicas; e as condições de cultivo dependerão do objetivo da fermentação, um metabólito primário ou um metabólito secundário (Figura 6.4).

Figura 6.4: A produção de metabólitos primários e secundários

Os nutrientes do meio permitem a multiplicação celular e a formação do metabólito primário, que pode ser utilizado pelas células para sintetizar o metabólito secundário (a); este pode também ser sintetizado diretamente a partir de alguma substância do meio (b).



AS LINHAGENS INDUSTRIAIS

De um modo geral, para que o cultivo em um fermentador resulte economicamente viável, o microrganismo deve ser capaz de se multiplicar rapidamente, sintetizando grande quantidade do produto a partir de uma matéria-prima barata. Existem Bancos e Coleções de Cultura que vendem esse tipo de linhagens de microrganismos como culturas puras, geneticamente estáveis e aptas para o cultivo em grande escala.

Apesar de terem sido isoladas do meio ambiente, as linhagens industriais diferem substancialmente das linhagens originais, em virtude de uma série de alterações genéticas (mutações, recombinações) obtidas no laboratório. Algumas vias metabólicas, especialmente as do metabolismo secundário, podem ter sido alteradas, de maneira a aumentar ao máximo a síntese do produto desejado e evitar a produção de algumas substâncias desnecessárias.

Em geral, por estar tão selecionadas geneticamente, tendo inclusive algumas vias metabólicas anuladas ou desbalanceadas, estas linhagens sobrevivem pouco tempo no meio ambiente. Porém, como norma geral, as linhagens industriais não devem ser patogênicas nem produzir toxinas. A produção de medicamentos ou de vacinas é um caso especial que exige medidas de segurança estritas.

Os microrganismos constituem um grupo biológico muito diversificado e, ainda, pouco conhecido, por isso existem muitas expectativas em relação à prospecção de linhagens em ambientes extremos ou pouco usuais. Não se precisa desenvolver um processo novo para cada microrganismo que apresente alguma característica comercial interessante. A tendência atual é de transferir os genes correspondentes a algum dos microrganismos conhecidos, adaptados às condições industriais.

A ESCOLHA DA MATÉRIA-PRIMA

A composição do meio de cultura depende das necessidades metabólicas do microrganismo escolhido. Este deve conter todos os nutrientes necessários nas concentrações adequadas, que variam em função do microrganismo e do objetivo do processo. Em geral, os meios de cultura utilizados no laboratório incluem:

- Água.
- Uma fonte de energia e de carbono: glicose, amido etc.
- Uma fonte de nitrogênio: inorgânica (sulfato de amônia, nitrato de potássio etc.), orgânica (asparagina, succinato de amônia, glutamato, ureia, etc.) ou complexa (farinha de soja, peptona etc.).
- Sais minerais, tais como fosfato de potássio (K_2HPO_4 ou KH_2PO_4), sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$) etc.
- Elementos-traço: ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, molibdênio.

Com vistas a uma exploração comercial, os meios definidos são substituídos na indústria por matérias-primas de baixo custo como, por exemplo, soro de leite, melão de cana ou de beterraba, amido de milho etc. Em alguns casos, a matéria-prima passa por um tratamento prévio com métodos físicos e/ou químicos.

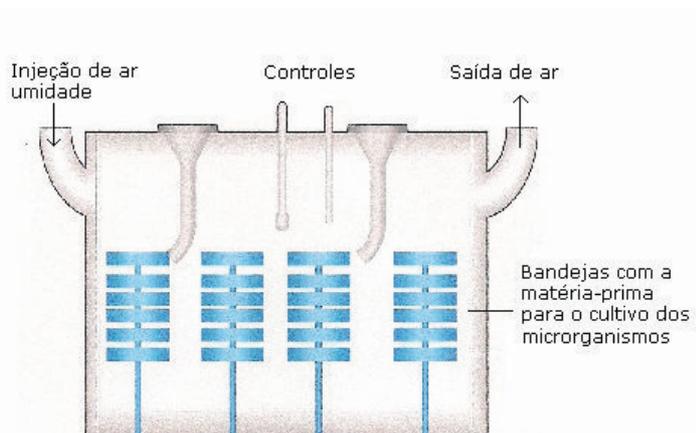
No caso de se tratar de um processo enzimático, o meio deverá levar, além do substrato adequado, os elementos necessários para que a enzima possa desenvolver sua atividade catalítica (precursores, cofatores etc.).

OS PROCESSOS TRADICIONAIS

Algumas fermentações se desenvolvem sobre resíduos agroindustriais ou florestais, como grãos, palha, bagaço, serragem etc. Este tipo de fermentação em meio sólido umedecido é utilizada na produção de alimentos como, por exemplo, o levedo da massa na panificação, a maturação de queijos por ação de fungos (Roquefort, Gorgonzola), o cultivo de fungos, a fermentação do cacau, do café e do chá etc. Na Ásia, a preparação do *koji*, soja fermentada, é a base de alimentos tradicionais como o tofu, o missô, o shoyu e o sakê.

Em alguns lugares, estas fermentações ainda ocorrem artesanalmente, dentro de folhas de bananeira e cestas de bambu ou mesmo em montões; também existem hoje equipamentos sofisticados com bandejas, colunas, frascos e tambores rotativos, alguns totalmente automatizados (Figura 6.5)

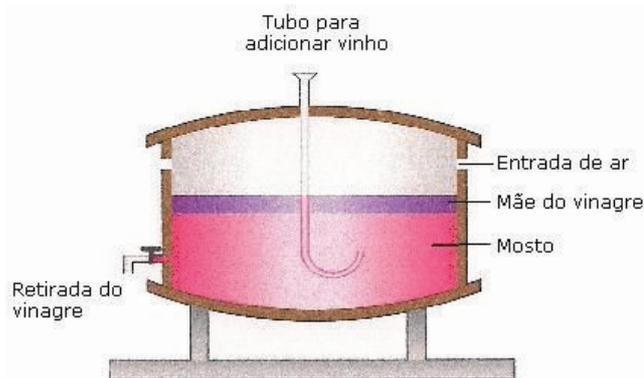
Figura 6.5: Biorreator para fermentações em fase sólida



Outra variante interessante do processo fermentativo é a produção tradicional de vinagre (Processo Francês ou de Orléans) em barris de carvalho. O vinho é inoculado com bactérias do gênero *Acetobacter* que formam na superfície a "mãe do vinagre", uma película que flutua, presa a um quadriculado de madeira que a impede de afundar. Deste modo, o microrganismo cresce na superfície de um meio líquido, em contato simultâneo com o ar e com o meio.

O processo fornece excelentes vinagres, mas é lento e exige muito espaço, sendo a capacidade de cada barril de 200 litros (Figura 6.6). Existem outros processos semelhantes, conduzidos por fungos, que formam uma película de micélio na superfície do líquido.

Figura 6.6: Um processo tradicional, a produção de vinagre (Método de Orléans)



OS PROCESSOS SUBMERSOS

OS FERMENTADORES OU BIORREATORES

Atualmente, a maioria dos processos industriais se desenvolve em cubas de vidro ou de aço de até 20 litros. Os agentes biológicos se encontram submersos no meio de cultivo que ocupa, aproximadamente, 75% da cuba. Às vezes é necessário injetar ar, e em muitas fermentações se forma espuma.

O desenho do biorreator deve se adequar ao objetivo do processo, respondendo eventualmente a diversos imperativos, tais como a esterilização do sistema, a aeração e homogeneização do meio, o acréscimo de nutrientes e de aditivos antiespuma, a manutenção do pH etc.

Os modelos de fermentadores mais utilizados com microrganismos contam com aeração e agitação mecânica. Esta facilita a distribuição dos nutrientes na cuba, mas gera calor que deve ser eliminado mediante a circulação de água fria (Figura 6.7). Se o processo exigir assepsia, esta será conseguida mediante:

- A esterilização do meio, dentro ou fora do fermentador.
- A desinfecção ou esterilização do equipamento, por injeção de vapor ou mediante o calor gerado por serpentinas, sendo esta medida extensiva a todos os ductos de entrada e saída e às válvulas correspondentes.
- A esterilização do ar, mediante filtros adequados.

Em outros tipos de biorreatores, em coluna ou torre, a homogeneização depende da injeção de ar (Figura 6.7). Os tanques podem chegar a 3.000 m³ de capacidade como, por exemplo, os fermentadores para a produção de proteínas de célula única, da Imperial Chemical Industries (ICI), no Reino Unido.

Os sistemas submersos são apropriados para o cultivo de microrganismos livres, mas resultam pouco econômicos quando se trabalha com células ou enzimas caras. A imobilização em fermentadores menores, seja por adesão a um suporte inerte, seja por inclusão dentro de um polímero que permita o contato com o meio de cultura, além de simplificar a purificação do produto permite a reutilização das células ou das enzimas, que permanecem dentro do biorreator (Figura 6.8). O crescimento da população microbiana, ou a quantidade do produto formado são monitorados a partir de amostras extraídas ao longo do processo.

Figura 6.7: Modelo de biorreator utilizado em fermentações submersas.

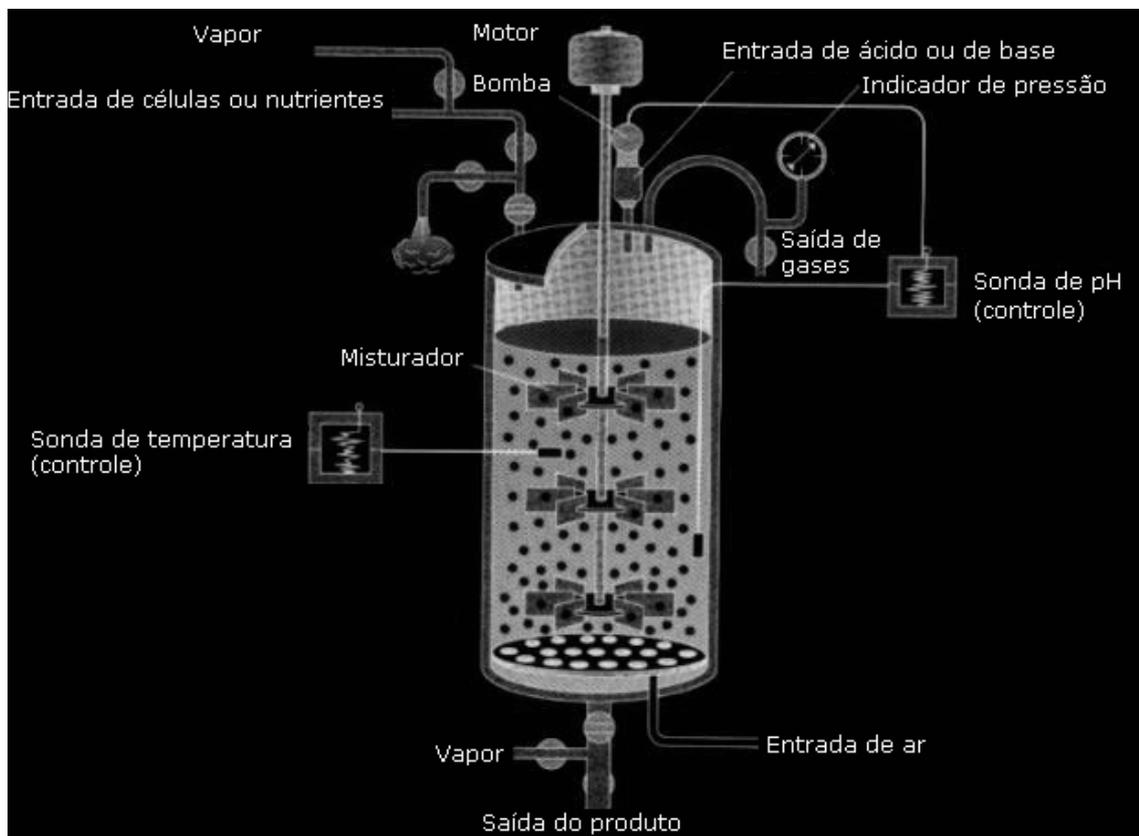
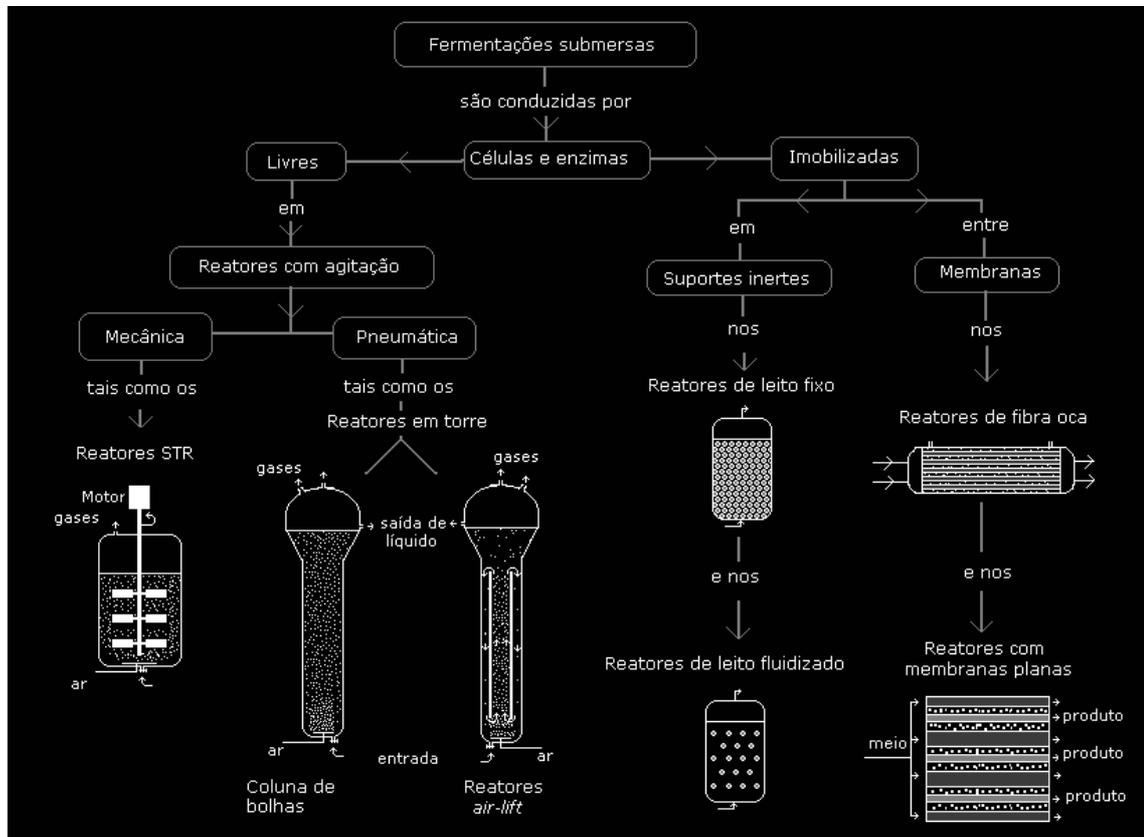


Figura 6.8: Fermentações submersas, agentes biológicos e biorreatores.

Estes últimos se adaptam às necessidades de cada agente biológico e de cada tipo de processo.



A MUDANÇA DE ESCALA

A capacidade de uma cuba varia entre 1 e 10 l para um fermentador de laboratório, chegando a 5.000 l em uma planta piloto e 100.000 l em uma planta industrial.

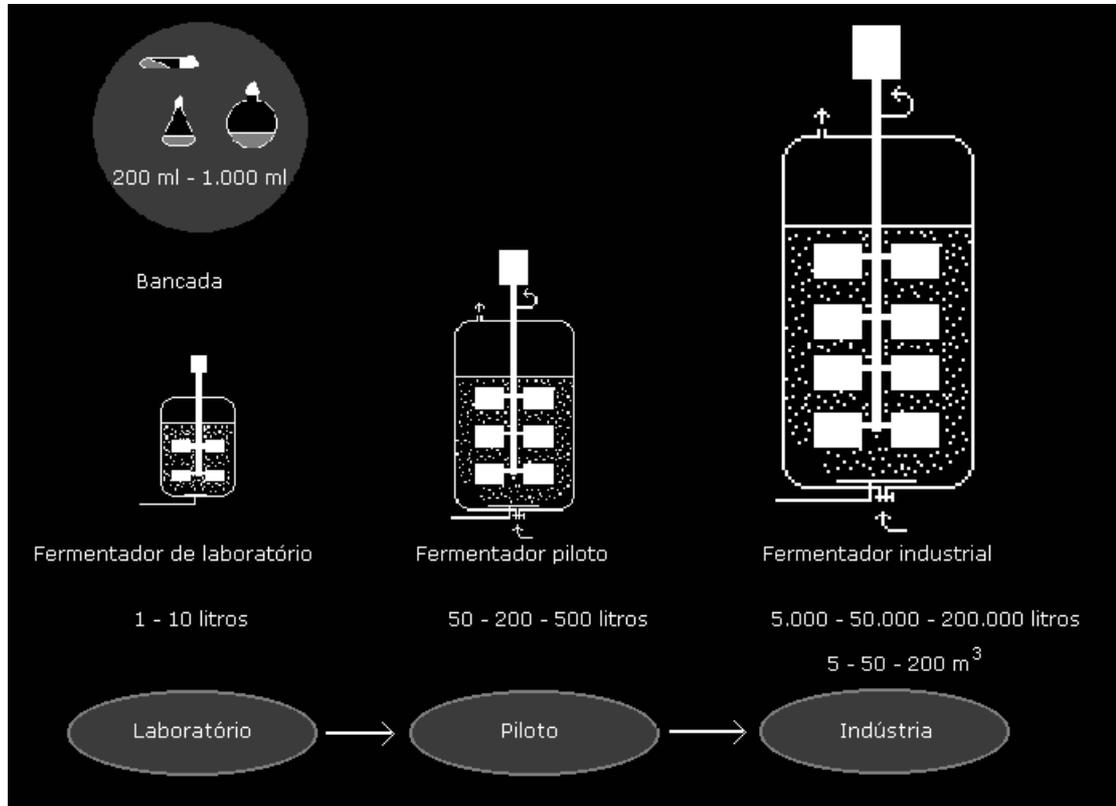
Uma operação simples de laboratório pode ser impraticável, ou pouco econômica, quando realizada em grande escala. No laboratório, após as primeiras experiências realizadas na bancada, o processo passa a ser estudado em um biorreator de até 10 litros de capacidade, onde se analisam as variáveis físico-químicas em outra escala.

Ao aumentar o tamanho do equipamento, altera-se a relação superfície/volume, de modo que as condições de operação do fermentador na planta piloto deverão ser ajustadas até se aproximar das correspondentes a um processo comercial. Se a experiência na planta piloto for bem-sucedida, o processo poderá ser desenvolvido em um fermentador industrial (Figura 6.9).

A automatização do monitoramento e do controle da fermentação permite que a informação relativa aos parâmetros físicos e químicos (pH, temperatura, oxigênio, velocidade de agitação, o nível do meio etc.) seja recolhida on-line por sondas e sensores. Para que o processo se aproxime das condições ideais, a informação é analisada em relação a um modelo previamente estabelecido. Como este se elabora a partir da experiência obtida com cubas menores (laboratório, piloto), os ajustes à mudança de escala são de grande complexidade.

Figura 6.9: A mudança de escala do laboratório à indústria.

A mudança de escala entre o processo laboratorial e o processo industrial cria vários problemas de índole tecnológica.



A CONDUÇÃO DO PROCESSO

O processo fermentativo pode ser conduzido de maneira contínua ou descontínua (batelada), sendo que ambas as formas apresentam vantagens e inconvenientes.

Em um sistema descontínuo de produção, uma vez que o fermentador é carregado com a matéria-prima e o inóculo correspondentes, a fermentação prossegue até o esgotamento dos nutrientes. Concluído o processo e extraído o produto, o fermentador é esvaziado, limpo e esterilizado antes de receber outra carga.

Apesar do tempo improdutivo entre uma batelada e a seguinte, o sistema é relativamente flexível, já que o mesmo equipamento pode ser utilizado na fabricação de produtos diferentes. A produção em bateladas é bastante utilizada na indústria farmacêutica porque o risco de contaminação permanece relativamente baixo.

Já no sistema contínuo de produção, o acréscimo de nutrientes e a retirada do produto ocorrem simultaneamente ao longo do processo, eliminando-se quase totalmente o tempo improdutivo. Como o risco de contaminação aumenta, o sistema se adapta a processos que não exijam assepsia, como a produção de proteína microbiana e de álcool e, obviamente, o tratamento de água.

Entre o sistema em batelada e o sistema contínuo existe um sistema intermediário de batelada alimentada em que, periodicamente, parte do conteúdo (meio de cultivo + produto) é retirada e substituída por meio fresco.

A RECUPERAÇÃO DO PRODUTO

A recuperação do produto representa uma fração considerável do custo de um processo fermentativo. Se o produto for secretado fora da célula, estará disperso em um volume grande de água e será necessário separá-lo por decantação ou filtração. Mas se o produto permanecer dentro das células, estas terão que ser desintegradas para proceder a sua extração.

O produto se concentra por sedimentação, precipitação, filtração, centrifugação, extração por solventes, destilação, evaporação do solvente e secagem. Se a purificação for necessária, esta envolverá outros procedimentos, como a cristalização e os métodos cromatográficos.

Um problema a considerar é o despejo dos resíduos de uma fermentação, alguns dos quais podem representar um perigo para o meio ambiente como, por exemplo, o vinhoto resultante da produção de etanol ou o soro das indústrias de laticínios. Existem formas de tratamento, como o crescimento de biomassa sobre resíduos industriais, que eliminam o problema e ainda permitem a obtenção de mais um produto.

OS BIOPROCESSOS NA INDÚSTRIA DE BIOFERTILIZANTES

Na América Latina, a produção de biofertilizantes envolve numerosas empresas, pequenas e médias, que contam com um sólido suporte tecnológico originado em universidades e instituições públicas de pesquisa agrônômica.

O termo biofertilizante se aplica aos produtos que contém agentes biológicos capazes de favorecer o desenvolvimento vegetal. Um destes agentes é o *Rhizobium*, uma bactéria simbiote das raízes de leguminosas que fixa o nitrogênio atmosférico, reduzindo a necessidade de aplicar fertilizantes nitrogenados nas lavouras.

Vários países produzem inoculantes agrícolas; entre eles: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Cuba, México, Peru e Uruguai.

As linhagens bacterianas são estirpes selecionadas por sua eficiência em uma ampla gama de cultivares e amplamente adaptadas às condições locais. A multiplicação dos microrganismos se realiza em etapas sucessivas, utilizando recipientes cada vez maiores até chegar a biorreatores de 1.500 litros. Uma vez recuperados, os microrganismos são veiculados em meio líquido ou em turfa estéril, sendo empacotados e posteriormente vendidos e distribuídos aos agricultores. Segundo a legislação do Mercosul, durante o prazo de validade do produto, a concentração deverá ser de 10^8 microrganismos viáveis por grama de produto.

Com o mapeamento do genoma de microrganismos como o *Rhizobium etli* (México) e o *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Brasil), a biotecnologia moderna começa a se inserir neste campo. No entanto, até o presente, a indústria baseia a produção dos microrganismos nas tecnologias fermentativas clássicas.

CAPÍTULO 7: A CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS

A MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A reprodução assexuada é utilizada para obter um grande número de mudas a partir de uma única planta. Dependendo do caso, aproveitam-se bulbos (cebola), cormos (gladiolo), rizomas (samambaias), tubérculos (batata-inglesa), caules (banana), raízes (batata-doce, maçã, amora), folhas (begônia, espada-de-são-jorge), estacas (videiras) etc. As plantas obtidas por propagação assexuada ou vegetativa são idênticas à planta-mãe e idênticas entre si. Em outras palavras, são clones.

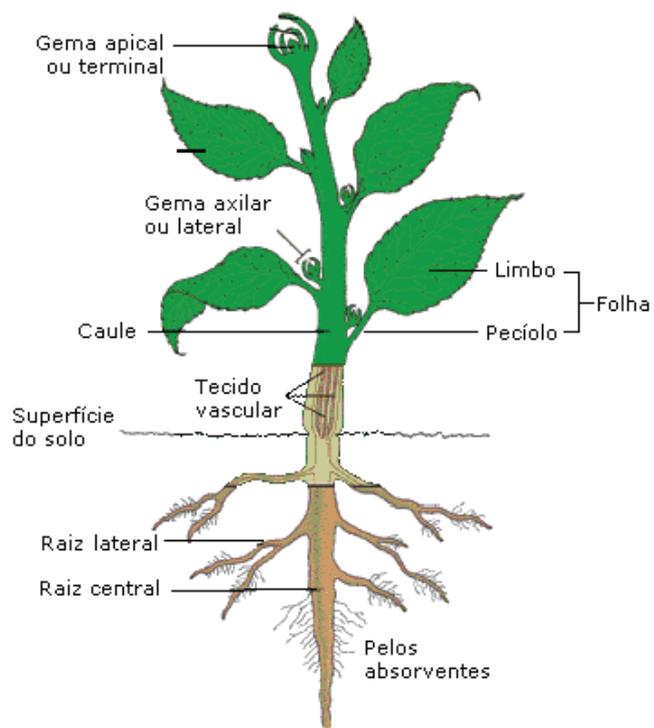
A capacidade de uma célula regenerar réplicas do organismo do qual ela deriva é denominada totipotência. Restringida em animais, esta propriedade é característica das plantas. Em função das condições fisiológicas e ambientais, as células vegetais seguem vias metabólicas diferentes. A totipotência permite a sobrevivência das plantas superiores após o ataque de herbívoros, pragas e patógenos ou em condições ambientais desfavoráveis.

As primeiras tentativas de cultura de tecidos vegetais em laboratório datam de 1902, no entanto, a primeira experiência bem-sucedida é a germinação *in vitro* de sementes de orquídea (Knudson, 1922). Transferidas assepticamente ao meio de cultura, e incubadas em condições favoráveis, as sementes e mais tarde as plântulas se mantiveram protegidas do ataque de fungos e bactérias. Com algumas variações, o método é usado ainda hoje por numerosos floricultores, porque, devido ao tamanho minúsculo das sementes e à ausência de reservas nutritivas, as possibilidades de sobrevivência das plântulas após a germinação *in vivo* são muito baixas.

AS ETAPAS

Distintamente das experiências anteriores, a micropropagação se inicia a partir de explantes, isto é, de pequenos fragmentos de tecido extraídos de diversas partes da planta, tais como folhas, raízes, segmentos nodais e gemas axilares, gemas florais e apicais (Figura 7.1).

Figura 7.1: As diversas partes de uma planta angiosperma



Os explantes se cultivam assepticamente em meios de composição adequada, possibilitando a regeneração direta da planta. O processo envolve quatro etapas:

1. Estabelecimento de uma cultura asséptica.

Uma vez retirados da planta-mãe, os explantes são desinfetados com um agente químico, geralmente hipoclorito de sódio, que é mais tarde lavado. Os explantes são transferidos para o meio de cultura, em condições assépticas semelhantes às utilizadas para a cultura de microrganismos (Figura 7.2). A incubação ocorrerá a uma temperatura entre 23 e 28°C, com iluminação durante 12 a 14 horas diárias.

2. Multiplicação.

Os propágulos desenvolvidos são divididos e transferidos para um meio de multiplicação, de maneira a se obter numerosas subculturas (Figura 7.3).

3. Preparação das plântulas para a transferência ao solo.

As plântulas das subculturas são transferidas para um meio de enraizamento onde, além de desenvolver raízes, enrijecem e começam a fotossintetizar.

4. Aclimação.

Transferência das plântulas, primeiro para o solo ou para algum outro substrato, mais tarde para uma casa de vegetação. Protegidas da iluminação solar direta, elas aumentarão sua capacidade fotossintética adaptando-se lentamente as condições ambientais.

A capacidade de regeneração é maior nas plantas herbáceas que nas lenhosas, distribuindo-se em forma desigual entre algumas famílias de Solanáceas, Crucíferas, Gesneriáceas, Compostas e Liliáceas; depende também do genótipo e das condições ambientais, diminuindo com a idade da planta.

A cultura *in vitro* tem a vantagem de ser mais rápida e de ocupar muito menos espaço que a multiplicação *in vivo*. As principais aplicações estão no cultivo de plantas ornamentais, de hortaliças e na silvicultura.

Figura 7.2: O procedimento a seguir para se obter uma cultura asséptica no laboratório.

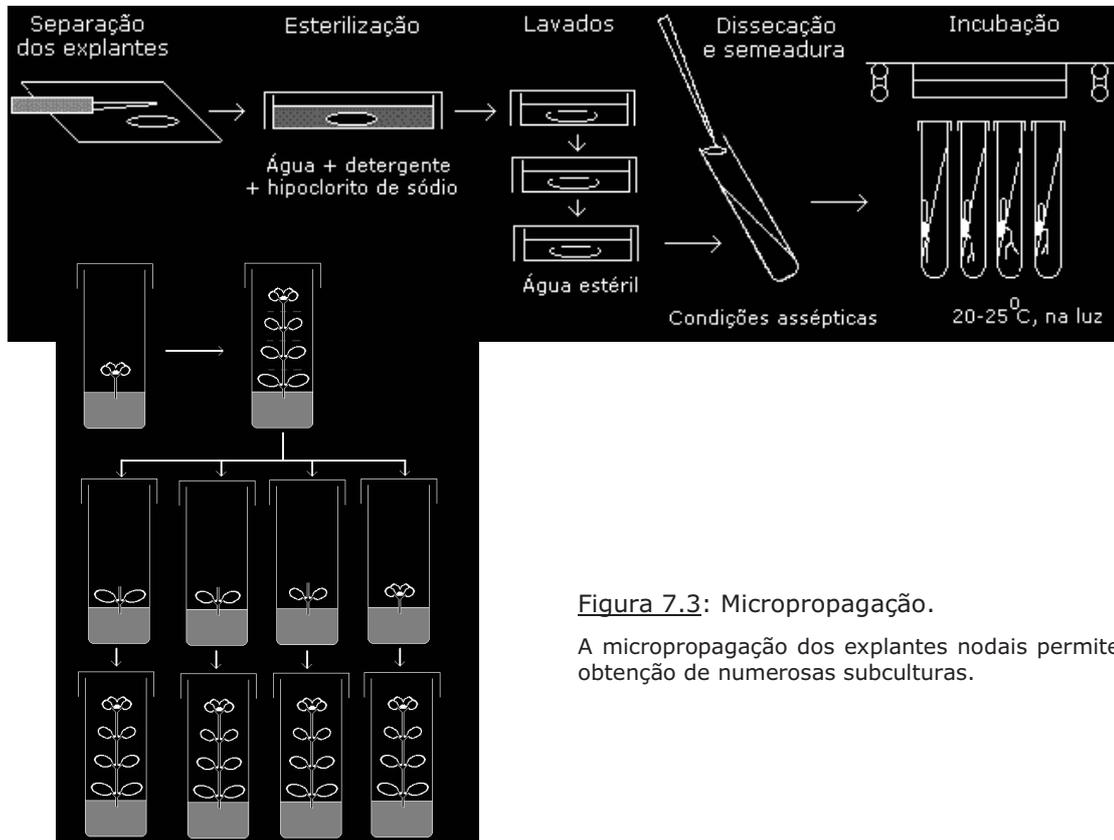


Figura 7.3: Micropropagação.

A micropropagação dos explantes nodais permite a obtenção de numerosas subculturas.

OS MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura inclui água, uma fonte de carbono, substâncias inorgânicas (sais minerais), vitaminas, hormônios e fatores reguladores do crescimento (Ver Tabela 7.1). Alguns destes componentes podem ser substituídos por misturas pouco definidas, mais econômicas ou simples de manipular (água de coco, suco de tomate, suco de laranja). Geralmente, o pH do meio varia entre 5,0 e 6,5.

A composição do meio de cultura varia com as necessidades de cada espécie. O crescimento e a diferenciação celular são controlados modificando a proporção entre os hormônios e reguladores de crescimento. De um modo geral, se a proporção entre citocininas e auxinas for maior que 1, desenvolvem-se brotos, se for menor, raízes e, se for igual, calos.

A incubação ocorre a uma temperatura entre 23 e 28°C, com 12 a 14 horas diárias de iluminação.

Tabela 7.1: Os componentes do meio de cultura para células vegetais.

Componentes	Características e exemplos
Água destilada	Representa 95% do meio nutriente.
Fonte de carbono	Geralmente se utiliza sacarose. A fonte de carbono é necessária porque os explantes não são totalmente autotróficos e a fotossíntese <i>in vitro</i> não supre as necessidades das células.
Substâncias inorgânicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) e microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), em uma proporção que depende da planta escolhida.
Vitaminas	Mioinositol, vitamina B ₁ (tiamina), ácido nicotínico (niacina), vitamina B ₆ (piridoxina), pantotenato de cálcio, ácido fólico, vitamina B ₂ (riboflavina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina H (biotina), ácido para-aminobenzoico e vitamina E (tocoferol).
Hormônios e reguladores de crescimento	<p>Auxinas</p> <p>Estas promovem o alongamento celular, a formação de calos e de raízes adventícias; inibem a formação de brotos axilares adventícios e, às vezes, a embriogênese em suspensões celulares. Exemplos: IAA (ácido indolacético), NAA (ácido naftalenoacético), IBA (ácido indolbutírico), 2,4 D (2,4-diclorofenoxiacético).</p> <p>Citocininas</p> <p>Estas promovem a divisão celular, regulam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais. Exemplos: cinetina, 2iP (2-isopentiladenina), BAP (benzilaminopurina), zeatina.</p> <p>Outras substâncias</p> <p>Exemplos: giberelinas, ácido abscísico, etileno.</p>
Misturas de substâncias pouco definidas	Exemplos: extrato de levedura, extratos vegetais, hidrolisados de caseína, peptona e triptona. A tendência atual em pesquisa é de substituí-los por meios de composição definida.
Materiais inertes	Utilizados como suporte. Exemplos: agar, agarose, outros polissacarídeos (Gelrite, Phytigel), lã de vidro, papel de filtro, areia, esponjas de poliestireno.

AS DIFERENTES MODALIDADES

A cultura de meristemas

A regeneração de uma planta pode ocorrer a partir de um órgão tão pequeno quanto a gema apical (tamanho 0,5 a 2 mm). Nesta, associado aos primórdios foliares e ao tecido subapical, se encontra um pequeno fragmento (0,01 a 0,3 mm) de meristema, um tecido embrionário a partir do qual se formam todos os outros tecidos das plantas. Por isso, a cultura da gema apical pode ser substituída pela cultura de meristemas (Figura 7.4).

Estoques de plantas livres de vírus e de outros patógenos são obtidos associando a cultura de meristemas com a termoterapia, uma incubação a 32-34^oC, por um tempo determinado (gerânio, dália, crisântemo, cana-de-açúcar, batata, morangueiro, alcachofra etc.). Recuperam-se com este método algumas plantas que só se reproduzem naturalmente pela via assexuada e se encontram ameaçadas de extinção devido à contaminação por vírus.

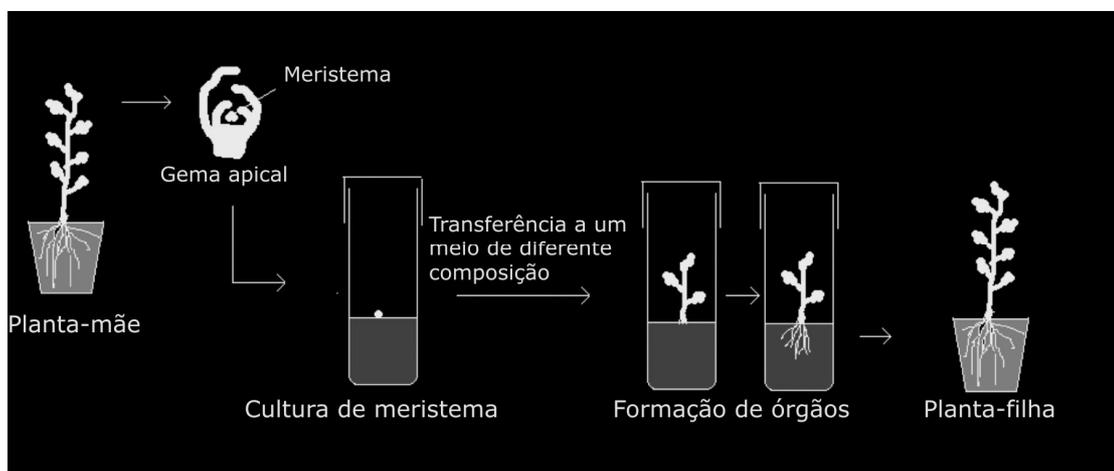
Os exemplos citados na bibliografia são, no mínimo, impressionantes. Se um tubérculo de inhame de 100 g produz 25 kg de tubérculos em dois anos, por micropropagação produzirá 300.000 kg; a partir de uma única gema apical podem-se obter 4.000.000 de cravos em um ano.

A técnica também permite a multiplicação de espécies que se reproduzem lenta e/ou dificilmente, como as orquídeas, e acelerar a produção de mudas em plantas com ciclo anual ou bianual. Outra variação desta modalidade é a microenxertia, que se aplica às essências florestais (eucalipto) e às árvores frutíferas (citros). A técnica gera uma alta produtividade de mudas saudáveis, que são cultivadas em pouco espaço (mais de 1.000 plantas / m²) sem depender dos fatores climáticos e da época do ano.

Do ponto de vista econômico, o custo destas mudas é alto porque a cultura em meio sólido necessita um trabalho minucioso e uma mão de obra especializada. A multiplicação dos propágulos em biorreatores, análogos aos fermentadores microbianos, visa reduzir os custos. Ao modelo tradicional de pás giratórias que danifica os tecidos e as células, preferem-se pequenas cubas de 1 a 5 l onde os propágulos permanecem em sistemas de imersão permanente ou temporária.

Apesar dos custos, a tecnologia é interessante quando se planeja introduzir uma espécie em uma região determinada porque elimina qualquer contaminação prévia. Também é interessante para iniciar a propagação vegetativa com mudas certificadas, visando a amplificação posterior dos cultivos.

Figura 7.4: A cultura de meristemas



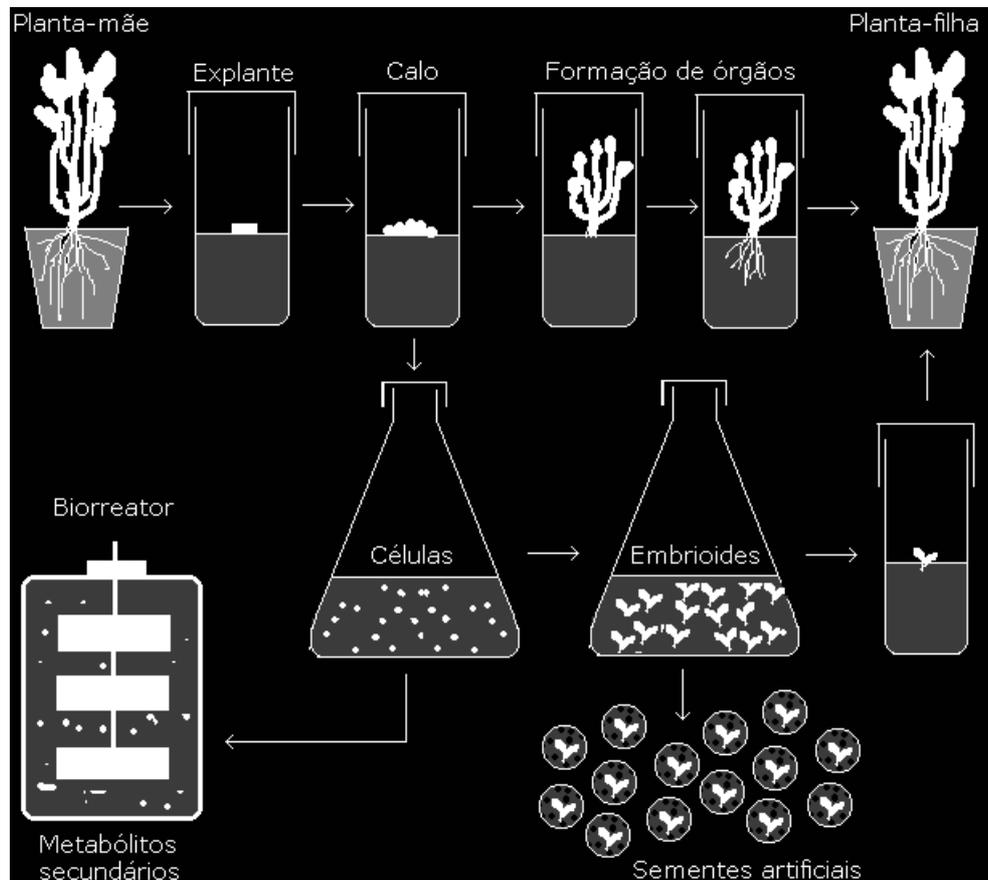
A cultura de calos

A cultura de calo é a modalidade alternativa para aquelas plantas que não podem ser propagadas diretamente a partir de meristemas. Um calo é uma massa de células desdiferenciadas que prolifera de maneira irregular a partir de um explante; trata-se de um tecido de tipo tumoral que, *in vivo*, é produzido como resposta aos ferimentos em órgãos e tecidos.

Uma vez estabelecido em um meio de cultura, o calo pode ser subdividido a cada três ou quatro semanas, mantendo indefinidamente as células em meio nutriente com a mesma composição. Se o calo for transferido a outro meio com uma concentração diferente de hormônios, formar-se-ão órgãos ou embriões, a partir dos quais poderão ser regeneradas numerosas plantas (Figura 7.5).

Diferentemente das outras modalidades de cultura de tecidos, na cultura de calos a proliferação celular está acompanhada por um aumento das variações genéticas e da instabilidade cromossômica (variação somaclonal). Devido a esta característica, a cultura de calos resulta menos conveniente que a cultura de meristemas para micropropagação. Contudo, sua utilização é inevitável no caso de algumas espécies economicamente importantes (cereais, leguminosas, forrageiras, espécies florestais e palmeiras tropicais). Por outro lado, a variação somaclonal permite a seleção de variedades de plantas com propriedades novas, tais como a resistência ao estresse, ao ataque de insetos, a patógenos, a herbicidas, a concentrações salinas elevadas, a moléculas químicas (Al, Mn). A variabilidade pode ser aumentada pela utilização de agentes mutagênicos.

Figura 7.5: As diferentes possibilidades dos cultivos de calos.



A cultura de células e órgãos vegetais em biorreatores

Desagregando um calo em meio líquido se obtém uma suspensão de células que podem ser cultivadas em biorreatores industriais visando a produção de metabólitos secundários ou de embrioides.

Os embrioides são embriões formados a partir de células somáticas. Podem ser encapsulados em uma substância gelatinosa contendo nutrientes, envolta por um plástico biodegradável, formando "sementes artificiais". Estas se desenvolvem normalmente quando semeadas na terra, por isso uma das aplicações desta tecnologia é sua dispersão por aviões para o reflorestamento de regiões de difícil acesso.

Os metabólitos secundários, ou compostos naturais, são considerados produtos de Química Fina, tendo um alto valor agregado no mercado. Trata-se de alcaloides, de glicosídeos cardíacos, de substâncias antitumorais e antimicrobianas, de hormônios esteroides etc. para a indústria farmacêutica e, também, de corantes, adoçantes e aromas para as indústrias alimentícia e cosmética.

A possibilidade de substituir os métodos tradicionais de extração ou de síntese, pela produção mediante o cultivo de suspensões celulares em biorreatores, gerou grandes expectativas comerciais. No início da década de 1990, vários estudos estimaram as condições necessárias para que a síntese ou a bioconversão de compostos naturais em produtos de alto valor agregado resultasse vantajosa. Os cálculos mostraram que se o mercado fosse suficientemente amplo e o valor do produto superasse os US\$ 500 ou 1.000 por kg, a produtividade do sistema deveria ser de pelo menos um grama de composto por litro de cultura celular. Estas condições não são tão frequentes.

Do ponto de vista tecnológico, as células vegetais são grandes (100 μm) e sedimentam com facilidade. A tendência a formar agregados as torna muito sensíveis ao cisalhamento. Como o crescimento é lento, os riscos de contaminação aumentam. Também existem problemas relacionados com a transferência de oxigênio.

Existem diversos modelos de biorreatores para o cultivo de células vegetais, entre os quais o tradicional de pás giratórias e outros de tipo *air-lift* ou de leiteo fluidizado. A condução do processo pode ser descontínua, semicontínua ou contínua; neste último caso se utilizam células imobilizadas. A escolha de uma modalidade ou outra de cultivo depende da substância estar, ou não, associada ao crescimento celular e, também, de se tratar de um produto intra ou extracelular.

O cultivo de órgãos e especialmente de raízes transformadas (*hair roots*) tem dado bons resultados, apesar de poucos terem alcançado um nível comercial. Entre eles, a produção de shikonina a partir de raízes (*Lithospermum erythrorhizon*) pela empresa Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.; de gíngenosídeo (*Panax ginseng*) e de purpurina (*Rubia akane*) por Nitto Denko Corp.; e de paclitaxel (*Taxos cuspidata*), comercializado como Taxol por Phytion Inc., uma empresa associada a Bristol-Myers Squibb.

Espera-se que as estratégias para aumentar a produção, combinando o desenvolvimento de novos processos industriais com a engenharia metabólica das células, possam vir a estabelecer as bases de uma agricultura molecular. Por enquanto, as aplicações se restringem à produção de alguns fármacos e de aditivos para a indústria de alimentos (flavorizantes, corantes e aromas).

MELHORAMENTO E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE VEGETAL

Existem várias modalidades de cultura de tecidos que contribuem para facilitar a tarefa de melhoramento (Figura 7.6) O método genético tradicional, isto é, a autofecundação das plantas por várias gerações, demora oito ou 10 anos para obter linhagens puras (homozigotas), em que se manifestem os caracteres recessivos. Esse tempo pode se reduzir a meses mediante a cultura de anteras, gerando-se plantas haploides (n cromossomos), que tratadas com colchicina originam diretamente plantas diploides (2n) homozigotas.

Os protoplastos se formam por digestão enzimática da parede celular, que poderá ser regenerada novamente no meio de cultura. Durante o período em que a célula está sem a parede celular, pode-se introduzir material genético estranho (transformação) ou conseguir a fusão de protoplastos de diferentes cultivares ou espécies (hibridização somática).

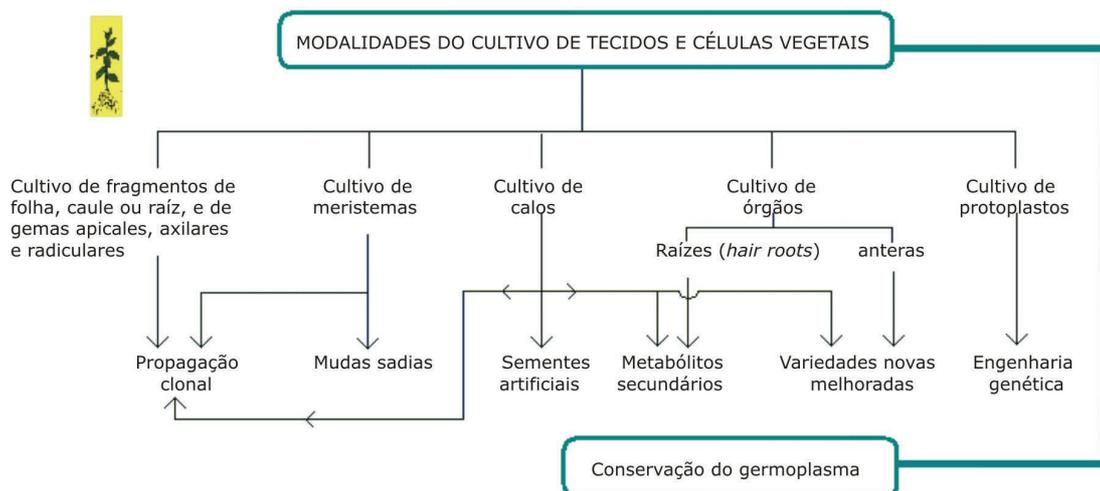
Como as plantas resultantes destes cruzamentos geram sementes que dificilmente se desenvolvem, frequentemente é necessário retirar os embriões do resto da semente e proceder a sua recuperação mediante a cultura *in vitro*.

Protoplastos, células, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos, todos podem ser congelados em nitrogênio líquido a -196°C . A criopreservação facilita a preservação de numerosas plantas ornamentais, frutíferas, oleaginosas, leguminosas, medicinais e aromáticas.

Finalmente, deve-se destacar a importância destas técnicas de cultura de células e tecidos vegetais para a conservação do germoplasma, tanto das espécies cultivadas como das espécies selvagens. A conservação da biodiversidade é importante não só do ponto de vista do melhoramento agrônomico como do farmacológico, já que a maioria dos medicamentos de que dispomos contém princípios ativos extraídos de plantas.

Figura 7.6: As diferentes modalidades da cultura de células e tecidos vegetais.

Estas se constituem em uma ferramenta poderosa para o melhoramento e a conservação do germoplasma.



A DIFUSÃO DA TECNOLOGIA

As técnicas de cultura *in vitro* de vegetais foram rapidamente assimiladas por empresas e instituições de pesquisa e desenvolvimento, porque facilitam o melhoramento genético das variedades comerciais e, também, porque representam uma etapa indispensável na obtenção de uma planta transgênica.

Sendo técnicas de domínio público, relativamente simples e de baixo custo, numerosas empresas as utilizam no mundo todo para garantir a qualidade genética e fitossanitária das mudas e sementes comercializadas. Em Cuba, por exemplo, o IBP (do espanhol, Instituto de Biotecnologia de las Plantas) tem desenvolvido, junto com outros centros científicos, protocolos para batata, cana-de-açúcar, plátano, banana, goiaba, abacaxi, maracujá etc. O IBP está associado a uma rede de 15 biofábricas com capacidade de produzir 60 milhões de plântulas *in vitro* e sementes artificiais.

A tecnologia está amplamente difundida na América Latina, onde representa o segundo produto mais comercializado da biotecnologia agrícola, com ampla difusão na olericultura, na hortifruticultura, na floricultura e na propagação de plantas ornamentais, assim como na produção de plantas de interesse industrial (cana, café) e de mudas de essências florestais para as indústrias de papel.

A CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

A MANIPULAÇÃO *IN VITRO* DAS CÉLULAS ANIMAIS

Apesar dos primeiros estudos datarem de 1912, o cultivo de células animais só começou a se desenvolver com sucesso na década de 1950, quando H. Eagle conseguiu definir os nutrientes necessários para o crescimento celular. Basicamente, um meio para o cultivo de células animais inclui água, sais minerais, aminoácidos, vitaminas, glicose, soro de cavalo ou humano (fatores de crescimento), antibióticos (para prevenir as contaminações microbianas). As células devem ser isoladas, inoculadas e mantidas assepticamente em condições bastante estritas de temperatura (35^o a 37^o C), pH e umidade.

Tabela 7.2: Os componentes de um meio de cultura básico para células animais

Componentes	Características e exemplos
Água	Desmineralizada, destilada.
Fonte de carbono	Glicose.
Substâncias inorgânicas	NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ . 6H ₂ O, NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O, NaHCO ₃ .
L -aminoácidos	Arginina, cistina, fenilalanina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, tirosina, valina.
Vitaminas	Biotina, ácido fólico, colina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxal, riboflavina, tiamina.
Misturas de substâncias pouco definidas	Soro animal de diversa origem, inclusive humano.
Outros	Antibióticos (penicilina, estreptomicina) e vermelho de fenol (pH 7,2-7,4).

AS APLICAÇÕES DA CULTURA *IN VITRO* DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Uma das primeiras aplicações é a cultura de linfócitos, que fornece em poucos dias um número adequado de células para a análise do cariótipo. Este visa detectar as alterações cromossômicas estruturais e numéricas que possam ser a causa de distúrbios no funcionamento do organismo.

Os linfócitos extraídos do paciente são colocados em um meio líquido que induz a divisão celular. A adição de colchicina inibe a formação das fibras do fuso mitótico, bloqueando as células na metáfase. Um choque hipotônico provoca a lise das células e libera os cromossomos (Figura 7.7).

Mas há outros tipos de células de mamíferos que também se cultivam *in vitro*. Células isoladas a partir de fibroblastos ou de tecido epitelial se multiplicam na superfície de um suporte inerte (vidro, plástico etc.), formando uma monocamada. Mediante a transferência de algumas células a um meio novo (repiques), uma cultura primária gera sucessivas culturas secundárias (Figura 7.8).

Entretanto, à diferença dos microrganismos que podem ser repicados indefinidamente, as células animais sofrem um tipo de morte programada (apoptose) depois de aproximadamente umas cinquenta a cem divisões. Deve-se então reiniciar o cultivo com uma nova amostra. Existem algumas exceções que escapam dessa limitação, como as células extraídas de tumores ou as células-tronco; e também os linfócitos B imortalizados por infecção com o vírus de Epstein-Barr ou por fusão com células de mieloma (hibridomas).

Figura 7.7: As etapas da cultura de leucócitos para a análise do cariótipo.

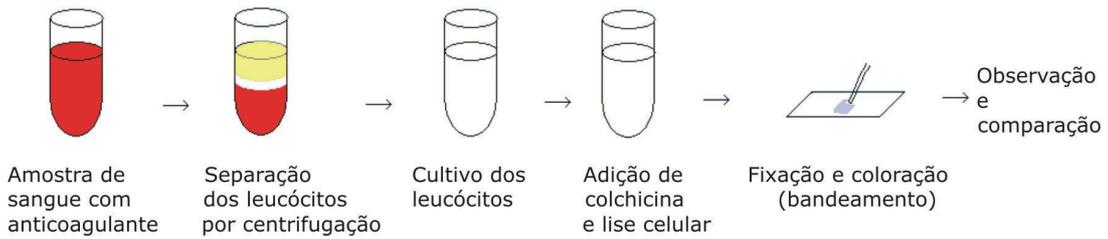
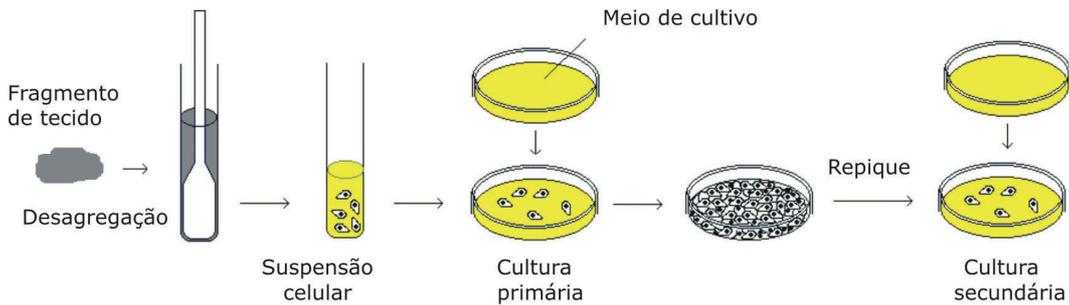


Figura 7.8: As etapas da cultura de células a partir de um fragmento de tecido.



Nas Coleções de Culturas se encontram linhagens celulares de diversos tipos, conservadas por criopreservação (Tabela 7.3). A cultura *in vitro* de células animais é a rota seguida para a manufatura em grande escala de vários produtos, tais como as vacinas e os anticorpos monoclonais. Também é adequada para a produção de citocinas (linfocinas, interferons, eritropoietina) e de outras proteínas de origem recombinante (fator ativador de plasminogênio, p.ex.) que, por exigir modificações pós-traducionais complexas, não podem ser produzidas em bactérias ou leveduras transformadas.

Tabela 7.3: Origem e utilização de algumas linhagens celulares.

Células	Origem	Aplicações
HeLa(*)	Carcinoma cervical humano	Pesquisa
MDCK	Rim de cachorro	Produção de vacinas veterinárias
3T3	Tecido conjuntivo de camundongo	Técnicas laboratoriais
Nawalwa	Linfoma humano	α -interferon
WI-38	Pulmão embrionário humano	Produção de vacinas humanas
VERO	Rim de macaco verde africano	Produção de vacinas humanas
MRC-5	Pulmão embrionário humano	Produção de vacinas humanas

(*) Henrietta Lacks, morreu aos 31 anos de um carcinoma uterino. A linhagem de células HeLa isolada na época continua sendo cultivada há mais de 50 anos.

Na hora de passar da escala do laboratório à escala industrial, algumas considerações devem ser levadas em conta. A cultura de células animais exige, além de um cuidado extremado, meios de cultivo complexos e caros, desenvolvendo-se em condições muito rigorosas. Como as células se dividem lentamente (a cada 20 horas aproximadamente), a assepsia deve ser mantida durante períodos prolongados. As concentrações celulares são baixas, o que diminui a produtividade e a rentabilidade do processo. A demanda de oxigênio é alta e as células são muito frágeis e sensíveis ao cisalhamento.

Enquanto algumas células podem crescer livremente em suspensão, como os linfócitos, outras só crescem se houver um suporte. No biorreator, este problema pode ser resolvido de diversos modos: mediante o confinamento das células dentro de membranas semipermeáveis, imobilização em géis ou cápsulas ou fixação sobre suportes, tal como pequenas partículas de 100 a 400 μm em vidro, plástico ou dextrina (Figura 6.8).

Biorreatores de tamanho pequeno (até 15 l) e processos descontínuos apresentam menos problemas de contaminação, já os de maior tamanho (até 1.000 l) exigem a substituição da agitação mecânica por sistemas de tipo *air lift* ou leito fluidificado. Evita-se a apoptose ou morte celular renovando periodicamente parte do meio para retirar os produtos excretados.

Nos últimos anos, as técnicas de cultura *in vitro* de células animais deram um amplo impulso às pesquisas básicas e aplicadas, aos testes de diagnóstico, às técnicas de fertilização *in vitro*, à produção de compostos biológicos (proteínas recombinantes), de tecidos para transplante e de vacinas para uso humano e veterinário. Nos estudos toxicológicos, esta tecnologia substitui, ao menos parcialmente, a experimentação com animais, uma atividade que suscita forte resistência na sociedade devido aos questionamentos éticos levantados.

Estima-se que o mercado gerado pela venda de meios de cultivo, soros e reagente chegará a US\$ 1,86 bilhão em 2010.

CAPÍTULO 8: A TECNOLOGIA DO DNA

AS FERRAMENTAS DISPONÍVEIS

A tecnologia do DNA engloba uma série de procedimentos para extrair, fragmentar, sintetizar, marcar, identificar, amplificar e sequenciar o DNA. Estas técnicas foram desenvolvidas ao longo de uma década (1985-1995), constituindo hoje um conjunto de ferramentas que é utilizado rotineiramente nos laboratórios, geralmente em sistemas automatizados especialmente desenhados para efetuar rapidamente um número altíssimo de operações.

A extração de DNA é um procedimento relativamente simples. De um modo geral, a quebra de paredes e membranas libera o conteúdo celular, do qual se eliminam o RNA e as proteínas antes de separar o DNA, que se precipita com etanol. Uma vez extraído e purificado o DNA, diversos tipos de tratamento são possíveis.

Pelo menos uma trintena de empresas já comercializa diferentes tipos de kits para a extração de ácidos nucleicos, substituindo os protocolos tradicionais por sistemas mais fáceis de automatizar. Estima-se que este mercado alcance um valor de US\$ 158 bilhões, em 2014.

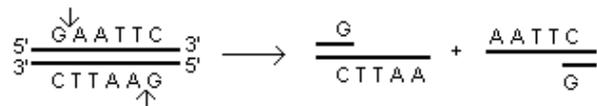
AS NUCLEASES OU ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Entre as numerosas enzimas utilizadas diariamente nos laboratórios, as nucleases merecem atenção especial. Estas enzimas quebram as ligações entre os nucleotídeos de uma cadeia de DNA; algumas começam pelas extremidades eliminando-os um a um; outras cortam a molécula por dentro. Pertencem a este último grupo as "enzimas de restrição", que são capazes de cortar o DNA em sítios específicos.

Normalmente, as enzimas de restrição são produzidas por bactérias, como uma arma de defesa contra o ataque de vírus (bacteriófagos), já que ao cortar o DNA viral impedem sua multiplicação. O DNA bacteriano não é atacado por suas próprias enzimas, seja porque não possui as sequências correspondentes, seja porque estas estão camufladas pela adição de um grupo metila.

Desde sua descoberta por Werner Arber, na década de 1960, já foram isoladas centenas de enzimas de restrição. Todas elas agem como tesouras químicas que cortam o DNA ao reconhecer, como os seus pontos-alvo, determinadas sequências de 4 a 8 bases.

Por exemplo, a enzima EcoRI, cujo nome deriva de "*Escherichia coli* linhagem RY13 (R), primeira endonuclease a ser descoberta I" corta o DNA em dois pedaços com pontas lascadas:

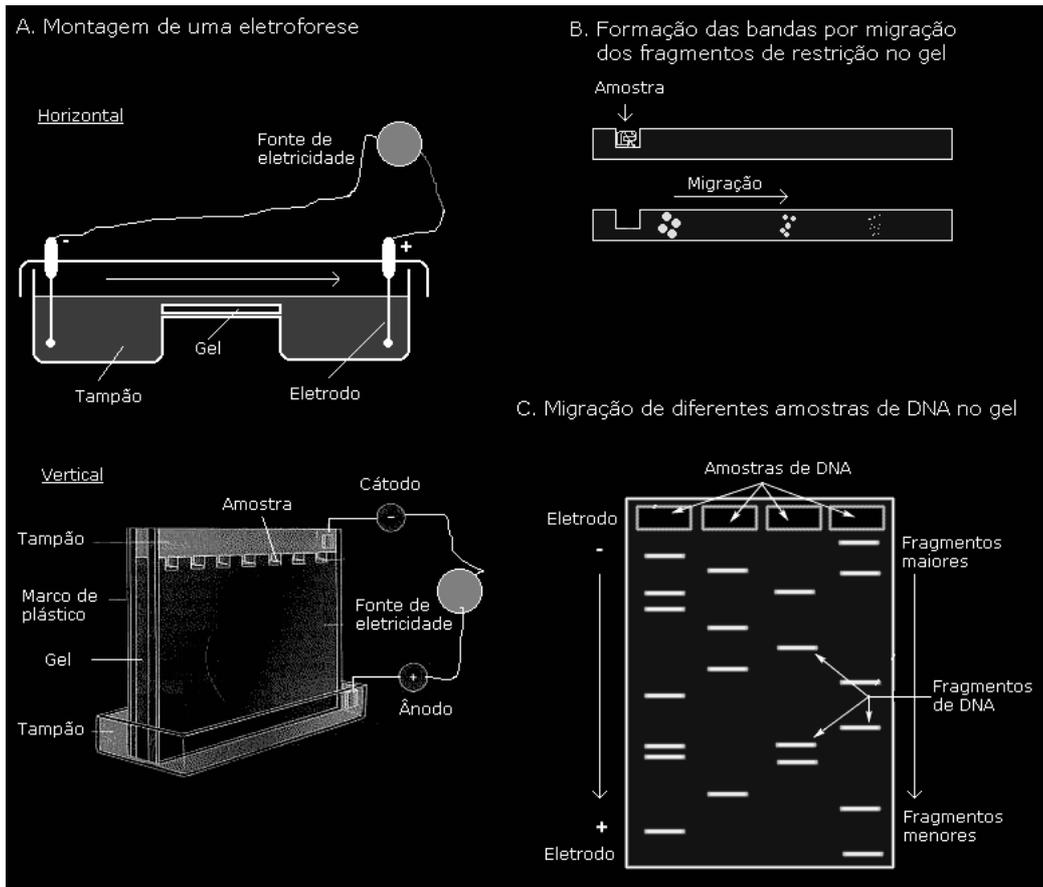


As setas indicam o ponto de corte. Observe-se a existência de um palíndromo, isto é de uma sequência que pode ser lida do mesmo modo nos dois sentidos (5'- 3' ou 3'- 5'), de forma análoga a frases como "Amor a Roma". Assim como há enzimas que cortam o DNA, outras colam os fragmentos (ligases).

A ELETROFORESE DO DNA

A eletroforese separa os fragmentos de DNA obtidos com uma enzima de restrição. As amostras são colocadas em um gel no qual se aplica um campo elétrico. Os fragmentos de DNA carregados negativamente se movimentam na direção do pólo positivo. Ao encontrar uma resistência menor, os fragmentos menores migram mais rapidamente (Figura 8.1).

Figura 8.1: A eletroforese do DNA.

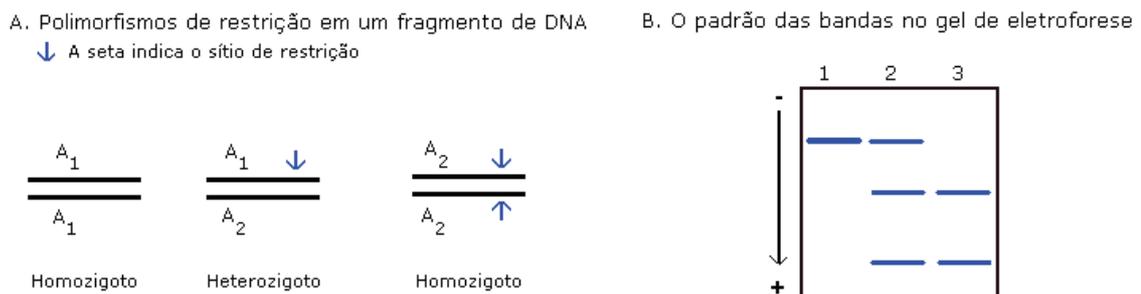


O poder de separação varia com o suporte (gel de agarose ou de poliacrilamida) e com o tamanho do poro, que depende da concentração do meio. Também varia com as características do campo elétrico aplicado. Os fragmentos de restrição formam bandas que podem ser observadas na luz ultravioleta, após coloração com uma substância fluorescente. Fragmentos de tamanho conhecido inseridos no gel, à maneira de uma régua molecular, servem como padrão de comparação para estimar o tamanho das bandas do DNA analisado.

Uma das primeiras aplicações da eletroforese dos fragmentos de restrição foi o estudo dos polimorfismos. A modificação do sítio de restrição de uma molécula de DNA (como, por exemplo, de $G\downarrow AATTC$ para $GAATC$) origina fragmentos de tamanhos diferentes, denominados RFLPs ou *rifleps* (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*). Os RFLPs são marcadores que podem ser estudados do mesmo modo que um gene que determine um caráter visível ou uma modificação bioquímica (Figura 8.2).

Figura 8.2: Polimorfismos de restrição.

Uma mutação pode gerar dois alelos diferentes, A_1 (nenhum sítio de restrição) e A_2 (um sítio de restrição). Na eletroforese, o DNA dos indivíduos A_1A_1 será visualizado como uma banda, o de A_1A_2 como três bandas e o de A_2A_2 como duas bandas.

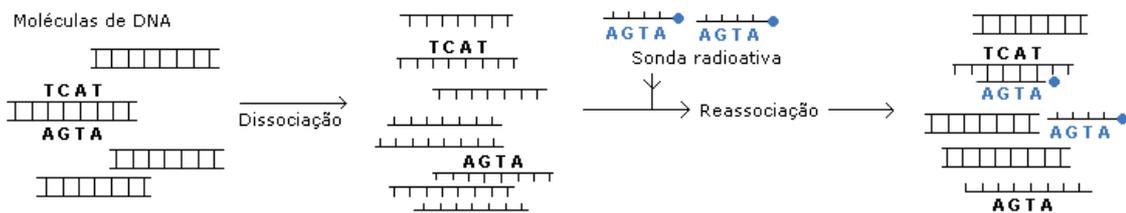


HIBRIDIZAÇÃO E SONDAS GÊNICAS

Quando o DNA é colocado em determinadas condições de temperatura, pH ou concentração salina, os dois filamentos da hélice se separam. A dissociação se deve à quebra das pontes de hidrogênio entre as bases complementares. Voltando às condições iniciais, essas ligações se restabelecem e os filamentos se associam novamente.

A reação de hibridização também ocorre entre filamentos de DNA ou de RNA de diferentes origens e tamanhos, sempre que houver algumas sequências complementares. Em função desta propriedade se constroem filamentos simples, geralmente marcados radiativamente, de DNA ou RNA de sequência conhecida. Estes se usam como sondas para reconhecer a presença de uma sequência complementar em um cromossomo ou em um fragmento de DNA (Figura 8.3).

Figura 8.3: Hibridização de uma sonda com a sequência complementar.



A TÉCNICA DE SOUTHERN

Em 1975, E.M. Southern descreveu um método para analisar fragmentos de restrição, utilizando sondas de DNA. Uma vez separados os fragmentos por eletroforese, transferem-se os fragmentos a uma membrana de náilon ou de nitrocelulose. A hibridização de uma sonda radiativa com o seu alvo é registrada em um filme apropriado (Figura 8.4).

O método, denominado *Southern blotting*, tem sido utilizado para diagnóstico de doenças genéticas, algumas das quais são causadas por mutações que, ao eliminar ou criar um sítio de restrição, modificam o padrão de bandas.

Métodos análogos foram desenhados para estudos de RNA (*Northern blotting*) e de proteínas (*Western blotting*). Observe-se que, no primeiro caso, a sonda pode ser um fragmento de ácido nucleico, mas no segundo a sonda é um anticorpo específico.

O FINGERPRINT

Descrita por A. Jeffreys em 1985, uma variante do método de Southern focaliza as regiões do genoma que não se expressam, acumulando mutações que conferem a cada indivíduo uma sequência única (excetuando-se os gêmeos). Muitas delas representam sequências repetidas que estão dispersas ao longo do genoma.

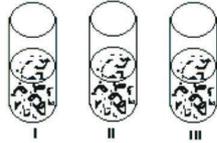
Denominadas VNTR ou *vinters* (do inglês *variable-number tandem repeats*) estas sequências se repetem um número de vezes que pode variar de um cromossomo ao seu homólogo. Sendo assim, os fragmentos de restrição correspondentes terão um tamanho diferente, o que pode ser visualizado por eletroforese (Figura 8.5).

Ao aumentar o número de sondas para o reconhecimento de outros tipos de VNTRs, obtém-se um padrão de bandas individual, parecido com o código de barras do comércio. Assim como as impressões digitais identificam as pessoas, as sondas revelam a identidade genética de cada um de nós. O procedimento, não por acaso chamado de *Fingerprint*, encontrou rápida aplicação tanto na investigação de paternidade (ou maternidade), como na identificação policial ou forense.

Figura 8.4: O método de Southern.

A sonda identifica a homozigose de I (sem sítio de restrição) e de III (com sítio de restrição) e a heterozigose de II (um filamento sem sítio de restrição e o outro com sítio de restrição).

1. Preparação dos fragmentos de restrição



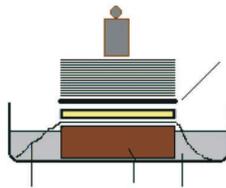
3 amostras de DNA de diferente origem + Enzima de restrição

2. Eletroforese



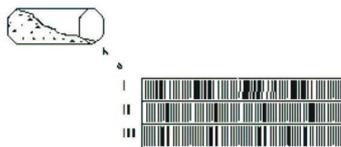
Os fragmentos de restrição são separados por eletroforese.

3. Transferência



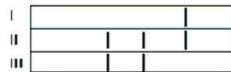
O DNA é desnaturado e os fragmentos unifilamentares são transferidos a uma membrana de nitrocelulose.

4. Sonda Radiativa



Acrescenta-se uma sonda unifilar complementar ao gene procurado. Esta hibridiza com o fragmento portador da sequência complementar.

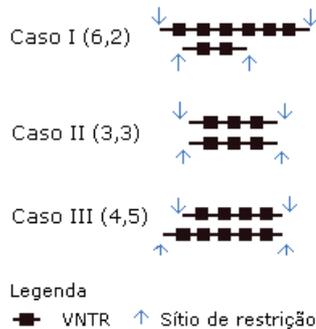
5. Autorradiografia



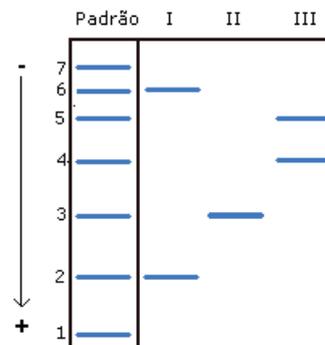
Depois de lavar, para eliminar o excesso de reagente, coloca-se sobre o filtro um filme sensível à radiatividade.

Figura 8.5: Os polimorfismos de VNTRs.

A. Número de VNTRs presentes no mesmo fragmento de restrição, em 3 indivíduos



B. Separação dos fragmentos de restrição (eletroforese)

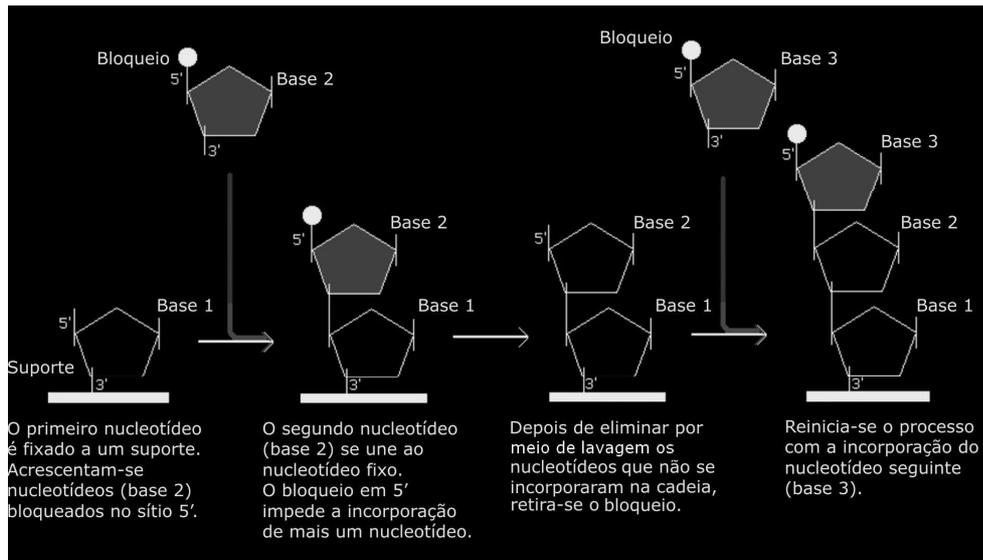


A SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DE DNA

SÍNTESE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

A síntese de oligonucleotídeos de DNA e RNA se desenvolve hoje em máquinas automatizadas (sintetizadores) capazes de construir, em poucos minutos, moléculas com dezenas de pares de bases (Figura 8.6). Estes oligonucleotídeos podem ser utilizados como sondas ou como *primers* para a PCR (ver um pouco mais adiante).

Figura 8.6: A síntese de oligonucleotídeos.



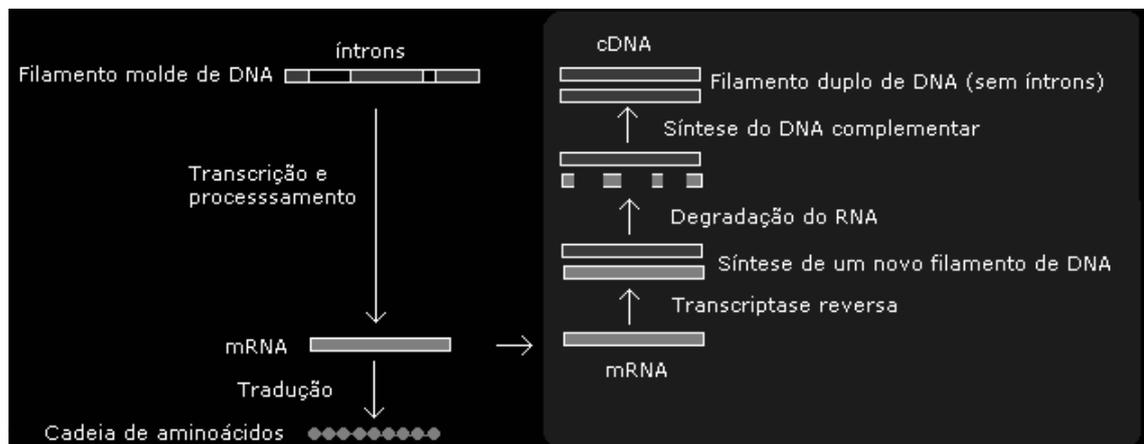
SÍNTESE DE cDNA

Uma enzima de origem viral transcreve a informação genética no sentido RNA → DNA. Esta enzima, denominada transcriptase reversa, normalmente garante aos vírus com genoma de RNA sua multiplicação no hospedeiro (como o HIV, por exemplo).

O rRNA e os tRNAs podem ser isolados facilmente devido a seu tamanho; o mRNA, por sua vez, deve ser isolado dos tecidos onde se expressa. O mRNA da proteína da seda ou fibroína, por exemplo, se extrai das glândulas salivares do bicho-da-seda.

Como ferramenta de laboratório, a transcriptase reversa possibilita a construção de filamentos de DNA complementares (cDNA) a qualquer molécula de RNA (Figura 8.7). Note-se que, diferente do gene original, não haverá íntrons no cDNA reconstruído a partir de RNA.

Figura 8.7: A síntese de cDNA por transcriptase reversa.



A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) é um procedimento que permite obter milhões de cópias de DNA em poucas horas (Figura 8.8). Para isso, se precisa do DNA que contenha a sequência que se deseja amplificar, de desoxinucleotídeos dos quatro tipos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), de uma polimerase de DNA e dos *primers* correspondentes. Estes são pequenos fragmentos sintéticos de DNA, complementares às extremidades da sequência-alvo, sendo indispensáveis para que a polimerase comece a sintetizar o filamento de DNA.

A chave do processo é a DNA-polimerase, uma enzima estável a altas temperaturas que permite à bactéria *Thermus aquaticus* sobreviver em águas termais. Atualmente, esta enzima se produz por engenharia genética.

Em um ciclo pontuado por mudanças de temperatura, os filamentos de DNA são dissociados e anelados com os *primers*, possibilitando que a polimerase sintetize o resto da sequência. Repetindo muitas vezes o ciclo, gera-se em pouco tempo um número altíssimo de cópias que podem ser utilizadas em qualquer tipo de análise.

Uma das grandes vantagens da PCR é que não há necessidade de isolar previamente o fragmento a ser amplificado, bastando conhecer as extremidades da sequência e escolher os *primers* adequados. Desenvolvendo-se de forma totalmente automatizada, o procedimento admite múltiplas variantes.

A empresa Cetus comprou de seu inventor, K. Mullis, a patente da PCR por U\$S 10.000, vendendo-a pouco tempo depois a Hoffmann-LaRoche por U\$S 300 milhões; hoje se trata de uma técnica corriqueira em qualquer laboratório de Biologia Molecular e provavelmente nenhum dos dois fez um bom negócio. Mais tarde, em 1993, K. Mullis recebeu o Prêmio Nobel pela invenção da PCR.

Como assinalado anteriormente em relação aos sintetizadores de oligonucleotídeos, uma das chaves do êxito da PCR é o fato de ser um procedimento automatizado que se desenvolve em máquinas rápidas e eficientes, resultado da integração da Biologia Molecular com a Informática e a Eletrônica.

O sucesso da PCR se deve a sua extraordinária versatilidade, permitindo que seja utilizada, com objetivos diversos, em campos tão diferentes como a agricultura, a medicina veterinária, os estudos ambientais, os testes de diagnóstico e a medicina forense. Entre suas muitas aplicações, cabe citar também os estudos antropológicos e evolutivos, tais como a extração de ADN de múmias egípcias, de animais extintos como o *quagga* (um tipo de zebra) ou de insetos presos em âmbar 40 milhões de anos atrás.

Figura 8.8: A reação em cadeia da polimerase.

Uma máquina de PCR pode desenvolver 25 ciclos em menos de uma hora, amplificando 10^5 vezes o fragmento de DNA.

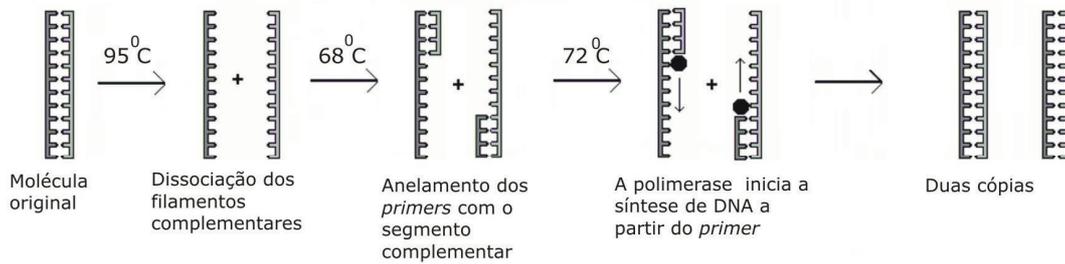
A. OS ELEMENTOS NECESSÁRIOS



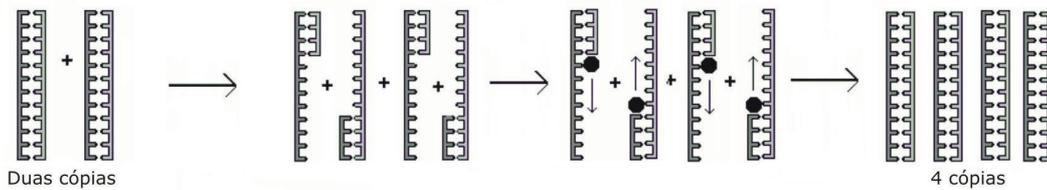
Os *primers* são pequenos fragmentos de DNA, complementares às extremidades da sequência que se quer amplificar e indispensáveis para que a enzima DNA-polimerase inicie a síntese de DNA.

B. A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

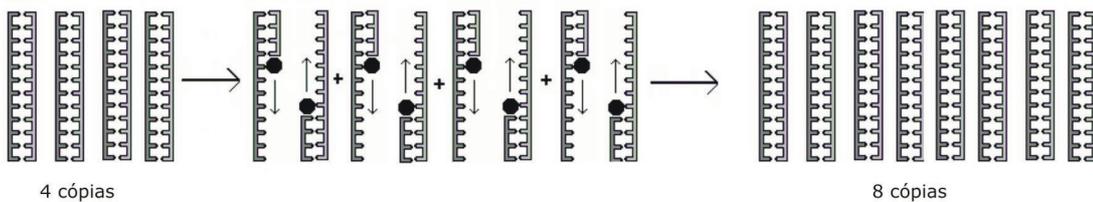
PRIMEIRO CICLO



SEGUNDO CICLO



TERCEIRO CICLO



O SEQUENCIAMENTO DO DNA

Desenvolvido por F. Sanger em 1977, o sequenciamento de um fragmento de DNA é, também, um procedimento de tipo iterativo, possibilitando a construção de máquinas capazes de realizar rapidamente a tarefa (Figura 8.9).

Existem sequenciadores automatizados em que o gel é colocado nos capilares por um braço-robô que acrescenta o DNA e efetua a limpeza depois da eletroforese. No ano 2000, tais braços permitiam o tratamento de uma centena de amostras em 4 horas, sem exigir mais do que 15 minutos diários de atenção humana.

Uma vez determinada a sequência de várias amostras, inicia-se a montagem da informação armazenada nos bancos de dados. Esta etapa se realiza em supercomputadores, exigindo um tratamento matemático para ordenar as sequências, preencher as lacunas e verificar os dados. Calculava-se que, no auge do estudo do genoma humano, uma empresa ligada a Celera (Biosystems Applied) mantinha os computadores funcionando dia e noite, chegando a gastar US\$ 1.000.000 mensais com eletricidade.

As técnicas de sequenciamento estão evoluindo muito rapidamente (pirosequenciamento). Os métodos atuais são 500 vezes mais rápidos que os da década passada, tendo caído o custo por par de bases sequenciado de US\$ 25, em 1990, a US\$ 0,00075, em 2006.

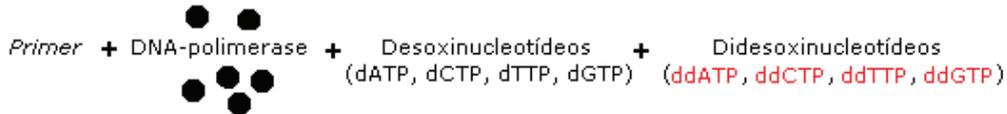
Figura 8.9: O sequenciamento de um fragmento de DNA.

Um sistema automatizado permite identificar, na corrida eletroforética, cada um dos quatro dideoxinucleotídeos, fornecendo diretamente a sequência do fragmento sequenciado.

1. Preparar numerosas cópias do fragmento a sequenciar (tamanho aproximado: 500 pares de bases)

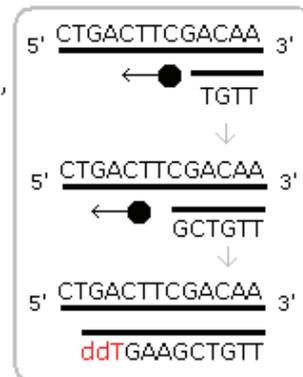


2. Incubar a preparação com as substâncias necessárias para a síntese de filamentos complementares e acrescentar alguns nucleotídeos, na forma dideoxi, marcados com substâncias fluorescentes de diferente cor.

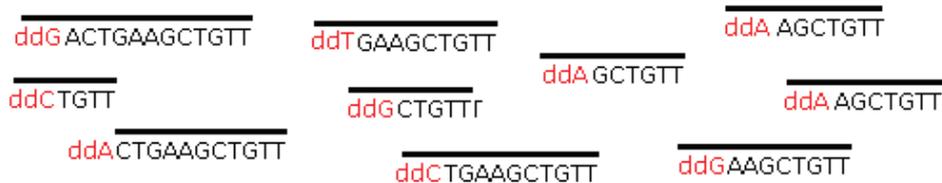


3. Iniciar a síntese dos filamentos complementares que será bloqueada quando, em vez de um desoxinucleotídeo, se incorporar um dideoxinucleotídeo, porque estes não formam ligações fosfodiéster

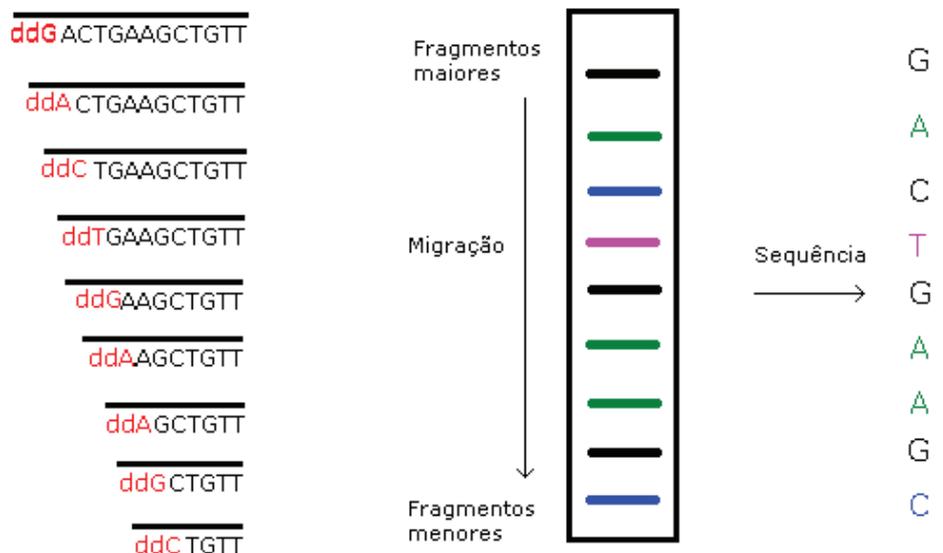
Síntese bloqueada devido à incorporação de ddTP



4. Depois de vários ciclos teremos fragmentos de todos os tamanhos



5. Os fragmentos são separados por eletroforese; o sequenciador identifica cada um deles pela fluorescência do nucleotídeo dideoxi incorporado e fornece a sequência.



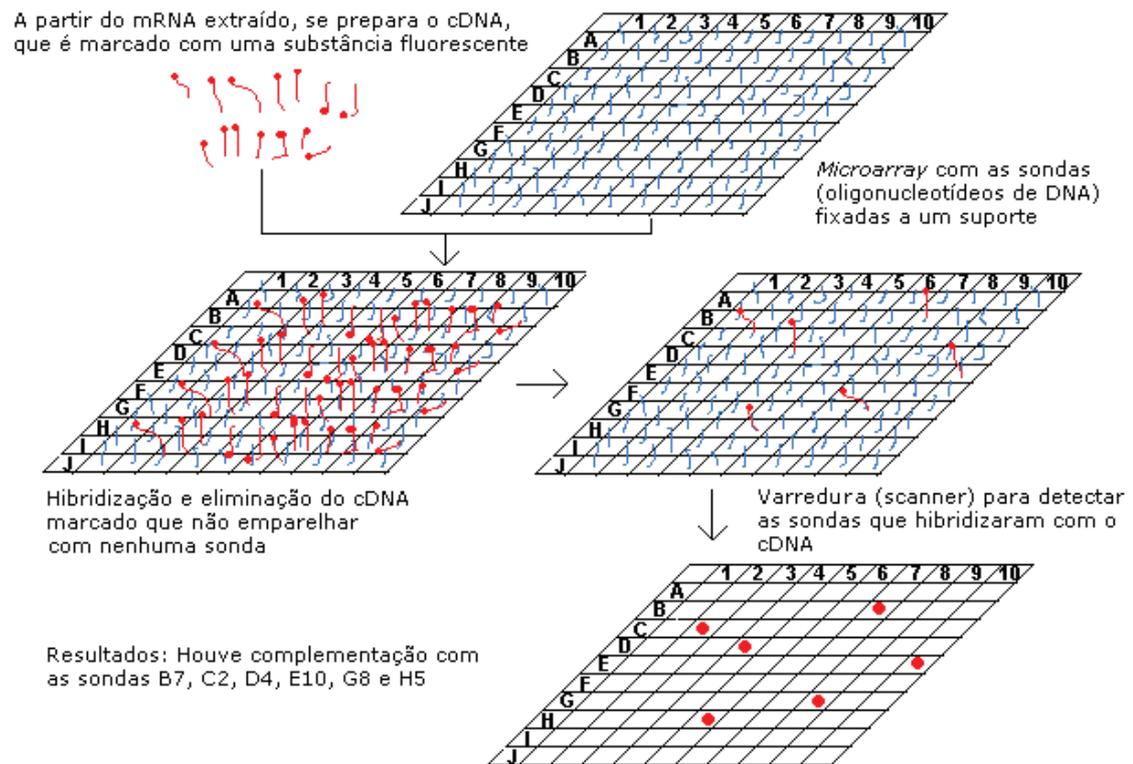
OS ARRAYS

Em consequência do conhecimento acumulado sobre o genoma do homem e de outros organismos, já podem ser estudados alguns aspectos relacionados com a expressão e a interação dos genes. Lidar com um número enorme de informações demanda novos avanços tecnológicos, entre os quais a construção de *chips de DNA* e *microarrays*.

Os *microchips* são pequenas placas de vidro, náilon ou sílica com centenas de sondas por cm^2 , fixadas mediante diferentes tecnologias (robótica, fotolitografia). Coloca-se a amostra, marcada com um corante fluorescente, sobre a placa; as moléculas complementares a alguma das sondas ficarão grudadas, as restantes serão eliminadas na lavagem posterior. Os pontos onde ocorreu a hibridização são identificados por varredura com um raio laser e um software apropriado para o tratamento da informação (Figura 8.10).

Figura 8.10: Fundamentos da tecnologia de *arrays*.

Se as sondas representarem ESTs, saberíamos que os genes representados por B7, C2, D4, E10, G8 e H5 estão ativados. O tamanho das sondas depende da tecnologia utilizada na construção do *array*. Observe-se que cada uma das sondas representadas no desenho corresponde a um conjunto de moléculas semelhantes.



Escolhem-se as sondas entre os genes codificadores de proteínas que se expressam na célula. Desse modo, se excluem os genes que correspondem ao rRNA, aos tRNAs, às seqüências de controle e ao DNA extragênico. A escolha de seqüências transcritas, denominadas ESTs (do inglês, *expressed sequence tags*), aumenta as chances de detectar os genes que participam de alguma resposta patológica.

Atualmente, a tecnologia é utilizada para diversos tipos de análise de DNA e RNA, como, por exemplo:

- Determinar quais os genes ativados em um tecido, em um momento do desenvolvimento ou em um estado fisiológico, como o sono.
- Comparar as sequências de dois alelos, um deles normal e o outro associado a alguma patologia.
- Determinar qual o medicamento adequado para um paciente.
- Prever o risco de uma pessoa adoecer se ela for exposta a determinada substância etc.

Numerosas empresas fabricam *arrays* comercialmente; algumas estimam que em pouco tempo serão construídos *arrays* do tamanho de uma moeda, contendo todo o genoma humano. É difícil prever os alcances desta tecnologia tão promissora, mas os analistas estimam que, até 2012, o mercado chegará a 1,47 bilhão de dólares por ano.

CAPÍTULO 9: A ENGENHARIA GENÉTICA

O NASCIMENTO DA BIOTECNOLOGIA MODERNA

A Genética e a Biologia Molecular se desenvolveram rapidamente ao término da Segunda Guerra Mundial. Em um período de 25 anos, foram esclarecidos temas de enorme importância: a estrutura dos ácidos nucleicos, o código genético, a ação dos agentes mutagênicos, a genética dos microrganismos, a estrutura e a síntese das proteínas, a regulação gênica etc. É nesse contexto de rápidos avanços que devemos situar as primeiras experiências que deram origem à tecnologia do DNA-recombinante, também chamada de engenharia genética.

A utilização da palavra "recombinante" nos remete à recombinação gênica, um fenômeno que ocorre normalmente durante a meiose, devido à permuta de fragmentos cromossômicos homólogos. Mediante o corte e a união de pequenos pedaços de DNA, a engenharia genética cria novas combinações de genes, pertencentes ou não a indivíduos de uma mesma espécie.

A engenharia genética é um instrumento valioso para o estudo dos genomas, a produção de proteínas em organismos modificados geneticamente e a geração de organismos transgênicos com propriedades novas.

AS PRIMEIRAS EXPERIÊNCIAS

Em 1972, na Universidade de Stanford (Califórnia), Paul Berg conseguiu associar o DNA de dois microrganismos diferentes, formando uma molécula mista de DNA. Na mesma Universidade, Stanley Cohen especializava-se na biologia dos plasmídeos microbianos, pequenas moléculas de DNA circular, portadoras de alguns genes capazes de se replicar de maneira autônoma. E, na Universidade de Califórnia (San Francisco), Herbert Boyer isolava a primeira das enzimas de restrição que corta o DNA em fragmentos com pontas lascadas, uma característica que simplifica a tarefa de associar ("colar") os pedaços.

S. Cohen e H. Boyer se encontraram em uma conferência científica no Havaí. A ideia de uma colaboração entre ambos teria surgido uma noite, diante da praia de Waikiki, em redor de sanduíches e cervejas. As experiências conjuntas começaram assim que eles regressaram a seus laboratórios em San Francisco.

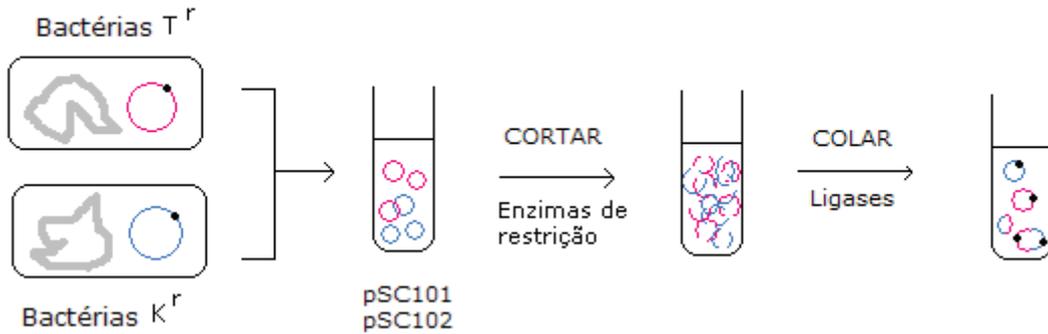
Boyer dispunha da enzima de restrição EcoRI, Cohen de dois plasmídeos, um deles com um gene de resistência a kanamicina (pSC102) e o outro com um gene de resistência à tetraciclina e um sítio de restrição para EcoRI (pSC101). Na primeira experiência, os pesquisadores abriram o pSC101 e inseriram fragmentos do pSC102, utilizando a enzima de restrição e uma ligase como "tesoura" e "cola". A seguir, eles introduziram este plasmídeo quimérico na bactéria *Escherichia coli*. A seleção de clones resistentes a ambos antibióticos (tetraciclina e kanamicina) mostrou o sucesso do experimento (Figura 9.1).

Boyer e Cohen repetiram a experiência, mas em vez de inserir no plasmídeo um pedaço de DNA bacteriano, eles planejaram colocar um fragmento de DNA do sapo *Xenopus laevis*. Com esse objetivo, selecionaram um gene codificador de rRNA no DNA do sapo e o inseriram no plasmídeo pSC101. Introduzido o plasmídeo recombinante na bactéria *Escherichia coli*, esta começou a sintetizar rRNA de *Xenopus* (Figura 9.2).

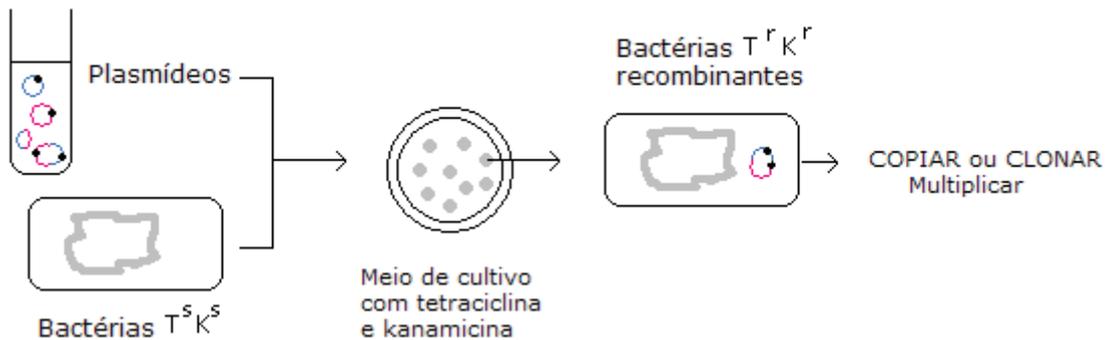
A extraordinária novidade do experimento está na transferência de genes de uma espécie para outra bem distante na escala evolutiva; um fenômeno limitado na natureza a uma mesma espécie ou a espécies muito próximas.

Figura 9.1: A experiência que deu origem à engenharia genética: cortar, colar, copiar.

1. Preparação dos plasmídeos recombinantes



2. Transferência dos plasmídeos e seleção das bactérias recombinantes

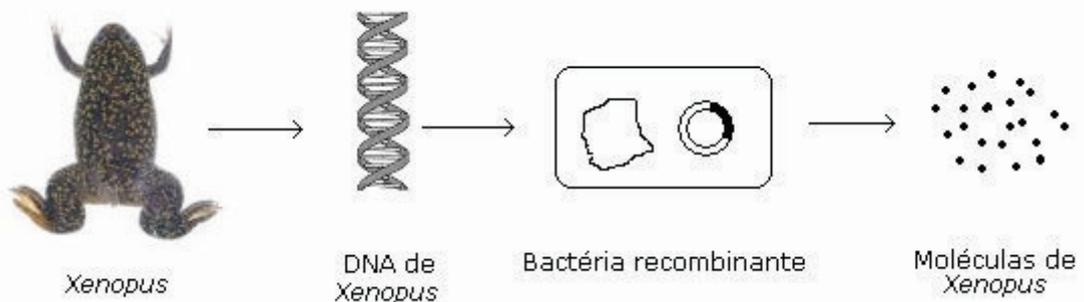


Legenda

T: tetraciclina, T^s: sensível à tetraciclina, T^r: resistente à tetraciclina, K= kanamicina, K^s: sensível à kanamicina, K^r: resistente à kanamicina, pSC101: plasmídeo de Stanley Cohen nº 101; pSC102: plasmídeo de Stanley Cohen nº 102.

Figura 9.2: Sapobacter ou Bactosapo?

Com a entrada de um plasmídeo recombinante, com DNA de *Xenopus*, em uma bactéria, esta passa a sintetizar algumas moléculas características de *Xenopus*.



Fragments of amplified *Xenopus laevis* DNA, coding for 18S and 28S ribosomal RNA and generated by EcoRI restriction endonuclease, have been linked in vitro to the bacterial plasmid pSCI01; and the recombinant molecular species have been introduced into *E. coli* by transformation. These recombinant plasmids, containing both eukaryotic and prokaryotic DNA, replicate stably in *E. coli*. RNA isolated from *E. coli* minicells harboring the plasmids hybridizes to amplified *X. laevis* rDNA.

Extraído de: Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli* (MORROW J.F., COHEN S.N., CHANG A.C. Y., BOYER H.W., GOODMAN H.M.E R.B. HELLING. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:5, 1974

MITOS E REALIDADE

As infinitas possibilidades da tecnologia do DNA-recombinante despertaram alguns dos antigos mitos. Por desobedecer a Zeus, entregando o fogo ao homem, Prometeu sofreu o terrível castigo de ser acorrentado a uma montanha e ter o fígado devorado por uma águia. Instrumento da vingança divina, Pandora abriu a caixa da qual saíram todos os males da humanidade. A ambiguidade da nova biotecnologia, com os seus desafios e promessas, costuma ser representada nas duas faces de Janus, um rei com o dom de ver simultaneamente o passado e o presente.

Em 1974, Paul Berg e mais nove pesquisadores publicaram uma carta nas revistas científicas *Science*, *Nature* e *Proceedings of the National Academy of Science*, alertando os colegas sobre os possíveis riscos da nova tecnologia e pedindo uma moratória sobre os experimentos com DNA, até serem estabelecidos os cuidados e salvaguardas necessárias. Considerando que "o uso desta tecnologia apresenta vários riscos possíveis porque novos tipos de organismos, alguns deles potencialmente perigosos, podem ser introduzidos no ambiente, se não existirem os devidos controles", o *National Institute of Health* (NIH) formou o *Recombinant DNA Advisory Committee* (RAC).

Em 1975, a conferência de Asilomar (Monterrey, Califórnia), reunindo 139 pesquisadores de 17 países, classificou os experimentos em função do risco (baixo, médio ou alto), pedindo a suspensão dos experimentos de alto risco enquanto não se determinassem quais as formas de contenção adequadas, tanto físicas como biológicas. Enfatizava-se também a necessidade de trabalhar com microrganismos enfraquecidos, incapazes de sobreviver fora do laboratório.

Em 1976, o RAC publicou um conjunto de normas de trabalho que, além de revisadas periodicamente, devem ser seguidas por todos os pesquisadores e instituições que recebam dinheiro do NIH para pesquisas com DNA-recombinante.

Com base nos trabalhos publicados em 1973, a Universidade de Stanford obteve uma patente que lhe rendeu U\$S 300 milhões, divididos com a Universidade da Califórnia em San Francisco. A Universidade de Stanford licenciou o uso da tecnologia a mais de 400 empresas, entre as quais Amgen, Eli Lilly, Genentech, Johnson & Johnson e Schering Plough. Qual o invento patenteado? O processo ou ferramenta biotecnológica que consiste em inserir um DNA exógeno em um plasmídeo bacteriano e este em uma bactéria, que se transforma assim em uma fábrica capaz de reproduzir esse gene em quantidades ilimitadas.

Nesta breve recapitulação do nascimento da Biotecnologia moderna, vale destacar a preocupação com a segurança, mostrada oportunamente pelos pesquisadores e as instituições científicas envolvidas. Não há na história da ciência ou da tecnologia um episódio de responsabilidade coletiva comparável ao da Conferência de Asilomar. Paralelamente a sua exploração comercial, a engenharia genética é utilizada atualmente em centenas de laboratórios de universidades e institutos de pesquisa. E mais de trinta anos depois não há registro ou relato de nenhum acidente relacionado com essa tecnologia. Talvez valha a pena lembrar que Prometeu foi liberado depois de 30 anos, e que bem no fundo da caixa de Pandora estava a esperança.

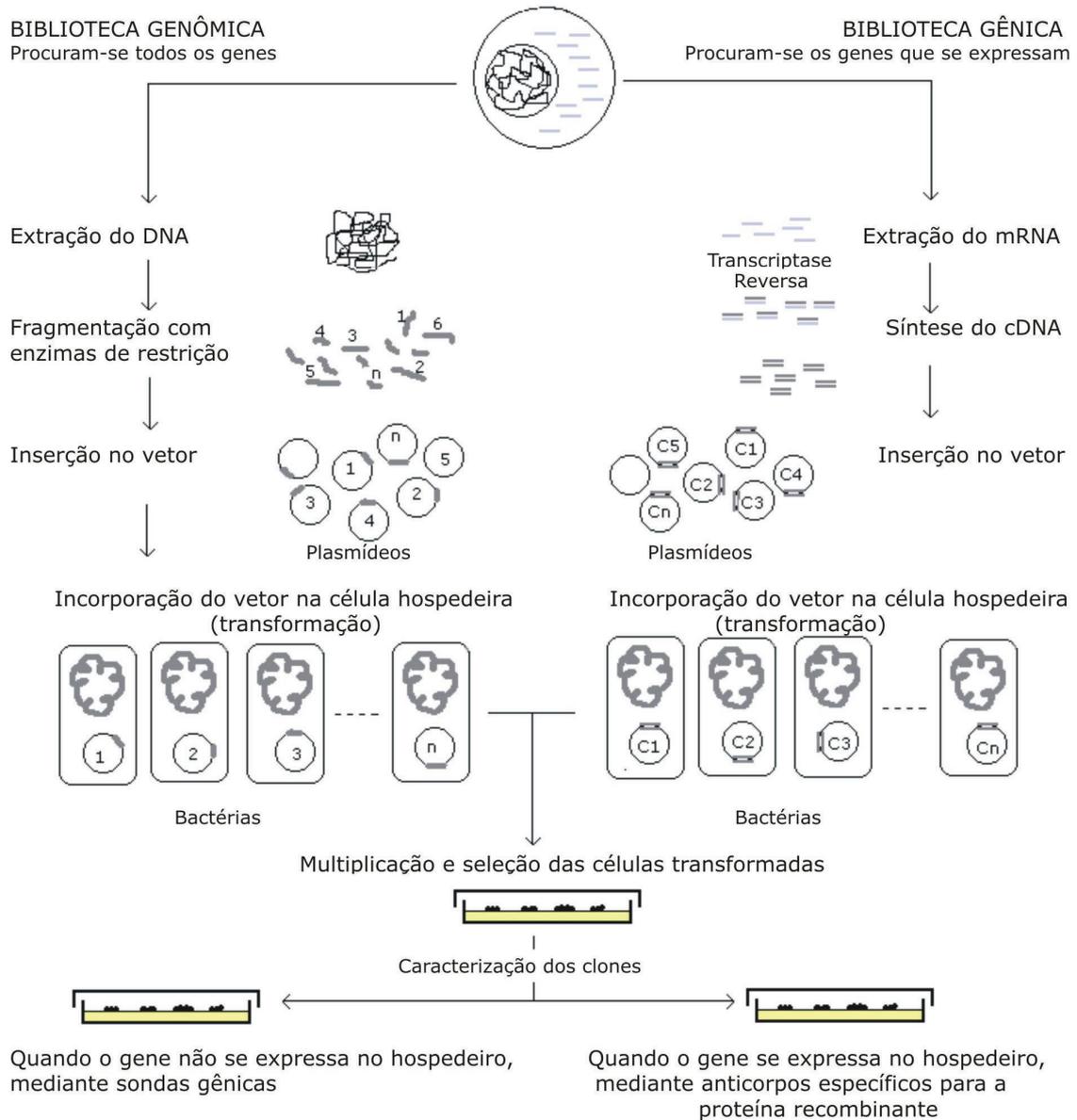
AS BIBLIOTECAS DE GENES

O enorme tamanho de um genoma dificulta tanto o mapeamento como a localização de um gene. Uma forma de facilitar a manipulação é extrair o DNA de um organismo determinado, cortá-lo com enzimas de restrição, inserir os fragmentos em plasmídeos e introduzir os plasmídeos recombinantes em bactérias. Cada bactéria formará um clone e cada clone levará um fragmento do genoma do organismo estudado. O conjunto de clones representa o genoma inteiro de um organismo, constituindo uma biblioteca genômica (Figura 9.2).

Boa parte do DNA é "lixo" e não leva genes. Por isso, um procedimento alternativo é a montagem de uma biblioteca gênica, incluindo exclusivamente os genes que se expressam, ou seja, os genes responsáveis pela síntese de proteínas. Separa-se o mRNA codificador, e, com a enzima transcriptase reversa, se constroem as moléculas correspondentes de cDNA. Inserem-se estas em plasmídeos, e os plasmídeos em bactérias. Com este procedimento, obviamente, o número de clones na biblioteca será menor (Figura 9.2).

Figura 9.2: A construção de bibliotecas de genes.

A triagem dos clones pode ser feita reconhecendo a "etiqueta" representada por uma sequência conhecida no DNA (STS, ou *sequence tagged site*; ESTs, ou *expressed sequence tagged*); no caso do gene se expressar, a triagem também pode ser feita com anticorpos específicos para a proteína sintetizada.



De fato, o número de clones depende não só do número de genes como do tamanho do fragmento que o vetor pode carregar. Como os plasmídeos bacterianos e o bacteriófago λ só transportam fragmentos pequenos de DNA de 10 kb a 20 kb, outros vetores genéticos foram especialmente desenhados para carregar fragmentos maiores (cosmídeos, YACs ou *yeast artificial cromossomes*, BACs ou *bacterial artificial cromossomes*, transposons etc.).

A construção de bibliotecas de genes representa o primeiro passo para o mapeamento de um genoma. Ao sequenciamento dos fragmentos segue a montagem da informação. Trata-se de uma etapa complexa em que se alinham as sequências, se preenchem lacunas e se verificam os dados.

O tratamento matemático das informações demanda algoritmos sofisticados e computadores poderosos. Uma vez organizada a sequência, esta é armazenada em bancos de dados. O usuário tem acesso através da Internet, mediante programas especializados que acumulam uma enorme quantidade de informações.

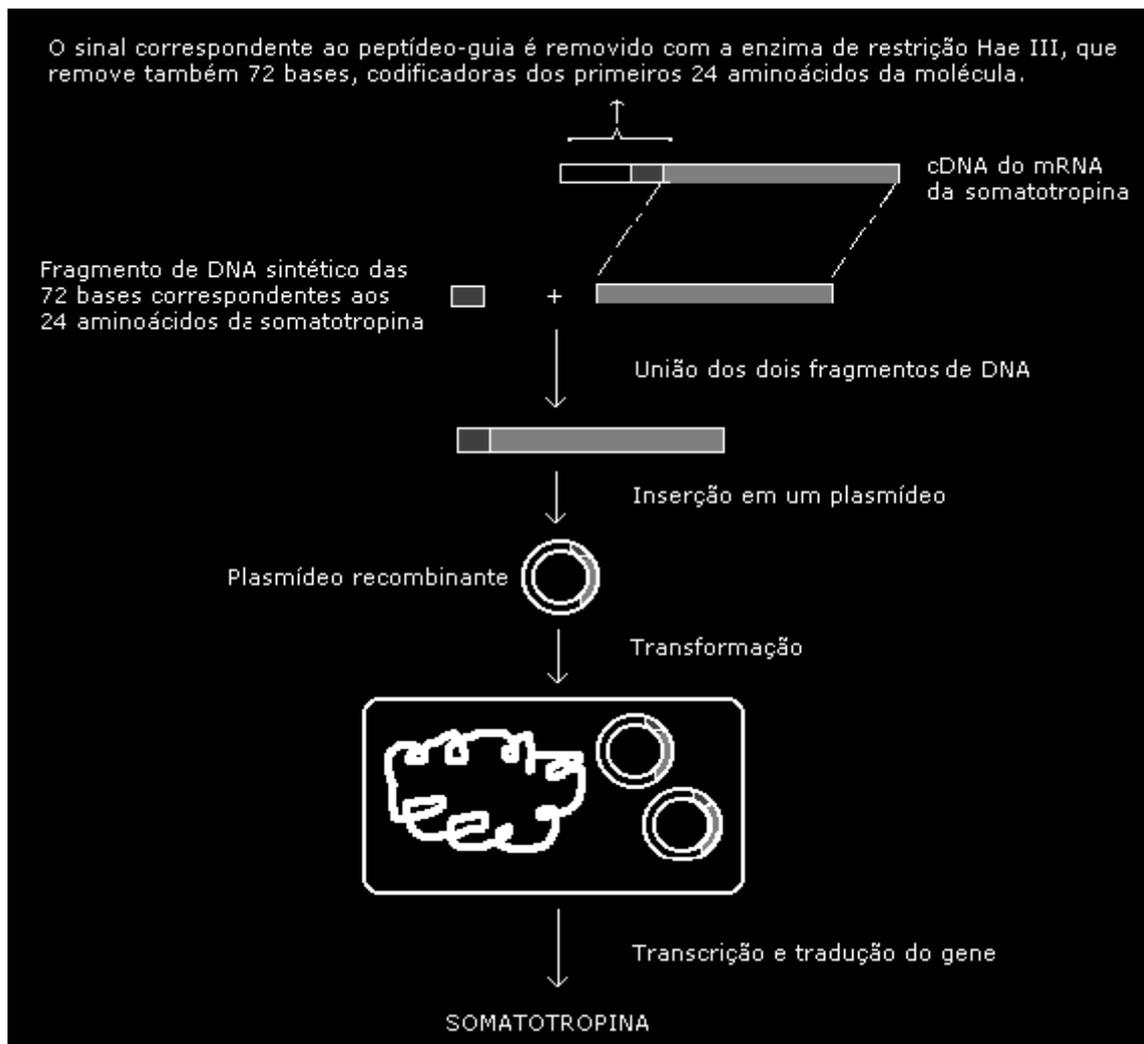
A CONSTRUÇÃO DE UM MICRORGANISMO RECOMBINANTE

Uma das primeiras proteínas de origem recombinante foi a somatotropina ou hormônio de crescimento. Como a enzima de restrição eliminava do cDNA, além da sequência codificadora do peptídeo-guia, os nucleotídeos correspondentes aos primeiros aminoácidos da molécula, estes tiveram que ser acrescentados quimicamente, em um processo extremamente engenhoso (Figura 9.3).

A transferência de um gene de uma espécie permite obter microrganismos que sintetizem alguma substância diferente, geralmente visando o cultivo em grande escala. O gene de interesse costuma ser selecionado e estudado na bactéria de laboratório *Escherichia coli* e, posteriormente, transferido à espécie na qual se pretende produzir a proteína correspondente.

Além de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae*, existem vários outros microrganismos que são habitualmente utilizados como hospedeiros: *Bacillus subtilis*, *Picchia pastoris*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* etc. Estes microrganismos são utilizados na produção de fármacos (insulina, hormônio de crescimento, vacinas) ou de enzimas (quimosina) e, também, na degradação de poluentes.

Figura 9.3: A produção de somatotropina por engenharia genética.



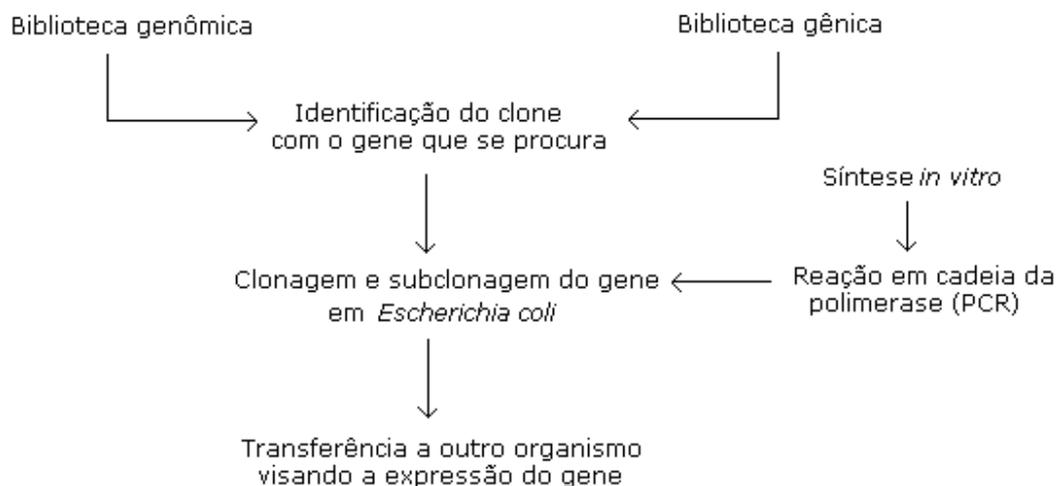
ENCONTRAR O GENE

De um modo geral, encontrar um gene equivale a procurar agulha em palheiro. O gene pode ser localizado por triagem dos clones de uma livraria gênica ou genômica (Figura 9.2). Se esta não existir, pode ser necessário construí-la, em uma primeira rodada de clonagem, para encontrar o gene de interesse.

A segunda dificuldade está na obtenção de numerosas cópias desse gene. Uma solução é a multiplicação do clone correspondente e posterior isolamento do gene procurado. Outra é a amplificação do gene mediante a PCR, sempre que se conheçam as sequências iniciais e finais ou, eventualmente, as sequências adjacentes à região onde está inserido. Se a sequência do gene for conhecida e relativamente curta, podem-se construir cadeias curtas de oligonucleotídeos e associá-las, formando um gene sintético que será amplificado por PCR. Existem numerosas estratégias, que dependem do caso e, também, das características e possibilidades do laboratório (Figura 9.4).

Seja qual for o caminho seguido, uma vez que as cópias do gene de interesse forem obtidas, estas terão que ser transferidas ao hospedeiro definitivo.

Figura 9.4: Algumas estratégias possíveis de clonagem.



INSERIR O GENE

Vetores de expressão gênica

A transferência de um fragmento estranho de DNA se vê facilitada pela utilização de vetores. Um vetor é uma molécula de DNA que se duplica de maneira autônoma dentro de uma célula, carregando vários genes, entre os quais alguns marcadores que permitam reconhecer sua presença dentro da célula. É no vetor que será inserido o fragmento de DNA estranho, para multiplicação ou integração no genoma.

Além dos plasmídeos (bacterianos e de leveduras) e os bacteriófagos (λ , m13), também se utilizam como vetores os transposons, que são elementos genéticos móveis capazes de pular de um lugar a outro do genoma, espalhando ou não cópias. Construídos em função das necessidades, existem hoje vetores bacterianos, vetores de leveduras e vetores bifuncionais que podem ser utilizados tanto em bactérias como leveduras.

As primeiras experiências de Engenharia Genética foram feitas na bactéria *Escherichia coli*, um microrganismo muito conhecido e fácil de se cultivar no laboratório. Porém, *Escherichia coli* não é o organismo ideal para a expressão de genes eucarióticos. Células procarióticas e eucarióticas diferem em relação ao processamento do mRNA e às modificações das proteínas depois da tradução. Por este motivo, quando se procura expressar genes de mamíferos, *Escherichia coli* é substituída por outras células eucarióticas, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo utilizado há séculos na produção de alimentos e bebidas.

Para que um gene se expresse em uma célula hospedeira, é necessário que esta reconheça seus próprios sinais de expressão. Para poder sintetizar uma proteína exógena, a célula deverá ler a sequência codificadora com seus próprios sinais de transcrição (promotor) e de tradução (sítio de ligação com o ribossomo, término de leitura).

O ideal é construir um vetor que já contenha os genes marcadores para seleção ou reconhecimento, os sítios de restrição, uma sequência promotora e os sinais adequados de início e fim da transcrição. Ao colocar a sequência codificadora da proteína, o vetor funciona como um "cassete" de expressão (Figura 9.5).

Outros fatores adicionais intervêm na construção de um vetor de expressão. Um promotor forte, por exemplo, permitirá sintetizar uma quantidade grande de proteína, o que será interessante comercialmente se esta for uma enzima. Entretanto, se a proteína em questão for uma toxina que possa afetar o hospedeiro, será preferível escolher um promotor fraco. Uma possibilidade interessante é a utilização de um promotor que responda a um fator externo controlável (substrato, temperatura), de maneira tal que o gene possa ser ligado ou desligado no momento que se considere conveniente.

Finalmente, também deve ser considerado o destino da proteína dentro da célula; se esta for secretada haverá que acoplar na construção gênica um gene de sinalização, que a leve até a membrana celular.

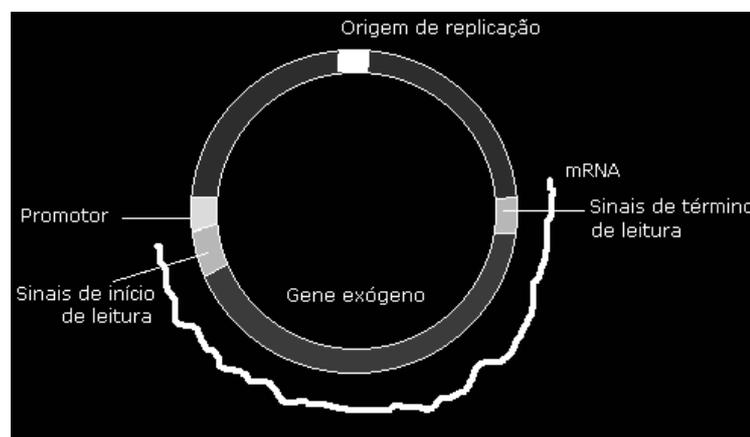
Transformação e transfecção

Existem diversos métodos para inserir o DNA recombinante dentro da célula. Facilita-se a entrada do DNA com algumas manipulações, tais como a adição de CaCl_2 no meio e/ou a modificação da temperatura. A aplicação de forças elétricas também aumenta as chances do DNA penetrar na célula, ao abrir os poros da membrana (eletroporação).

Os plasmídeos atravessam a membrana celular em um processo denominado transformação, que ocorre em determinadas condições fisiológicas da célula hospedeira. Em se tratando de vetores virais, a infecção da célula promove a entrada do DNA exógeno dentro da célula. Fala-se neste caso de transfecção (*transformação + infecção*).

Figura 9.5: A estrutura de um vetor de expressão.

Este deve incluir os elementos genéticos da célula hospedeira para a transcrição e tradução.



IDENTIFICAR OS MICRORGANISMOS RECOMBINANTES

A tecnologia do DNA-recombinante está baseada em fenômenos que ocorrem em frequências muito baixas. A existência de métodos de seleção eficientes possibilita detectar e recuperar aquelas células que incorporaram um gene estranho.

Associa-se o gene estranho a um marcador seletivo como, por exemplo, um gene de resistência a algum antibiótico. Em presença deste, só poderão se multiplicar e formar clones ou colônias as células que incorporaram ambos os genes. Entretanto, o uso de genes de resistência a antibióticos é considerado polêmico, porque existe uma possibilidade remota dos genes serem transferidos das bactérias transformadas para as bactérias do ambiente.

Também podem ser utilizados como marcadores seletivos os genes que codificam a síntese de um aminoácido. Neste caso, a seleção do microrganismo recombinante ocorre em um meio sem esse aminoácido.

Além dos marcadores seletivos, os pesquisadores contam com outro tipo de marcadores que permite identificar as bactérias transformadas e, também, acompanhar a expressão de um gene no organismo modificado. Destacam-se entre estes marcadores, ou genes repórteres: GAL e GUS, respectivamente o gene da β -galactosidase e o gene da glucuronidase que transformam o substrato correspondente em um composto colorido; GFP, um gene da medusa *Aequorea Victoria*, que sintetiza uma proteína fluorescente, verde brilhante na luz ultravioleta; LUC, o gene da luciferase, uma enzima dos vaga-lumes, que emite luz em presença do substrato.

Métodos alternativos envolvem a identificação de uma proteína com anticorpos marcados ou o reconhecimento de um gene por hibridização com uma sonda marcada.

A CONSTRUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

As plantas transgênicas se originam via cultura *in vitro* a partir de células vegetais modificadas geneticamente. Portadoras de um gene exógeno ou transgene, sua obtenção visa o melhoramento das propriedades agrônômicas e nutritivas dos vegetais e, também, sua utilização para produzir substâncias novas (biofábricas).

O TRANSGENE

Para garantir a transferência de uma sequência gênica determinada, deve-se construir em redor uma estrutura complexa que inclua também um gene marcador, um promotor e as sequências de leitura adequadas (sequência terminal). Denomina-se transgene o conjunto formado pela sequência gênica e a estrutura que o acompanha.

O promotor desencadeia a transcrição da sequência codificadora de interesse. Um promotor constitutivo permitirá a expressão gênica na maioria dos tecidos e ao longo da vida da planta. Também existem promotores que respondem a estímulos ambientais internos ou externos, como a luz.

O gene marcador confere resistência a substâncias normalmente tóxicas para as células vegetais, tais como os antibióticos ou os herbicidas, de modo que em um meio seletivo só sobrevivam células que integraram o transgene.

A TRANSFERÊNCIA DOS GENES A CÉLULAS VEGETAIS

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria do solo, que leva um plasmídeo denominado Ti (do inglês, *Tumour induced plasmid*). Quando infectadas com a bactéria portadora desse plasmídeo, as plantas dicotiledôneas desenvolvem galhas, isto é, tumores característicos (*crown gall*).

A eliminação de alguns genes na região T do plasmídeo Ti conserva sua capacidade de inserção no cromossomo da célula hospedeira, eliminando a propriedade de induzir tumores. Esta característica transforma o plasmídeo em um vetor adequado para a transferência de genes de outras espécies às células vegetais. Basta colocar o transgene na região T do plasmídeo previamente desarmado para se obter um plasmídeo recombinante que poderá ser transferido novamente a *Agrobacterium* ou a células hospedeiras, onde o transgene irá se inserir em algum lugar do genoma (Figura 9.6).

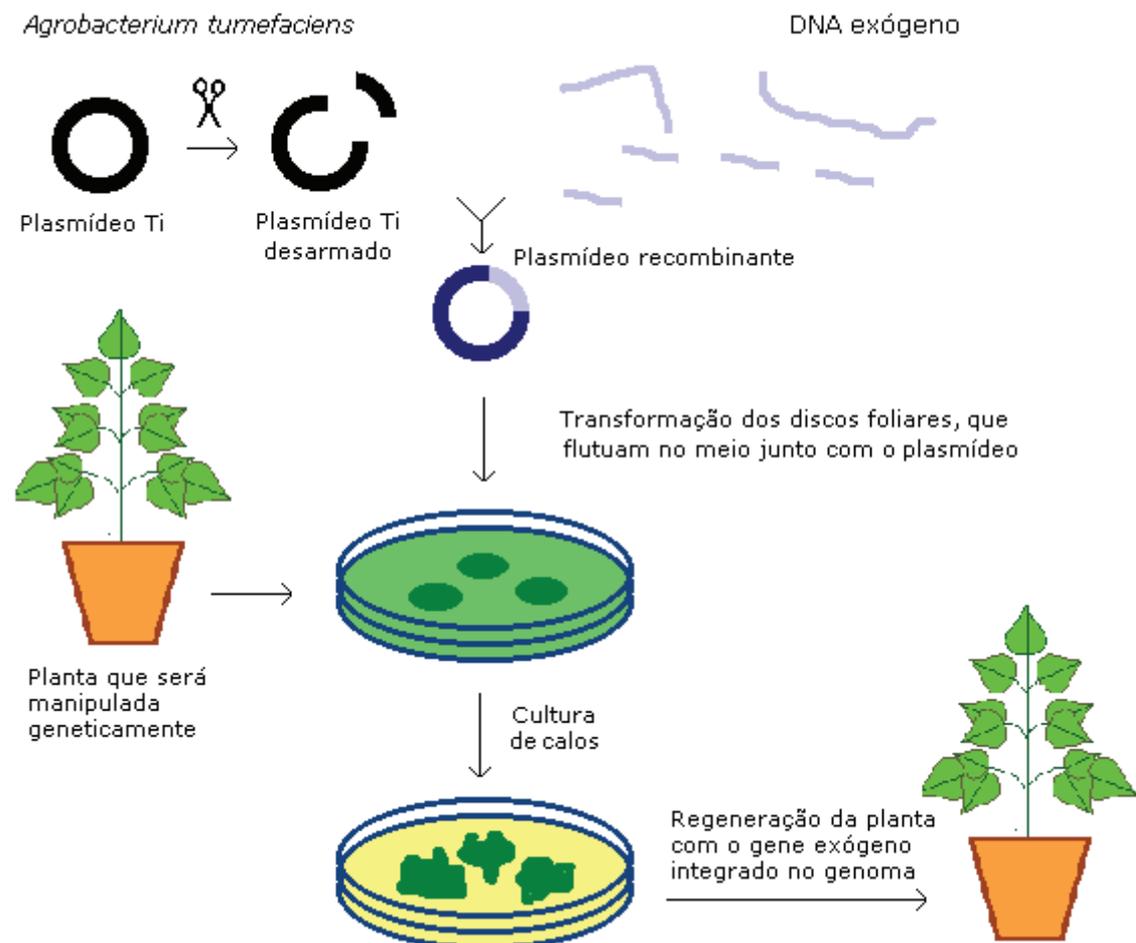
As plantas monocotiledôneas (arroz, milho, trigo) não são infectadas por *Agrobacterium*, sendo necessário recorrer a métodos físicos para a transferência de genes. Recorre-se à eletroporação, assim como ao tratamento com uma substância que desestabilize a membrana plasmática (polietilenglicol ou PEG).

Um método que se encontra hoje amplamente difundido é a biolística. Com um revólver especial (*gene gun*) dispara-se microprojéteis de ouro ou tungstênio, recobertos de DNA, em direção às células. O dispositivo possibilita a entrada do DNA exógeno no núcleo, nas mitocôndrias ou nos cloroplastos.

De um modo geral, a transformação se realiza em protoplastos, células em que a parede celular foi eliminada com enzimas.

Figura 9.7: A construção de uma planta transgênica.

O plasmídeo Ti "desarmado" portando um gene exógeno é transferido a células de discos foliares. Formam-se calos que poderão regenerar a planta inteira.



O PROBLEMA DOS MARCADORES SELETIVOS

O uso de marcadores de resistência a antibióticos na construção de plantas desperta vários questionamentos, apesar de se tratar de antibióticos sem uso clínico e que já se encontram nas bactérias do intestino. Estes marcadores podem ser substituídos, mas como sua utilidade se limita ao processo de transformação, o melhor seria eliminá-los uma vez cumprida sua função. Já foram desenvolvidas várias técnicas genéticas de remoção dos marcadores, esperando-se que nos próximos anos sua retirada se transforme em uma prática corriqueira de laboratório.

DO LABORATÓRIO AO CAMPO

No laboratório, transfere-se a construção genética às células receptoras por algum dos métodos possíveis (geralmente eletroporação, biolística ou uso de vetores, como o plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*); a seguir se selecionam e recuperam as células transformadas e, mediante as técnicas de cultura *in vitro*, se regeneram as plantas correspondentes (Figura 9.8). Note-se que este trabalho costuma ser realizado em plantas cujo genótipo favorece a transformação e a regeneração da planta transformada, mas que geralmente resultam pouco vantajosas do ponto de vista agrônômico.

Figura 9.8: As etapas da construção de uma planta transgênica.



A presença do transgene, assim como o número de cópias e o lugar em que estas se integraram no genoma, é conferida mediante técnicas bioquímicas e/ou marcadores moleculares (polimorfismos na molécula de DNA, repetição de sequências), porque são aspectos que podem influir na expressão gênica. Considera-se alcançado o êxito quando o transgene se expressa no lugar correspondente e com um adequado nível de atividade, restando por verificar a estabilidade da expressão gênica e o seu valor agrônômico.

Acabada a etapa de laboratório, iniciam-se os testes controlados em casa de vegetação, para selecionar as plantas-mãe com as quais se originará várias gerações de retrocruzamentos seletivos com alguma das linhagens "elite". Os testes visam a obtenção de uma linhagem transgênica de alto rendimento, adaptada a um contexto específico, isto é, um cultivar com uma produtividade potencial parecida à da linhagem "elite" que expresse o traço codificado pelo novo transgene.

Conceitualmente, estes testes são semelhantes aos efetuados no processo de melhoramento tradicional; no entanto, a utilização de marcadores moleculares e de técnicas de cultura *in vitro* permite caracterizar a progênie bem mais rapidamente.

Só então dá-se início à liberação planejada no meio ambiente, que envolve o cultivo de plantas em experimentos protegidos e testes de campo em diferente escala, até que o novo híbrido transgênico esteja pronto para o seu cultivo comercial. A liberação do cultivo dependerá da autorização da legislação local, geralmente bastante restrita a esse respeito.

CÉLULAS E ANIMAIS TRANSGÊNICOS

A TRANSFERÊNCIA GÊNICA A CÉLULAS ANIMAIS

Um dos objetivos da engenharia genética é a produção de proteínas recombinantes em culturas celulares. Em relação aos microrganismos, a grande vantagem das células animais é possuir os sistemas de transcrição e de processamento das proteínas indispensáveis para a expressão dos genes de organismos superiores.

Observe-se que em relação às células animais a palavra transformação designa a conversão de uma célula normal em maligna, sendo substituída por transfecção. O transporte de DNA exógeno dentro da célula é assegurado por métodos físicos (eletroporação, microinjeção, ingestão de micropartículas, fusão de lipossomos com a membrana plasmática) e por vetores (vírus, plasmídeos e transposons).

A transfecção mediante vetores virais dos quais se eliminaram as sequências patogênicas, interessa ao laboratorista porque os vírus animais infectam tecidos específicos e se integram no genoma da célula hospedeira de maneira estável. Em mamíferos, os vírus utilizados mais frequentemente como vetores são o SV40, a vacína, os retrovírus e os adenovírus. Células de inseto também podem ser manipuladas geneticamente com vetores como os elementos P de transposição de *Drosophila*, ou como o baculovírus, uma vez eliminado o gene que permite sua proliferação na natureza.

Assim como visto anteriormente em relação aos microrganismos e às plantas, a sequência codificadora é colocada em uma construção gênica bem definida que inclui um gene marcador para selecionar as células que receberam o transgene. Utilizam-se como marcadores genes de resistência a antibióticos, genes para características metabólicas (Tk ou timidina quinase) etc.

Para integrar a construção gênica no lugar desejado, se colocam nas extremidades sequências de DNA homólogas às extremidades do segmento que se quer substituir. Como distinguir a integração no lugar desejado (recombinação homóloga) da integração ocorrida em qualquer outro lugar (recombinação não homóloga)? Acrescentando na construção gênica, um pouco mais longe das sequências homólogas, um gene de "seleção negativa". Se a célula o integrar em qualquer outro lugar do genoma, ela se tornará sensível a um segundo antibiótico. Inversamente, se a célula for resistente a este antibiótico, tendo recebido o marcador colocado dentro da construção gênica, isto significa que houve integração no lugar desejado.

OS ANIMAIS TRANSGÊNICOS

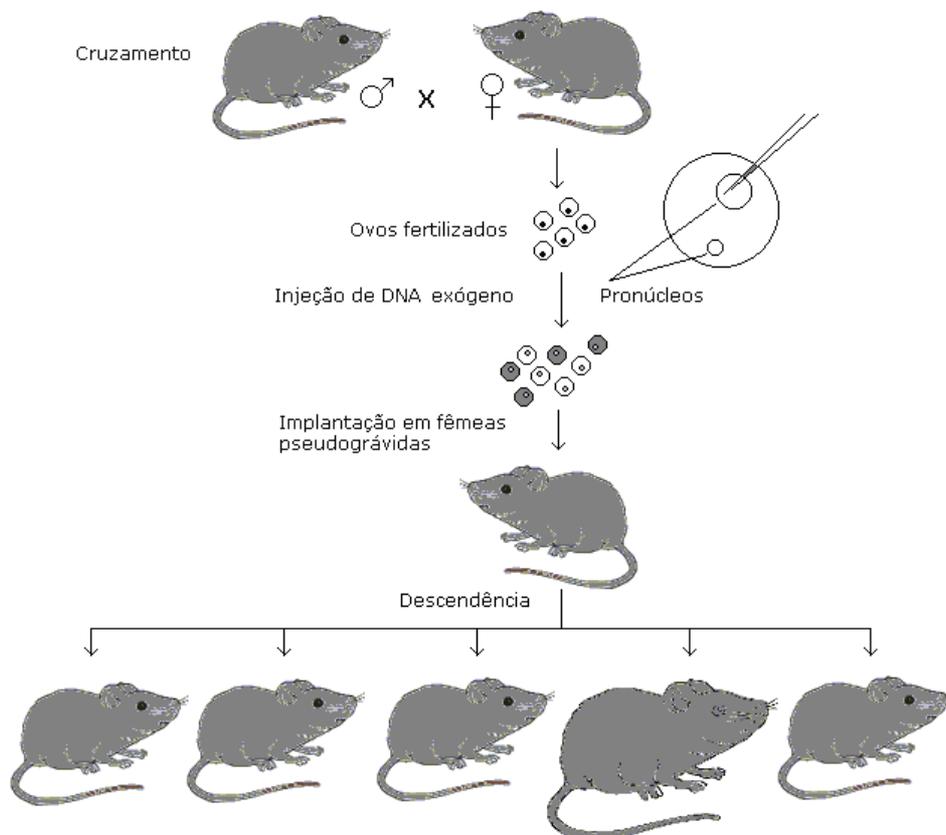
O *supermouse*

A maior parte dos animais transgênicos existentes foram obtidos por microinjeção de DNA, uma técnica com alto número de fracassos. A automatização torna hoje o procedimento bem mais eficiente. Contudo, ainda apresenta alguns inconvenientes. A inserção de um número variável de cópias em qualquer sítio do DNA da célula receptora pode interromper ou alterar a expressão de outros genes, um fenômeno que só será evidenciado na próxima geração.

Os primeiros experimentos de construção de um animal transgênico datam do início da década de 1980. Para construir o *supermouse*, um camundongo com um gene de hormônio de crescimento de rato, preparou-se um vetor, com o gene de rato codificador do hormônio de crescimento, e um promotor de camundongo, respondendo à presença de cádmio no ambiente. A seguir, com uma agulha microscópica, injetou-se o vetor em um dos pronúcleos de um óvulo fecundado. Implantou-se o zigoto em uma fêmea receptora, induzindo-se mais tarde na ninhada a síntese do hormônio de crescimento. Alguns camundongos, que incorporaram o transgene, alcançaram mais tarde o tamanho de um rato (Figura 9.8).

Figura 9.8: A construção de animais transgênicos por microinjeção.

Após a transfecção, se implantam os ovos em fêmeas receptoras (pseudográvidas). Aqueles que incorporaram o transgene originarão, neste caso, animais de tamanho maior (*supermouse*).



Legenda

- Ovos que não incorporaram o DNA exógeno
- Ovos que incorporaram o DNA exógeno

Os animais como modelos para a experimentação

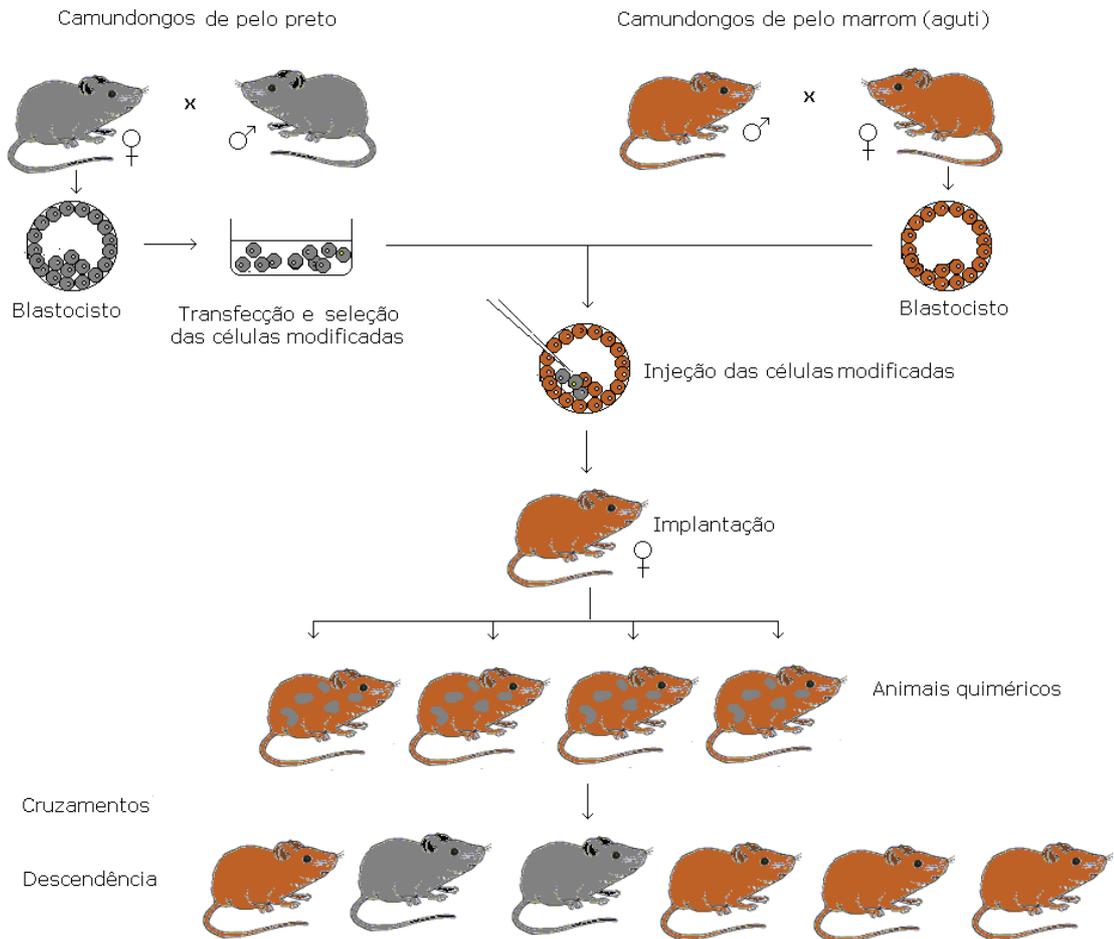
A transfecção de células cultivadas *in vitro* permite que sejam verificados o sítio de integração do transgene e o número de cópias inseridas. Uma aplicação interessante desta tecnologia na pesquisa clínica é a construção de modelos animais para o estudo de doenças humanas.

Após a transfecção de células-tronco embrionárias com um gene desativado, realiza-se sua transferência a blastócitos, que, reimplantados, originarão animais quiméricos, isto é animais com células de dois tipos: umas em que o gene está ativado e outras em que não está ativado porque incorporaram o transgene. Dos cruzamentos entre quimeras com células germinais portadoras do gene desativado nascerão animais homozigóticos com duas cópias do gene inativo (Figura 9.9). Esta estratégia é utilizada não só para construir modelos animais com um gene inativo (*knock out*), como para colocar um gene ativo (*knock in*).

Desse modo se obtiveram camundongos transgênicos para genes determinantes de algumas doenças humanas, tais como câncer de mama (BRCA 1), doença de Huntington, anemia falciforme etc. Estes animais são de grande utilidade para as pesquisas farmacológicas.

Figura 9.9: Construção de um animal transgênico por transfecção de células-tronco embrionárias.

Mediante a implantação do blastócito com células modificadas em uma fêmea aguti, são obtidos animais quiméricos, com células que levam o caráter para pelagem marrom e células com o caráter para pelagem preta. Do cruzamento entre quimeras, nascem alguns animais com pelagem preta, tendo incorporado o DNA exógeno no genoma.



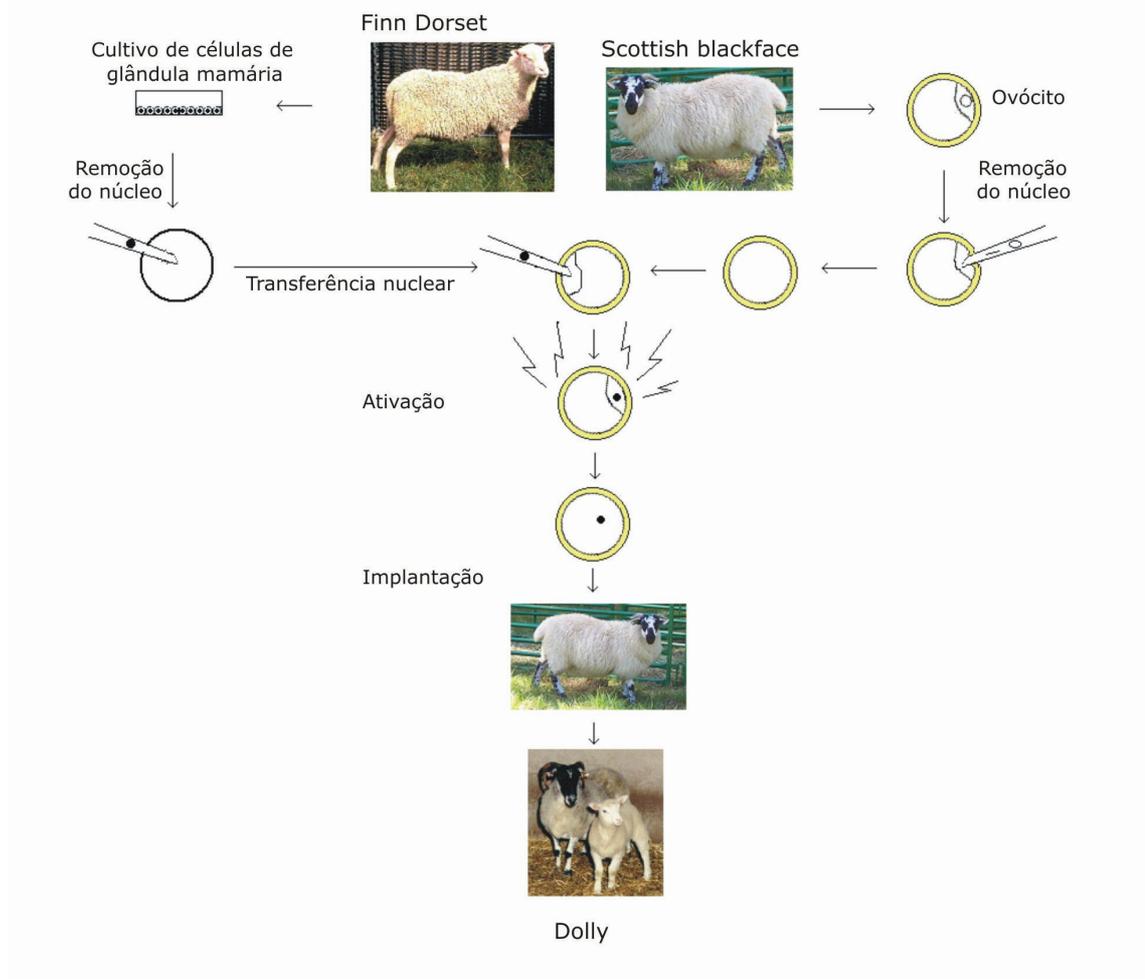
Os animais como biofábricas

A ovelha Dolly nasceu em 1996, depois de numerosas tentativas de transferir o núcleo de uma célula mamária a um ovócito anucleado (Figura 9.10). Adorada pela mídia, o clone Dolly teve que ser sacrificada em 2003 com um tumor no pulmão, artrite e sinais de envelhecimento precoce. Poucos meses depois do nascimento de Dolly, o mesmo grupo do Instituto Roslin e de PPL Therapeutics anunciou o nascimento de Polly, uma ovelha transgênica para o gene codificador do fator IX, uma proteína que falta nos hemofílicos.

O fato de ter-se utilizado para gerar Dolly uma célula diferenciada mantida em cultivo teve uma importância enorme. As células em cultura podem ser transfectadas e os seus núcleos transferidos para a obtenção de animais transgênicos, como Polly. Mesmo sendo difícil de obter, um animal transgênico pode ser bem mais interessante do ponto de vista econômico que o cultivo de células em biorreatores, um processo complexo e de alto custo.

Na construção de animais transgênicos para a produção em grande escala de uma proteína recombinante, escolhe-se habitualmente um promotor que se expresse na glândula mamária, de modo que o produto gênico apareça no leite do animal. Cabras transgênicas produtoras de fator ativador de plasminogênio (tPA), vacas produtoras de lactoferrina, somatostatina ou insulina já são uma realidade. Chama-se Atryn o primeiro anticoagulante, liberado comercialmente em 2009, produzido a partir do leite de uma cabra transgênica pela empresa GTC Biotherapeutics.

Figura 9.10: Dolly, um clone obtido por transferência nuclear.



O TAMBO FARMACÊUTICO ARGENTINO

Algumas proteínas terapêuticas (somatotropina, insulina) são obtidas atualmente mediante o cultivo de células animais ou de bactérias e leveduras recombinantes; no entanto, é provável que em um futuro próximo estes agentes biológicos sejam substituídos por mamíferos transgênicos. A modificação das técnicas de produção interessa à indústria farmacêutica porque elimina as dificuldades inerentes à condução dos bioprocessos e à purificação dos produtos. Apesar do elevado valor da inversão inicial, bastam poucos animais para se extrair uma quantidade grande de proteína recombinante, com o qual seria possível baratear o seu preço. Já existem cabras produtoras do fator ativador de plasminogênio (tPA) e vacas produtoras de lactoferrina, já próximos de ser comercializados.

Biosidus, uma empresa argentina do Grupo de Empresas Farmacêuticas Sidus, iniciou as experiências de clonagem de bovinos em 1997. Como as dificuldades técnicas são numerosas, muitas tentativas tiveram que ser feitas até alcançar o êxito. Este chegou em 2002, com o nascimento de Pampa, uma vaca da raça Jersey que é o primeiro clone bovino da América Latina. Uma vez dominada a tecnologia, o passo seguinte era conseguir um animal que secretasse o hormônio de crescimento humano (somatotropina) no leite.

Com esse objetivo, se elaborou uma construção gênica que incluía o gene codificador da somatotropina e um promotor para sua expressão no leite. Esta construção foi inserida em fibroblastos fetais. Da fusão destes fibroblastos com ovócitos anucleados resultaram embriões que se implantaram em vacas portadoras. Em 2002, nasceu Pampa Mansa, uma vaca clonada e transgênica que um ano mais tarde começou a produzir leite com somatotropina. Estima-se que bastariam três animais semelhantes para abastecer o mercado latino-americano.

A partir de fibroblastos da orelha de Pampa Mansa obteve-se uma dinastia de vacas, clones de um clone. Em 2004, com o nascimento de Pampero, um touro transgênico resultante do cruzamento entre Pampa Mansa e um animal reprodutor, a multiplicação dos animais passou a ser independente da clonagem. O "tambo farmacêutico" está completo.

Em 2005, a empresa Biosidus obteve das autoridades a autorização para liberar um número limitado de animais no meio ambiente agropecuário, em condições estritamente controladas. O próximo passo será a aprovação do produto para o uso farmacêutico.

O projeto colocou a Argentina entre os países que dominam esta tecnologia, juntamente com Estados Unidos, Alemanha, França, Japão, Reino Unido e Austrália. Além da participação pioneira de Biosidus, o *tambo farmacêutico* demandou um investimento de US\$ 7.000.000, a participação de uma equipe multidisciplinar de 40 pesquisadores e a assessoria do CONICET (*Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas da Argentina*). Biosidus contempla a ampliação do rebanho para outras proteínas terapêuticas (Dinastia Patagônia produtora de pró-insulina humana, Dinastia Portenha, produtora de hormônio de crescimento bovino).

BIBLIOGRAFIA

CAPÍTULO 1

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE BIOTECNOLOGIA (ABRABI) <http://www.abrabi.org.br>
2. ACCESS EXCELLENCE (THE NATIONAL HEALTH MUSEUM). Biotechnology Timelines. <http://www.accessexcellence.com>
3. AGÊNCIA DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) <http://www.agencia.fapesp.br/>
4. ALCAMO I.E. *DNA Technology: The awesome skill*. Dubuque, Wm.C.Brown Publishers, 1996.
5. ANCIÃES W. & CASSIOLATO J.E. *Biotecnologia: seus impactos no setor industrial*, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 1985.
6. BIOPLANET. www.bioplanet.net
7. BIOTEACH <http://bioteach.ubc.ca>
8. BIOTECHNOLOGY INDUSTRY ORGANIZATION (BIO). <http://www.bio.org>
9. BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO. <http://www.biotecnologia.com.br>
10. BORÉM A & DOS SANTOS F.R. *Biotecnologia Simplificada*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2001.
11. BISANG R. et al. (Coord.). *Las Empresas de Biotecnología en Argentina*. Documento de Trabajo N°1. Universidad Nacional de General Sarmiento, Universidad Nacional de Quilmes y Centro de Estudios Urbanos y Regionales, 2005.
12. BUD R. *The Uses of Life: a History of Biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1993.
13. BULL A.T. et al. *Biotechnologie: Tendances et Perspectives Internationales*. Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), 1982
14. CATEDRA DE BIOTECNOLOGÍA, BIODIVERSIDAD & DERECHO. <http://www.biotech.bioetica.org>
15. CENTRO VIRTUAL DE BIOTECNOLOGIA PARA LAS AMERICAS. <http://www.ibt.unam.mx/virtual.cgi>
16. CHECKBIOTECH. <http://www.checkbiotech.org>
17. CONSEJO ARGENTINO PARA LA INFORMACIÓN Y EL DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA (ARGENBIO). <http://www.argenbio.org/h/inicio/index.php>
18. CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET). Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología. <http://www.conicet.gov.ar>
19. CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA (CIB) <http://www.cib.org.br>
20. COUNCIL FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (CBI) <http://whybiotech.com>
21. DASILVA E.J. et al. Biotechnology and the developing world. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5(1), 15/04/2002. Disponível em <http://www.ejb.org/content/vol5/issue1/full/1>
22. DELLACHA J. *Interacción en Argentina de los sectores público y privado en el área de Biotecnología*. Disponível em <http://www.foarbi.org.ar>
23. De ROSNAY J. *Biotechnologies et Bio-industrie*; Document annexe au rapport "Sciences de la vie et Société" présenté para F.Gros, F.Jacob et P. Royer à Monsieur le Président de la République. Seuil, La Documentation française, 1979.
24. DIAZ A. *Bio...Qué? Biotecnología, el futuro llegó hace rato*. Buenos Aires, Siglo XXI Editores, 2005.
25. DIAZ A. & GOLOMBEK (comps) *ADN: 50 años no es nada*. Buenos Aires, Siglo XXI Editores Argentina, 2004.
26. DOELLE H. W. Biotechnology and Human Development in Developing Countries. Disponível em www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue3/issues/02/
27. EIBE (EUROPEAN INITIATIVE FOR BIOTECHNOLOGY EDUCATION). *Biotechnology: Past and Present (Unit 17)*, 1999. Disponível em <http://www.rdg.ac.uk/NCBE/>
28. ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (EJB). <http://www.ejb.org>
29. FORO ARGENTINO DE BIOTECNOLOGÍA. <http://www.foarbi.org.ar>
30. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA. *Biotecnología y Sociedad*. <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/biotecno.htm>
31. LEMAUX P. *What is Biotechnology*. Disponível em <http://ucbiotech.org/resources/biotech/slides/biotech.html>
32. MALAJOVICH, M. A. *BIOtecnologia*; Editora Axcell Books do Brasil, Rio de Janeiro, 2004
33. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Policy Brief: Modern Biotechnology and the OECD*, 1999. <http://www.oecd.org/ehs/icgb>
34. OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT (OTA). *Commercial Biotechnology, an International Analysis*. Washington, US-Congress, 1984
35. NATURE. <http://nature.com>
36. PETRUSANSKY C. Aspecto económico de la Biotecnología en Argentina: un enfoque actualizado. Trabajo presentado en la XXI Asamblea Nacional de Graduados en Ciencias Económicas, 2005. Disponível em <http://www.foarbi.org.ar/ppal/documentos.php>
37. PORQUE BIOTECNOLOGIA. <http://www.porquebiotecnologia.com.ar>
38. POWNALL I.E. An internacional political economic view of the biotechnology industry. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 3(2), 15/08/2000. Disponível em <http://www.ejb.org/content/vol3/issue2/full/7>
39. PRENTIS S. *Biotechnology: A New Industrial Revolution*, New York, George Braziller, Inc., 1984.
40. RIFKIN J. *El siglo de la Biotecnología*. Barcelona, 1998, Crítica/Marcombo.

41. ROSEN M. *Biotech industry reaches midpoint in 50-year maturation cycle*. Wisconsin Technology Network <http://wistechtechnology.com>.
42. SASSON A. *Biotechnologies and Development*. Paris, Unesco, 1988.
43. SASSON A. *Biotechnologies in Developing countries: present and future*. Paris, Unesco, 2000.
44. SCIENCE. <http://www.science.org>
45. SCIENCE AND DEVELOPMENT NETWORK (SciDevNet) <http://www.scidev.net>
46. SISTEMA DE INFORMACION ESPECIALIZADA DE BIOTECNOLOGIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE COLOMBIA <http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/>
47. SUBSECRETARÍA DE LA PEQUEÑA Y MEDIANA EMPRESA Y DESARROLLO NACIONAL. *Biotecnología*. Serie de Estudios Sectoriales. Enero 2005. Disponible em <http://www.proargentina.gov.ar>
48. THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR BIOINDUSTRIES (EUROPA Bio) <http://www.europabio.org/>
49. VERÁSTEGUI J. (ed.) *La Biotecnología en América Latina: Panorama al año 2002*. CamBioTec, IDRC; Ottawa, 2003. Disponible em <http://concytec.gob.pe/cambiotec>.
50. WALKER M. Is modifying genes playing God? 18/03/2004. Disponible em <http://www.checkbiotech.org>
51. WARNER S. Biotech takes on new industries. *The Scientist* **19**(4):45, 2005. <http://www.the-scientist.com/article/display/15291/>.

CAPÍTULOS 2, 3, 4, 6 e 7

52. ALMEIDA LIMA U. (Coord.) *Biotecnología Industrial. Procesos Fermentativos e Enzimáticos*. Vol.3. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 2001.
53. AMABIS J.M. & MARTHO G.R. *Fundamentos da Biología Moderna*, 3ª Edição. São Paulo, Editora Moderna, 2002.
54. AMERICAN CANCER SOCIETY. Monoclonal antibody therapy. Disponible em <http://www.cancer.org>
55. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. <http://www.asmusa.org/edusrc/resources.htm>
56. BALANDRIN, M. F. *et al.* Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228: 1154-60, 1985.
57. BASIRO D. *Immunology*, London, The Biochemical Society, 1994.
58. BERNOT A. *L'Analyse des Génomes*. 2 Edição. Paris, Dunod, 1999.
59. BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO. <http://www.biotecnologia.com.br>
60. BIOTECHNOLOGY AND BIOLOGICAL SCIENCES RESEARCH COUNCIL (BBSRC). <http://www.bbsrc.ac.uk>
61. BOM E.P.S & PEREIRA Jr. N. *Tecnología Enzimática*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.
62. BORZANI W. *et al.* (Coord.) *Biotecnología. Engenharia Bioquímica*. Vol.3. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 1975.
63. BOURGAUD F. *et al.* Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851, 2001.
64. BROCK T.D., MADIGAN M.T. *Biology of Micoorganisms*. New Jersey, Ed. Prentice-Hall International, 1988.
65. BULLOCK J., KRISTIANSEN B. *Basic Biotechnology*. London, Academic Press, 1987.
66. CALLEGARI J.P. Feu vert sur les microalgues. *Biofutur*: 2, 1989.
67. CALVA-CALVA G. *et al.* Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y la remocion de xenobióticos. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. *Avance y perspectiva* nº 21, 2002.
68. CAMPBELL N. *Biology*, 4th Edition. California, The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
69. CAMPBELL N. e J.Reece *Biology*, 8th Edition. California, The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., 2008.
70. CENTER FOR GENETIS AND SOCIETY <http://www.genetics-and-society.org>
71. CONTROL DISEASE CENTER (CDC) Summary of recommended biosafety levels for infectious agents. Disponible em <http://www.cdc.gov>
72. COOPER G.M. *La Célula*. Madrid, Marban Libros S.L., 2002.
73. DEFURIA D.M. Plant Cell Culture Technology. Disponible em http://www.agbiotechnet.com/nabc/nabc8/contents_8.asp
74. DEPALMA A. *Cell Culture Scale Up Made Easier*. Drug Discovery & Development <http://www.ddmag.com>
75. DODDS J.H E ROBERTS L.W. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge, Cambridge University Press, 1995.
76. EDWARDS D., BATLEY J. Plant bioinformatics: from genome to phenome. *Trends in Biotechnology* 22:5, 2004.
77. EMERY N., GERIN P. De la cellule aux cellules em culture: Comment cultiver les cellules animales. *Biofutur* 184, 1998.
78. FRANCIS A.L. Pharmers Market, 2000. Disponible em http://www.the-scientist.com/yr2000/may/profile_000501.html
79. FRANTZ S. *In vivo we trust*, 2003. <http://www.nature.com/drugdisc/nj/articles/nrd1127.html>
80. GALLAGHER R., PERKEL J.M. Seven cheers for technology. *The Scientist* 19 (16): 6, 2005.
81. GELLON G. *El Huevo y la Gallina*. Buenos Aires, Siglo XXI Editores, 2004.
82. GLOBAL KNOWLEDGE CENTER ON CROP BIOTECHNOLOGY. Microbial Fermentation Pocket nº 20. Disponible em <http://www.isaaa.org/kc/>
83. GROSBRAS M.H. La cellule. *La Recherche* 288, 1996.

84. HALVORSON H.O. et al. Marine biotechnology opportunities for Latin America. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* Vol. 4 (2), 2003. Disponível em <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue2/issues/03/index.html>
85. HARVARD'S BIOTECHNOLOGY CLUB. <http://www.thebiotechclub.org>
86. KESHAVARZ T. *Fermentation (Industrial): Control of Fermentation Conditions*. Academic Press Encyclopedia of Food Microbiology, 1999. <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/readings.html>.
87. KIMBALL'S BIOLOGY PAGES <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/biologypages/w/welcome.html>.
88. KIRKHAM S. The omic explosion: a brief history of -ome. *The Biochemist*, 25(1): 6, 2003. Disponível em <http://www.biochemist.org>.
89. KITCHEN CULTURE. <http://www.turbonet.com>
90. LARPENT-GOURGAUD M, SANGLIER J.J. *Biotechnologies, Principes et Méthodes*. Paris, Doin Editeurs, 1992.
91. LEHNINGER A.L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Ed. Sarvier, 1989.
92. LINENBERG R.D. The many dimensions of plant tissue culture research. Tissue culture of woody plants. Care and handling of micropropagated plants. <http://www.aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/pltissue/pltissue.html>
93. LUCAS R. Monoclonal Antibodies: production and applications. *NCBE Newsletter* / spring 1989.
94. MADDEN D. Genes in the wash. *NCBE Newsletter* / spring 1991.
95. MADDEN D. In a jam and out of a juice. *NCBE Newsletter* / winter, 1991.
96. MANTELL S.H. et al. *Princípios de biotecnologia em plantas*. Sociedade Brasileira de Genética, 1994.
97. MENEZES T.J.B. Microbiologia Industrial. In *Tratado de Microbiologia*. Vol1. São Paulo, Ed. Manole Ltda, 1988.
98. MICROBIOLOGY ON-LINE. <http://www.microbiologyonline.org.uk>
99. MISAWA M. Plant Tissue Culture: An alternative for production of useful metabolites. *FAO Agricultural Services Bulletin* nº 108, 1994. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/t0831e/t0831e00.htm#con>
100. NATIONAL INSTITUTE OF GENERAL MEDICAL SCIENCES (NIGMS). *Inside the Cell*. Disponível em http://www.nigms.nih.gov/news/science_ed/life.html
101. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). *Stem cells: a primer*. Disponível em <http://www.nih.gov>.
102. NATIONAL BIOLOGY INFRASTRUCTURE INFORMATION <http://www.nbii.gov/discipline/botany/index.html>.
103. NATURE. Tissue Engineering, 2000. Disponível em <http://biotech.nature.com>.
104. NOVO NORDISK. *A ação das Enzimas*. Dinamarca, Novo Nordisk A/S, 1995.
105. ORIVE G., et al. Controversies over stem cell research. *Trends in Biotechnology* 21:3, 2003.
106. PAWAR P. A et al. *Fermentation (Industrial): Recovery of metabolites*. Academic Press Encyclopedia of Food Microbiology, 1999. Disponível em <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/readings.html>.
107. PELCZAR M.J. et al. *Microbiologia, Conceitos e Aplicações*. São Paulo, MAKRON Books do Brasil, 1997.
108. PIERIK R.L.M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990.
109. PIRES AUGUSTO E.F., SIMÕES OLIVEIRA M. Processos com células animais. En *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos*. Vol3. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda, 2001.
110. PITTSBURG TISSUE ENGINEERING INITIATIVE. About Tissue Engineering. Disponível em http://www.ptei.org/about_te/index.html
111. PLAYFAIR J. H.L. *Imunology at a glance*. 6º Edition. Blackwell Science, 1996.
112. REVISTA BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO. <http://www.biotecnologia.com.br>
113. RIDLEY M. *Genoma. La autobiografía de una especie en 23 cromossomas*. Madrid, Grupo Santillana de Ediciones, 2000
114. SANCHEZ S. Ecology and Industrial Microbiology. Microbial diversity – The bright and promising future of microbial manufacturing. *Current Opinion on Microbiology* 8: 229-233, 2005.
115. SCHINDLE I. et al. *Understanding the Immune System*, 2001. Disponível em <http://newscenter.cancer.gov/sciencebehind/uis/uihome.htm>
116. SCHLOSS P.D., HANDELSMAN J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion on Microbiology* 14: 303-310, 2003.
117. SCHMIDELL W. et al. (Coord). *Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica*. Vol.2. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 2001.
118. SCIENCE IN THE REAL WORLD: MICROBES IN ACTION. <http://www.umsl.edu>.
119. SCRIBAN R. Coord. *Biotecnologia*. São Paulo, Ed. Manole, Ltda, 1985.
120. SIGMA ALDRICH. *Fundamental techniques in cell culture: A Laboratory Handbook*, 2003. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com>.
121. STEM CELL WEB FOCUS <http://www.nature.com/nature/stemcells>.
122. STREIT W.R., SCHMITZ R.A. Metagenomics, the key to uncultured microbes. *Current Opinion on Microbiology* 7: 492-498, 2004.
123. SULSTON J., FERRY G. *El hilo común de la humanidad*. Madrid, Siglo XXI de España Editores, 2003
124. TAUBES G. Antibody Drug Revival. *Technology Review*, 2002. Disponível em <http://www.technologyreview.com>
125. TEIXEIRA P., VALLE S. *Riscos biológicos em laboratório de pesquisa*. En Biossegurança, uma abordagem multidisciplinar, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 362 p, 1996
126. TEXAS HORTICULTURE PROGRAM. <http://aggie-horticulture.tamu.edu>
127. THE BIG PICTURE BOOK OF VIRUS <http://www.tulane.edu>.

128. THE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE. *Your world, Biotechnology and you: Tissue Engineering*. Vol 7:1, 1997.
129. THE WELLCOME TRUST. *New Biology and Society: beyond the genome*. Labnotes 2, 2000 Disponível em <http://www.wellcome.ac.uk>
130. THE MICROBIAL WORLD <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/>
131. TORRES A.C. *et al. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Vol.1. Brasília, Embrapa-CBAB, 1998.
132. UNIVERSIDADE DO ALGARVE. *Algas; aspectos gerais, aplicações tecnológicas e uso comercial*. Disponível em <http://www.mar-alto.com/biologia/algas.shtml>
133. UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON. *Embryonic stem cells*. Disponível em <http://www.news.wisc.edu/packages/stemcells/index.html>
134. VIRTUAL MUSEUM OF BACTERIA. <http://www.bacteriamuseum.org>
135. WALKER G. *Fermentation (Industrial): Media for Industrial Fermentations*. Academic Press Encyclopedia of Food Microbiology, 1999. Disponível em <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/readings.html>
136. WELCOME TO THE WORLD OF ALGAE. <http://www.botany.uwc.ac.za/algae>
137. WYMER P.E.O. *Enzymes and their role in Biotechnology*. London, The Biochemical Society, London.
138. YUSSUF C. *Fermentation (Industrial): Basic Considerations*. Academic Press Encyclopedia of Food Microbiology, 1999. Disponível em <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/readings.html>
139. Genomes on line database
140. <http://www.genomesonline.org/gold.cgi>

CAPÍTULOS 5, 8 e 9

141. ACCESS EXCELLENCE (THE NATIONAL HEALTH MUSEUM). <http://www.accessexcellence.com>
142. ALCAMO I.E. *DNA Technology: The awesome skill*. Dubuque, Wm.C.Brown Publishers, 1996.
143. BENTO FARAH S. *DNA, Segredos e Mistérios*. São Paulo, Sarvier Ed., 1997.
144. BENTO FARAH S. *DNA, Segredos e Mistérios*. São Paulo, Sarvier Ed., 2008.
145. BIOTECHNOLOGY AUSTRALIA. *The tools of gene technology*. Disponível em <http://www.biotechnology.au>
146. BIOTECHNOLOGY ONLINE. <http://www.biotechnology.gov.au/biotechnologyOnline/index.htm>
147. BORZANI W. *et al. (Coord). Biotecnologia Industrial. Fundamentos* Vol.1. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 2001.
148. BROCK T.D., MADIGAN M.T. *Biology of Micoorganisms*. New Jersey, Ed. Prentice-Hall International, 1988.
149. BRUSH M. MAKING SENSE OF MICROCHIP ARRAY DATA, 2001. DISPONÍVEL EM HTTP://WWW.THE-SCIENTIST.COM/YR2001/APR/PROFILE_010430.HTML
150. BRYCE C.F.A, PACINI D. *The structure and function of nucleic acids*. The Biochemical Society, London, 1998.
151. CHUA J. A buyer's guide to DNA and RNA prep kits. *The Scientist* 18:3, 2004.
152. CONSTANS A. The Microarray in Functional Genomics and Proteomics. *The Scientist* vol 17:3, 2003. Disponível em http://www.the-scientist.com/yr2003/feb/lcprofile_030210.html
153. CONSTANS A. State of the microarray: challenges and concerns with microarrays. *The Scientist*. Disponível em http://www.the-scientist.com/yr2003/feb/lcprofile_030210.html.
154. COOPER G.M. *La Célula*. Madrid, Marban Libros S.L., 2002.
155. Da SILVEIRA J.M.F.J. *et al (Org). Biotecnologia e Recursos Genéticos; Desafios e Oportunidades para o Brasil*. Campinas, Instituto de Economia/FINEP, 2004.
156. DE WEERDT S.E. What´s a genome? 2001. Disponível em <http://www.celera.com>.
157. DIXON B. *Genetics and the Undestanding of Life*. Birmingham, XVIIth International Congress of Genetics, 1993.
158. DOE HUMAN GENOME PROGRAM. http://www.er.doe.gov/production/oher/hug_top.html
159. DOLAN DNA LEARNING CENTER / COLD SPRING HARBOR LABORATORY. <http://www.dnalc.org>
160. EXPLORATORIUM. <HTTP://WWW.EXPLORATORIUM.ORG>
161. FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO. *Genetica molecular e tecnologia do dna-recombinante*. Disponível em <http://morpheus.fmrp.usp.br/td/apostila.php>
162. GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER. UNIVERSITY OF UTAH. <http://www.utah.edu>
163. GENETICS EDUCATION CENTER. University of Kansas Medical Center. <http://www.kumc.edu>
164. GWYNNE P., HEEBNER G. LABORATORY INSTRUMENTATION AND ROBOTICS, 2000. Disponível em <http://www.sciencemag.org/feature/e-market/benchtop/lab1.shl>
165. GWYNNE P., HEEBNER G. Technologies in DNA chips and microarrays I, 2001. Disponível em <http://www.sciencemag.org/feature/e-market/benchtop/dnamicro.shl>
166. GWYNNE P., HEEBNER G. TECHNOLOGIES IN DNA CHIPS AND MICROARRAYS II, 2001. Disponível em http://www.sciencemag.org/feature/e-market/benchtop/technologies_dnachips.shl
167. HOUEBINE L.M. La transgênese animale et ses applications. *INRA Prod.Anim.* 11(1), 81-94, 1998.
168. HUMAN GENOME PROJECT INFORMATION. http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html
169. KIMBALL´S BIOLOGY PAGES. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/>
170. KORNBERG A. *La Hélice de Oro*. Buenos Aires, Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, 1995.
171. LARPENT-GOURGAUD M., SANGLIER J.J. *Biotechnologies, Principes et Méthodes*. Paris, Doin Editeurs, 1992.

-
172. LEWIS R. *Human Genetics: Concepts and applications*. 4th Ed. New York, The Mc Graw Hill Higher Education, 2001.
 173. MADDEN D. Essential genetic engineering. *Newsletter n^o 9, NCSB*, Reading, 1990.
 174. MELCHER u. MOLECULAR GENETICS TECHNIQUES, 2001. DISPONÍVEL EM [HTTP://UNIGE.CH/SCIENCES/BIOCHIMIE/EDELSTEIN/GENEFRAEM/](http://UNIGE.CH/SCIENCES/BIOCHIMIE/EDELSTEIN/GENEFRAEM/)
 175. MOORE P. *Recombinant DNA Technology*. London, Biochemical Society, 1994.
 176. MORROW J.F., COHEN S.N., CHANG A.C. Y., BOYER H.W., GOODMAN H.M.E R.B. HELLING. Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli* .Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:5, 1974
 177. NATIONAL HEALTH & GENETICS RESEARCH INSTITUTE (nhgri) FACT SHEETS. DISPONÍVEL EM [HTTP://WWW.GENOME.GOV/10000202](http://WWW.GENOME.GOV/10000202)
 178. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 179. NATURE. <http://www.nature.com>
 180. NEW SCIENTIST. <http://www.newscientist.com>
 181. NICHOLL D.S.T. *An Introduction to Genetic Engineering*. Cambridge, Cambridge University Press, 1994.
 182. NATIONAL CENTRE FOR HUMAN GENOME RESEARCH (NCHGR). <http://www.nchgr.nih.gov>
 183. NIH OFFICE OF SCIENCE EDUCATION. DNA chips: a genetics lab in the palm of your hand. *Snapshots of science and medicine* vol.1 n^o 2. Disponível em <http://science-education.nih.gov/snapshots>
 184. OLIVEIRA DOS SANTOS A.J. Animais transgênicos e nocautes: soluções para muitos enigmas. *Ciência Hoje*, vol 25: 146, 1999.
 185. Pietszsch j. Understanding the rnaissance, 2003. Disponível em <http://nature.com/horizon/rna/background/understanding.html>
 186. POWLEDGE T. THE POLYMERASE CHAIN REACTION, 2002. Disponível em <http://www.faseb.org/opar/bloodsupply/pcr.html>
 187. PRENTIS S. *Biotechnology: a new industrial revolution*. New York, George Braziller, Inc., 1984.
 188. SCHENBERG A.C. Elementos de Engenharia Genética. En *Biotecnologia Industrial. Fundamentos*. Vol. 1. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda, 2001.
 189. SHI, L. DNA MICROARRAY (GENOME CHIP), 2002. DISPONIBLE ONLINE EN [HTTP://WWW.GENE-CHIPS.COM/](http://WWW.GENE-CHIPS.COM/)
 190. SUZUKI D. *et al. Introdução à Genética*. 4^o ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 1992.
 191. THE WELLCOME TRUST. Unveiling the Human Genome / Wellcome News 4, 2001. Disponível em <http://www.welcome.ac.uk>
 192. UNIVERSITY OF ARIZONA. <http://www.arizona.edu>
 193. UNIVERSITY OF BUFFALO. GENOMIC ANALYSIS – DNA FINGERPRINTING, 2002. DISPONÍVEL EM [HTTP://WWW.BIOLOGY.BUFFALO.EDU/COURSES/BIO129/NOV19.HTML](http://WWW.BIOLOGY.BUFFALO.EDU/COURSES/BIO129/NOV19.HTML)
 194. UNIVERSITY OF WASHINGTON. SOUTHERN BLOT. Disponível em <http://www.biology.washington.edu/fingerprint/blot.html>
 195. WHITE B. Southern, northern, westerns & cloning: "molecular searching" techniques. Winding your way through dna.1995. Disponível em <http://www.mit.edu:8001/esgbio/rdna/rdna.html>
 196. WINSTEAD E. The evolving art of arrays, 2000. Disponível em http://www.celera.com/genomics/news/articles/09_00/evolving_arrays.cfm

