



BIOTECNOLOGIA

Ryan Emiliano da Silva



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA.....	3
2 ASPECTOS GERAIS DE FERRAMENTAS DA BIOLOGIA MOLECULAR.....	19
3 BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO.....	39
4 BIOTECNOLOGIA APLICADA ÀS CIÊNCIAS MÉDICAS.....	56
5 BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL.....	70
6 INTRODUÇÃO A BIOINFORMÁTICA.....	81

1 INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA

Apresentação

Neste bloco inicial pretendemos apresentar conceitualmente a biotecnologia e descortinar a variedade de possibilidades contidas neste fértil e convidativo universo, chamando atenção para o quão fundamental esta área pode ser na sua formação acadêmica e na posterior construção de oportunidades de carreira.

Além disso, queremos construir juntos um panorama geral da edificação do conhecimento biotecnológico ao longo da experiência humana, de modo a perceber que desde que o homem se relaciona em sociedade a biotecnologia tem criado oportunidades promissoras para o desenvolvimento de novos produtos e serviços e para a melhoria da qualidade de vida. Dito isso, te convidamos para seguirmos juntos nessa jornada de aprendizagem.

1.1 Definição de biotecnologia

Se você fizer uma rápida busca a respeito das definições de biotecnologia em artigos científicos, reportagens dos veículos de comunicação de massa ou mesmo em navegadores online, você irá se deparar com uma diversa quantidade de conceitos e terminologias possíveis. No intuito de construirmos uma abordagem interdisciplinar e completa em nosso curso, optaremos por utilizar a definição cunhada pela Organização das Nações Unidas em 1992, no âmbito da convenção da biodiversidade, que em seu artigo segundo, define que a biotecnologia é o coletivo de aplicações tecnológicas de naturezas variadas, que recorram aos sistemas biológicos, seja através de organismos vivos ou por meio de seus derivados, no intuito de fabricar e/ou modificar produtos, processos e serviços para aplicações específicas.

De modo objetivo e didático podemos interpretar que sempre que um recurso vivo for utilizado para oferecer alguma alternativa para solucionar alguma demanda estamos fazendo uso da biotecnologia. Apesar de algumas pessoas associarem o conceito de

biotecnologia com algo distante e exclusivamente ligado a tecnologias de cunho abstrato e de difícil compreensão, isto é um equívoco que pretendemos desconstruir ao seu lado no decorrer deste curso.

Te convidamos a brevemente identificar na sua casa, no seu trabalho ou no seu cotidiano, alguns frutos diretos do conhecimento produzido pela biotecnologia. Se após este breve momento você lembrou do pão que você ingeriu no café da manhã, do detergente enriquecido com lipases que você utilizou para lavar sua louça, da sua roupa jeans produzida com o auxílio de celulases de origem fúngica, do álcool combustível do automóvel que você utiliza para se deslocar ou mesmo das vacinas que você recebeu na primeira infância para a prevenção de doenças contagiosas, você pensou certo. Perceba como a biotecnologia é um campo científico absolutamente interdisciplinar e com uma elevada aplicabilidade, e é justamente isso que queremos enfatizar ao longo desta disciplina.

Para construirmos um painel inicial a respeito da diversidade de conhecimentos que residem na definição de biotecnologia, apresentaremos de modo didático as principais grandes áreas da biotecnologia, ressaltando sua importância e suas implicações, de modo a criar um panorama completo dos recursos biotecnológicos e instigar a sua curiosidade para mergulhar nestas possibilidades ao longo dos blocos seguintes.

Biotecnologia nas ciências da saúde

Este é um dos ramos em que a biotecnologia mais contribui ao longo de seu desenvolvimento, classicamente podem ser citados o desenvolvimento dos antibióticos, das vacinas e ainda de fármacos derivados de organismos vivos que você provavelmente já ouviu falar, tais como a aspirina, cujo princípio ativo é o ácido acetilsalicílico, obtido de plantas do gênero *Salix*, popularmente conhecidas como salgueiro; ou ainda o captopril, um anti-hipertensivo bastante prescrito para o controle da pressão arterial, cujo princípio químico é derivado de substâncias isoladas inicialmente do veneno de *Bothrops jararaca*, uma serpente conhecida popularmente sob o nome de jararaca.

Além destas aplicações amplamente consagradas no contexto médico e terapêutico, a biotecnologia continua a fornecer conhecimentos inovadores que em muito podem revolucionar a promoção da saúde. Alguns dos exemplos desta nova fronteira do conhecimento são a terapia gênica que oferece uma medicina absolutamente personalizada, os sistemas *Humano-no-chip* para testes de novas drogas e mesmo a bioimpressão de órgãos humanos que permita diminuir os problemas de rejeição e imunossupressão nos transplantados além de vislumbrar uma drástica redução das filas de espera por transplantes que se avolumam nos sistemas de saúde de todo o mundo.

Biotechnologia aplicada à agropecuária e produção de alimentos

Esta é uma das ramificações mais usuais e consagradas da biotecnologia, cujas atividades dedicam-se principalmente em aplicar o melhoramento genético e a tecnologia da fermentação para a produção de alimentos. Alguns alimentos que ilustram esse intercâmbio entre a biotecnologia e a produção de gêneros alimentícios são os pães, os produtos lácteos, o vinagre, o vinho, a aguardente, as cervejas, os adoçantes e probióticos como kefir e kombucha.

Além destas aplicações usuais, algumas outras aplicações de ponta que podem ser elencadas neste tópico são os alimentos fortificados geneticamente como o arroz dourado, ou mesmo as tecnologias de fermentação biotecnológica que utilizam fungos unicelulares para produção de proteínas que reconstituem em laboratório a composição proteica dos ovos, produzindo este importante alimento sem para isso depender de extensivas e onerosas quantidades de aves confinadas em granjas.

Paralelamente ao desenvolvimento e manipulação dos alimentos, algumas outras perspectivas exploradas nesta biotecnologia agrícola são o desenvolvimento de estratégias de controle biológico e biopesticidas, que permitam a substituição dos agrotóxicos de alto impacto ambiental, além de estratégias de conservação de germoplasma que criam depósitos que salvaguardam o patrimônio genético dos organismos selvagens.

Biotecnologia em biodefesa

Uma área que mobiliza esforços para criar estratégias de vigilância que coíbam e combatam as práticas de bioterrorismo (LACHMAYER, 2006), tais como os incidentes ocorridos em 2001 com a disseminação proposital de bacilos bacterianos causadores de antraz através de cartas e correspondências ou mesmo a contaminação proposital de alimentos com *Salmonella typhimurium* ocorrida em 1984 no Oregon, planejada por um grupo radicalista norte-americano (CARDOSO; CARDOSO, 2014).

Biotecnologia marinha

Um segmento destinado a investigar o potencial das substâncias oriundas dos biomas oceânicos, com particular interesse em moléculas que possam permitir o desenvolvimento de drogas para o enfrentamento de diferentes agravos.

Algumas moléculas de interesse derivadas desta abordagem são: moléculas dos fluidos biológicos do caranguejo ferradura, trabectedina (utilizada como princípio farmacoterápico em medicamentos voltados para o tratamento de câncer de ovário, sarcomas e outras manifestações neoplásicas em tecidos moles), plitidepsina (investigada como indutora de apoptose em tecidos tumorais), PM 184 e lurbinedina (ambos investigados para uso em remissão de nódulos sólidos de teor maligno) (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012; SILVA, 2018).

Biotecnologia ambiental

Este crescente segmento é vocacionado para pensar estratégias de mitigação das práticas antropocênicas com efeito danoso na biosfera. Alguns dos exemplos contidos neste conjunto de possibilidades são as técnicas de biorremediação que exploram o metabolismo de algas, cianobactérias, bactérias e algumas plantas para remoção de compostos nocivos do ambiente e ainda para impedir a bioacumulação tóxica ao longo dos diferentes níveis tróficos das cadeias ecológicas.

A biotecnologia ambiental dá conta ainda das práticas de bioenergia, no qual os organismos vivos são utilizados para substituição de fontes energéticas de maior impacto ecológico. Alguns exemplos possíveis são a utilização de organismos

anaeróbios e termofílicos para produção de biogás a partir de dejetos e excretas ricas em material orgânico. Este exemplo pontual não esgota todas as possibilidades de bioenergia, uma vez que além do biogás, podem ser citados o bioetanol, o biometano e mesmo o biodiesel derivado de diferentes biomassas, dentre as quais importantes espécies oleaginosas cultivadas no Brasil, como mamona, algodão, amendoim, canola, girassol, gergelim, dendê, pinhão manso, babaçu, macaúba, soja e mesmo o sebo animal.

Outras importantes perspectivas são a produção de bioplástico a partir dos compostos de poliamida vegetal, ácido polilático e polihidroxialcanoato de matriz bacteriana e ainda a biomineração, no qual vias metabólicas centrais e acessórias de organismos microbianos são utilizadas para produção de compostos que solubilizam os minérios, de modo a facilitar substancialmente a sua extração e sua consequente manufatura (ARAÚJO *et al.*, 2014). A utilização destas ferramentas de biomineração constitui uma alternativa metodológica que permite diminuir a dependência de práticas tradicionais que envolvem etapas de queima de combustíveis fósseis que emitem gases de efeito danoso e que exigem o maior uso de recursos hídricos para lixiviar os compostos minerais depositados nos horizontes geológicos do solo.

Nanobiotecnologia e bioinformática

Este campo promissor cria diálogos entre o campo biológico e biomédico com a inteligência artificial oriunda da informática e da computação. Através desta intersecção de práticas torna-se possível realizar uma enormidade de experimentos utilizando apenas as teclas de um computador, por exemplo, é possível simular a estrutura tridimensional de uma proteína e simular computacionalmente como esta pode interagir com os anticorpos produzidos pelo sistema imune de um paciente ou mesmo com a farmacocinética de um composto medicamentoso, tudo isso utilizando recursos de ciberealidade que serão posteriormente detalhados no nosso último bloco.

Atuando de modo complementar é imperativo citar a nanobiotecnologia, que se vale da investigação dos recursos provenientes de organismos vivos em modelos

miniaturizados que manipulam a matéria em seu nível molecular e atômico. Esta fusão de perspectivas permite postular aplicações tecnológicas de ponta, dos quais alguns exemplos são os biossensores, os testes de diagnóstico miniaturizado que permitem o diagnóstico de doenças de elevada complexidade em um intervalo de alguns minutos, produção de cosméticos dotados de pequenas vesículas de empacotamento que biodisponibilizam compostos ativos de função antioxidante, e ainda os sistemas de endereçamento de drogas, que permitem direcionar um fármaco para um determinado órgão ou tecido em específico.

Biotecnologia aplicada regulação da propriedade intelectual e a bioética

Campo regulatório que empreende esforços e iniciativas para assegurar os direitos sobre os produtos biotecnológicos desenvolvidos e sob os recursos genéticos, de modo a coibir as práticas de biopirataria e a apropriação criminosa de saberes oriundos das práticas de populações tradicionais.

Além destas questões relacionadas ao exercício da prática jurídica, a biotecnologia se envolve nas complexas discussões a respeito dos limites bioéticos e da definição da responsabilidade do cientista frente aos seus objetos de estudo. Neste panorama é que se enquadram as robustas e multifacetadas discussões relacionadas a manipulação de genes humanos, limites do aconselhamento genético, manipulação de células tronco e aplicação de técnica de clonagem em humanos.

1.2 Desenvolvimento da biotecnologia clássica

Apesar de existir uma visão de que a Biotecnologia é uma ciência recente, cujo surgimento está vinculado aos recentes avanços tecnológicos do século XXI, é preciso pontuar que o conhecimento biotecnológico aplicado a geração de produtos, serviços e tecnologias, acompanha historicamente o desenvolvimento da experiência civilizatória humana.

Existem registros da produção e utilização do conhecimento biotecnológico já em civilizações do período da antiguidade. Os chineses em cerca de três mil anos A.C. já começaram a produzir suplementações alimentares baseadas em recursos biológicos

para produção de efeitos terapêuticos, dentre os quais é possível citar a utilização de extratos de poríferos marinhos como fonte nutracêutica de iodo para indivíduos com quadros endocrinológicos de bócio.

Estas utilizações terapêuticas de compostos de origem natural são registradas em vários outros povos, tais como os egípcios, que de acordo com registros históricos de papiros antigos, utilizavam compostos como genciana, sene e óleo de rícino para o enfrentamento de diversas enfermidades crônicas e infecciosas. Existem registros cuneiformes de povos mesopotâmicos do período de Hamurabi que documentam o uso de extratos de ópio, raiz de mandrágora e heléboro para o enfrentamento de condições patológicas que variavam de verminoses entéricas até quadros de loucura.

Nas civilizações da antiguidade clássica esta aplicação biotecnológica de recursos naturais como estratégias de promoção de cura é igualmente pronunciada, a ponto de que figuras consideradas como precursores da medicina, dentre os quais Hipócrates e Dioscórides, formularam significativos tratados médicos que condicionavam a mitigação de várias moléstias ao uso de extratos, unguentos e substâncias diretamente derivadas de recursos naturais de origem vegetal.

Além da utilização destes produtos, é fundamental citar e pensar, o desenvolvimento dos processos baseados na ação fermentativa de microrganismos anaeróbicos facultativos, mediadores dos processos catabólicos de fermentação. O domínio empírico destas técnicas de fermentação biotecnológica, permitiu a produção de importantes alimentos para os primeiros agrupamentos humanos. Neste contexto é possível citar o desenvolvimento da panificação, o desenvolvimento de bebidas como cerveja e vinho, a produção de produtos lácteos, cujos registros remetem aos sumérios e mesmo os alimentos fermentados à base de biomassa de soja, cuja gênese está diretamente vinculada ao extremo oriente.

Como forma de provar a importância destes bioprocessos na vida cotidiana destas sociedades, podemos analisar historiograficamente a narrativa contida nos textos bíblicos em uma de suas passagens mais conhecidas, na qual é narrada a ceia dos apóstolos no cenáculo em Jerusalém, na qual os alimentos que são simbolicamente

ressignificados são o pão e o vinho, ambos diretamente derivados deste fértil conhecimento biotecnológico alicerçado na antiguidade.

Este processo de desenvolvimento da biotecnologia passa por uma importante sofisticação a partir da revolução microbiana iniciada no século XVII com o desenvolvimento dos recursos de microscopia, e cujo ponto alto são os trabalhos do francês Louis Pasteur no século XIX, responsáveis por correlacionar de modo causal os microrganismos a uma série de eventos biológicos e fenômenos bioquímicos. As contribuições de Pasteur partem desde a perspectiva do desenvolvimento de estratégias imunoproláticas relacionadas à transmissão de raiva e cólera aviária, até a quebra do paradigma da abiogênese e da teoria de transmissão miasmática.

Além de tudo o que foi citado, o trabalho deste químico francês subsidiou a elucidação do processo bioquímico de conversão do açúcar em álcool e dióxido de carbono por meio da fermentação. A explicação deste processo revolucionou inicialmente a indústria cervejeira, sendo posteriormente utilizado em vários outros ramos industriais para a promoção da otimização de processos reológicos, na eliminação de indesejáveis agentes contaminantes e no prolongamento da durabilidade de produtos diversos, este último, conhecido até o presente como Pasteurização.

Outros expoentes das ciências biológicas do século XIX que são fundamentais para entender os avanços posteriores daquilo que a maior parte das pessoas têm em mente quando se discorre sobre a biotecnologia, são Alfred Russel Wallace, Charles Darwin e Gregor Mendel. Os conhecimentos da teoria da seleção natural, associados aos pressupostos da hereditariedade dos caracteres, vão ser fundamentais para conhecer novos mecanismos citológicos e moleculares, que serão fundamentais para inaugurar no século XX uma era contemporânea da biotecnologia, solidamente pautada na manipulação de ácidos nucleicos, na experimentação *in vitro* e na engenharia genética.

O início do século XX marca um avanço exponencial na obtenção e escalonamento da produção fabril de bioprodutos, marcando de forma efetiva o despontar da biotecnologia industrial. Alguns dos marcos que são fundamentais para o entendimento deste cenário de avanço tecnológico vertiginoso correspondem a

descoberta da Penicilina por Alexander Fleming nos anos 20, a partir da ação do metabolismo secundário de fungos do gênero *Penicillium* sobre culturas de *Staphylococcus aureus*. Essa substância foi posteriormente caracterizada como inócua para células animais, e a partir desta constatação passou por um processo de escalonamento em dornas industriais, permitindo a introdução de substâncias no mercado mundial classificadas genericamente como antibióticos, o que acarretou na diminuição da quantidade absoluta de óbitos associados a infecções, enlarguando a média da expectativa de vida global.

Outro marco factual de elevada importância, corresponde aos estudos canadenses de Frederick Banting e Charles Best, que promoveram o isolamento pancreático da insulina a partir das ilhotas de Langerhans de um cão. Esta descoberta subsidiou a produção em larga escala pela empresa escandinava *Nordisk Insulinlaboratorium*, que passou a comercializar ampolas contendo o hormônio produzido a partir de rebanhos animais, sobretudo suínos e bovinos (PIRES; CHACRA, 2008). Esta descoberta por si só já representa um importante evento cronológico na produção de biomoléculas de interesse, contudo, é importante ter em mente que a produção de insulina na era moderna será substancialmente transformada pelo arsenal representado pela tecnologia do DNA recombinante. Em função disto, a produção de insulina para a remediação clínica da diabetes será objeto de análise posterior neste bloco de estudos.

Outras contribuições importantes nesse cenário da engenharia biotecnológica equivalem a caracterização de diversos aminoácidos e a possibilidade de síntese de segmentos peptídicos, dos quais um evento fundamental é a síntese de moléculas pépticas de cadeia longa por Emil Ficsher em 1900. Estas técnicas passaram por uma série de maturações adicionais, de modo que atualmente, pelo consórcio de recursos de bioinformática e engenharia genética é possível produzir inclusive segmentos proteicos quiméricos, que não possuem correspondência com o observado no proteoma de organismos vivos.

1.3 O dogma central da biologia molecular e a tecnologia do DNA recombinante

Neste contexto de desenvolvimento biotecnológico, um importante marco divisor são as pesquisas dos anos 50, relacionadas ao entendimento químico e estrutural das moléculas de ácido nucleico.

Um dos nomes fundamentais para a compreensão desta construção é o da química britânica Rosalind Franklin. A pesquisadora trabalhou com a utilização das técnicas de difração de raios X para análise de materiais cristalinos, e em virtude destas abordagens, acabou retornando ao King's College de Londres, onde passou a aplicar as técnicas de difração em moléculas de DNA, produzindo em 1952 a famosa fotografia 51, através da qual, se observou os primeiros indícios estruturais da molécula de DNA.

Apesar da indiscutível importância do legado da fotografia 51, a trajetória de Rosalind Franklin é envolta por uma série de apagamentos. O seu colega de trabalho Maurice Wilkins, com quem a pesquisadora mantinha uma relação conflituosa, acabou por compartilhar (de forma não autorizada) os achados dos estudos de difração com pesquisadores de Cambridge, que aperfeiçoaram suas interpretações e postularam novos modelos, sem, no entanto, creditarem a Rosalind a sua importância seminal, de modo que ela é a única integrante deste grupo de pesquisadores que não foi agraciada com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina.

Atualmente, se constituiu um esforço para recuperar a importância acadêmica de Rosalind, tanto que a mesma foi escolhida para dar nome a um importante centro de pesquisas médicas do Reino Unido, e na tentativa de popularizar os seus feitos, foi homenageada pelo site oficial da Google, em 25 de julho de 2013, data em que se celebra o aniversário da cientista.

Os resultados das técnicas de difração permitiram que a dupla James Watson e Francis Crick postulassem em 1953 a teoria da dupla hélice do DNA, no qual fica demonstrado que a molécula de ácido desoxirribonucleico é constituída por duas cadeias polinucleotídicas, compostas por tipos diferentes de bases nitrogenadas unidas por ligações fosfodiéster, e que se ligam entre si através de ligações não covalentes do tipo pontes de hidrogênio, mantendo uma disposição geral de caráter helicoidal.

Como derivação destas importantes descobertas é que surge o dogma central da biologia molecular, na qual fica demonstrado a forma pela qual acontece o fluxo de informação genética no ambiente celular. Sendo assim, a molécula de ácido desoxirribonucleico passa por uma maquinaria transcricional que produz cadeias de ácido ribonucleico, que são traduzidas pela maquinaria ribossomal, formando as proteínas em seu estado primário. A proposição do dogma central abriu um importante horizonte, uma vez que demonstrava possibilidades de intervenção neste fluxo de informações, de modo a produzir efeitos biológicos específicos.

As possibilidades de manipulação genética inauguradas com o dogma central da biologia molecular são genericamente denominadas de tecnologia do DNA recombinante. Esta tecnologia permitiu o início das clonagens de genes nos anos 70, a criação de empresas de biotecnologia voltadas para a engenharia genética e a produção de organismos geneticamente modificados por técnicas de transgenia, dos quais um exemplo importante são as bactérias recombinantes produtoras de insulina humana. Estes organismos procariotos recombinantes, contém em seu material genético um inserto com o gene da insulina humana, de modo que conseguem produzir o hormônio similar ao produzido por células pancreáticas humanas. A produção desta insulina em modelos recombinantes dispensa as laboriosas técnicas anteriores de obtenção de insulina suína e bovina e contorna os problemas colaterais de alergia e rejeição a insulina animal em pacientes humanos.

Além deste exemplo citado, vários outros produtos recombinantes começam a surgir nas mais diversas áreas, dentre os quais tomates produzidos pela empresa norte-americana Calgene, nos quais as modificações nas rotas metabólicas dos flavonóides produziram uma maior resistência ao armazenamento. Outro substancial exemplo são as culturas agrícolas (principalmente milho, soja e arroz) com genes bacterianos que conferem resistência a pragas, fitopatógenos e herbicidas (estes últimos envolvidos em múltiplas discussões ecológicas). Podem ser apontados ainda, os vegetais voltados a produção de suplementação vitamínica e produção de biofármacos, cujo exemplo importante é o chamado arroz dourado, cuja manipulação genética permitiu o acúmulo de um maior aporte de betacaroteno, precursor fundamental da vitamina A.

Além dos modelos microbianos e vegetais, a manipulação genética também alcançou os organismos animais. Inicialmente os primeiros estudos tinham como objetivo gerar modelos biológicos nocaute para estudos de doenças e agravos e para investigação de xenotransplantes, cujo exemplo importante são as linhagens de suínos P33, cuja alteração visava tornar o endotélio de seus vasos menos reativo aos componentes hematopoiéticos humano, pela presença da alfa-galactose, tornando-os mais compatíveis ao uso em transplantes em pacientes humanos.

Outro marco simbólico é a ovelha Polly, gerada na década de 90 na Escócia pelo mesmo grupo de pesquisa que alguns meses antes haviam produzido a ovelha Dolly por meio de recursos de clonagem. A transgenia aplicada à ovelha Polly, visava produzir uma proteína a ser empregada no tratamento de indivíduos portadores de quadros de fibrose cística.

Posteriormente, essas técnicas passaram a ser aplicadas ao melhoramento de características zootécnicas (AZEVEDO et al., 2000), como por exemplo uma variante de salmão que se desenvolve duas vezes mais rápido do que um peixe convencional não transgênico. Esta variante de salmão chamada de AquAdvantage, foi o primeiro animal transgênico aprovado por agências regulatórias para consumo humano. Outra linha de trabalho têm sido o desenvolvimento de animais com resistência sanitária a enfermidades de interesse zoonótico, tais como linhagens de ruminantes com resistência a ação neurodegenerativa fatal de príons causadores de quadros de encefalopatia espongiforme bovina, conhecida popularmente como mal da vaca louca (BRUN et al., 2007; ESPINOSA et al., 2009).

Por fim, é importante citar o crescente registro do desenvolvimento de animais biorreatores, que produzam moléculas de interesse a serem secretadas no seu leite, tais como a produção de proteínas anticoagulantes de efeito antitrombótico em cabras transgênicas biorreadoras, e mesmo fatores de coagulação para paciente hemofílicos, cujas técnicas serão detalhadas nos blocos futuros.

Na vanguarda destas aplicações da biotecnologia contemporânea estão as abordagens envolvendo os organismos humanos. Alguns marcos desse processo são o isolamento

de células embrionárias humanas a partir de um feto abortado, que acaba por inaugurar um fértil campo de discussões referentes à manipulação de células pluripotentes e totipotentes. Outra fronteira ultrapassada no século XXI diz respeito à condução do projeto Genoma Humano, que reuniu um robusto financiamento de agências governamentais e esforços concatenados de pesquisadores de dezoito países (GREEN; WATSON; COLLINS, 2015), e que em abril de 2003 apresentou 99% do genoma humano, sequenciado com 99,99% de precisão, inferindo que o genoma completo de cada indivíduo possui cerca de 3,2 bilhões de nucleotídeos (COLLINS; MORGAN; PATRINOS, 2003). A partir destes dados, é criado um banco de informações sem precedentes na história, o que implica em novas oportunidades de investigação e entendimento do funcionamento das maquinarias celulares, permitindo o desenvolvimento de novos feitos revolucionários.

A reboque destas possibilidades de avanço vertiginoso, estas descobertas expõem a necessidade urgente de discutir paradigmas bioéticos, além de permitir uma série de debates em torno dos marcos regulatórios que regulamentam o exercício da biotecnologia, de modo a conciliar a inovação tecnológica, a liberdade intelectual e a responsabilidade ética do ofício científico.

Todas estas discussões e reflexões iniciadas aqui objetivam aguçar a sua percepção e curiosidade a respeito da versatilidade que a biotecnologia acumula em nossa realidade, assim convidamos para que permaneça aqui ao longo dos demais blocos e tópicos, para juntos detalharmos todas estas aplicações e aprendermos como utilizar estes conhecimentos a favor da formação acadêmica ativa e da produção de soluções reais para os problemas que orbitam em nossa sociedade.

Conclusão

Neste primeiro bloco definimos a biotecnologia como um coletivo de aplicações tecnológicas de naturezas variadas, que recorrem aos sistemas biológicos, seja através de organismos vivos ou por meio de seus derivados, no intuito de fabricar e/ou modificar produtos, processos e serviços para aplicações específicas. Dentro deste amplo leque de possibilidades, analisamos e exemplificamos as aplicações

relacionadas a diferentes áreas do conhecimento humano, dentre as quais as ciências da saúde, a agropecuária e produção de alimentos, a biodefesa, as ciências marinhas e oceanográficas, as ciências ambientais, a nanobiotecnologia, a bioinformática e as áreas jurídicas e filosóficas relacionadas a propriedade intelectual e a bioética.

Além disso, construímos um panorama histórico que acompanhou cronologicamente a sofisticação da biotecnologia, iniciado nos conhecimentos empíricos da fermentação na antiguidade, passando pelo advento da revolução microbiana e do escalonamento industrial e chegando a consolidação de conhecimentos celulares que desembocou no dogma central da biologia molecular, que passou a subsidiar a biotecnologia contemporânea.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. C. O. et al. Biomineração: Extração sustentável e silenciosa de Minério. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, n. 3, p. 253-264, set./nov. 2014.

AZEVEDO, João Lúcio de; FUNGARO, Maria Helena Pelegrinelli; VIEIRA, Maria Lúcia Carneiro. Transgênicos e evolução dirigida. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 7, n. 2, p. 451-464, out. 2000. FapUNIFESP (SciELO).

BRUN, A. et al. Reduced susceptibility to bovine spongiform encephalopathy prions in transgenic mice expressing a bovine PrP with five octapeptide repeats. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 6, p. 1842-1849, 1 jun. 2007. Microbiology Society.

CARDOSO, Dora Rambauské; CARDOSO, Telma Abdalla de Oliveira. Bioterrorismo: dados de uma história recente de riscos e incertezas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 821-830, 2011. FapUNIFESP (SciELO).

COLLINS, Francis S.; MORGAN, Michael; PATRINOS, Aristides. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 286-290, 11 abr. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

CUSHMAN, D. W. et al. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **The American Journal of Cardiology**, v. 49, n. 6, p. 1390-1394, abr. 1982. Elsevier BV.

ESPINOSA, J. C. et al. Transgenic Mice Expressing Porcine Prion Protein Resistant to Classical Scrapie but Susceptible to Sheep Bovine Spongiform Encephalopathy and Atypical Scrapie. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1214-1221, ago. 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

FELÍCIO, Rafael de; OLIVEIRA, Ana Ligia Leandrini de; DEBONSI, Hosana Maria. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012. FapUNIFESP (SciELO).

GAVIN, William. ATryn®: 1st ge (genetically engineered) animal success story for production of a human recombinant pharmaceutical. **Bmc Proceedings**, v. 8, n. 4, out. 2014. Springer Science and Business Media LLC.

GREEN, Eric D.; WATSON, James D.; COLLINS, Francis S. Human Genome Project: twenty-five years of big biology. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 29-31, 30 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

HULSE, Joseph H. Biotechnologies: past history, present state and future prospects. **Trends In Food Science & Technology**, v. 15, n. 1, p. 3-18, jan. 2004. Elsevier BV.

LACHMAYER, Konrad. Legal aspects of “black biotechnology” – Counter-terrorism between prevention and use of biotechnological products. **Journal of International Biotechnology Law**, v. 3, n. 6, 1 jan. 2006. Walter de Gruyter GmbH.

PIRES, Antonio Carlos; CHACRA, Antonio Roberto. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 268-278, mar. 2008. FapUNIFESP (SciELO).

SCOTT, M. R. et al. Transmission Barriers for Bovine, Ovine, and Human Prions in Transgenic Mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5259-5271, maio 2005. American Society for Microbiology.

SILVA, Ana Filipa Oliveira Vieira Gonçalves da. **Antineoplásicos derivados do mar**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

2 ASPECTOS GERAIS DE FERRAMENTAS DA BIOLOGIA MOLECULAR

APRESENTAÇÃO

No primeiro bloco da disciplina apresentamos uma ampla gama de aplicações e vertentes do conhecimento biotecnológico, e você percebeu que para alcançar aqueles resultados é necessária a utilização de uma série de ferramentas. Estas ferramentas são um aglutinado de citologia, bioquímica, genética e de várias outras áreas possíveis do conhecimento biológico, e juntas integram parte daquilo que chamamos de Biologia Molecular.

Neste segundo bloco, queremos compartilhar essas ferramentas com você, para lhe oferecer subsídios para explorar inúmeros campos de trabalho, que podem ir do laboratório de pesquisa até o trabalho a campo, ou mesmo do ramo industrial até a área investigativa da perícia forense.

Assim, te convidamos para conhecer estes detalhes e aprimorar estas técnicas, que vão da extração inicial dos ácidos nucleicos até o sequenciamento gênico de nova geração. Nosso objetivo é que ao fim deste bloco consigamos entender didaticamente como funciona um teste de identificação do DNA de um indivíduo suspeito em uma amostra colhida no local de um crime ou mesmo como é possível identificar um paciente infectado por um agente infeccioso, através dos tão populares testes de DNA.

2.1 Extração de ácidos nucleicos

As múltiplas ferramentas de biologia molecular que serão tratadas neste bloco e que produzem uma infinda quantidade de aplicações tecnológicas envolvem diretamente a manipulação e edição do material genético. Contudo, para que estes processos se tornem factíveis, é necessário a adoção de instrumentos que permitam obter os ácidos nucleicos a partir dos tecidos biológicos. Assim, a parte inicial deste bloco se destina a compreensão dos fundamentos que embasam as técnicas de extração, purificação e conservação de ácidos nucleicos.

O estudo de citologia nos demonstrou que as cadeias nucleotídicas ficam dispostas no interior das células, revestido por uma carioteca nos organismos eucariotos, ou disperso no ambiente citoplasmático em meio a outras organelas, no caso de organismos procariotos. Assim, o acesso a esta molécula alvo de interesse, compreende a superação de todas estas barreiras oferecidas pela célula.

A primeira etapa para promover a liberação do material genético é romper as membranas plasmáticas e nucleares que atuam como invólucros celulares. Estas membranas de revestimento se caracterizam por possuírem uma espessura bastante pequena e por serem bioquimicamente classificadas como regiões hidrofóbicas. Essa hidrofobicidade é garantida pela presença de cadeias de ácidos graxos, como glicolipídios, colesterol e principalmente fosfolipídios. Os fosfolipídios que integram majoritariamente estas membranas permitem a formação de uma estrutura de bicamada lipídica com forte teor anfotérico, ou seja, intercalam regiões hidrofílicas que interagem com os ambientes aquosos e regiões hidrofóbicas que garantem a integridade estrutural.

Em virtude das características bioquímicas explicadas acima, o rompimento destas membranas exige a participação química de solventes orgânicos e agentes disruptores de gordura, que nada mais são do que espécies de detergentes. Estas substâncias promotoras de lise possuem regiões polares e regiões apolares, o que permite interagir com a bicamada lipídica, formando pequenas micelas a partir de sua atividade emulsificante. A consequência direta desta dissolução de gorduras é a exposição do material genético que até então estava retido no interior das células.

Após o rompimento das membranas, o material genético de interesse ficará disperso em uma mistura junto a outros componentes celulares, sendo necessário a separação do mesmo em relação a estas outras macromoléculas indesejáveis. Uma das principais categorias de moléculas que estarão abundantes nesta espécie de caldo celular são as proteínas, sendo que algumas destas possuem inclusive a capacidade enzimática de degradar as cadeias de DNA e RNA. Logo, para impedir esta ação deletéria e contaminante, as metodologias de extração preconizam em seus protocolos a utilização de proteases. Estas proteases são enzimas que degradam especificamente as

proteínas presentes, sem, no entanto, comprometer a integridade dos ácidos nucleicos, aumentando o nível de pureza do material extraído (ALI *et al.*, 2017).

Após estas etapas iniciais de eliminação de debris celulares é necessário o isolamento propriamente dito dos ácidos nucleicos. Para isso, a expressa maioria dos protocolos exploram o princípio químico da precipitação. Para promover a precipitação são necessários agentes que induzam a transição estrutural nas moléculas, fazendo com que as fitas se agreguem e decantem. Alguns dos compostos que induzem este processo são os reagentes de cadeias alcoólicas, como isopropanol ou etanol. Uma outra possibilidade são soluções de alta osmolaridade, constituídas a partir da alta concentração de sais catiônicos. Estas etapas podem ser realizadas a partir da adição manual destes reagentes seguidas por sucessivas e repetidas etapas de centrifugação ou a partir da ação de kits comercialmente elaborados, que empregam espécies de resinas, que por afinidade, ligam-se às cadeias nucleotídicas, que são posteriormente recuperadas a partir do emprego de eluentes de maior afinidade interacional, que promovem o desligamento desta molécula da matriz da resina e conservam o material genético íntegro e apto para uso em etapas futuras, que serão abordadas nas próximas seções deste material.

2.2 Métodos de amplificação de material genético

Um dos elementos substanciais que integram o aporte instrumental de ferramentas da biologia molecular são as reações *in vitro* que mimetizam as reações ocorridas naturalmente no núcleo celular. A partir da reprodução destas reações em escala laboratorial, torna-se possível explorar a exequibilidade em uma ampla variedade de aplicações. Na tentativa de propor uma abordagem didática, alguns possíveis exemplos de aplicação prática destas técnicas são as abordagens forenses de comparação entre perfis amostrais de vítimas e eventuais suspeitos, ou mesmo reações diagnósticas para identificação de doenças infecciosas, tais como as empregadas para confirmação da presença do vírus SARS-CoV-2 em pacientes com suspeita clínica.

Replicação do material genético

Para entender o racional utilizado nestas técnicas de amplificação é preciso recuperar brevemente os mecanismos enzimáticos envolvidos na atividade de replicação *in vivo* do DNA, que ocorrem naturalmente no ambiente nuclear das células eucarióticas ou no citosol de organismos procariotos.

O processo de replicação do DNA possui caráter semiconservativo, o que significa que novas cadeias de DNA são produzidas bidimensionalmente a partir da complementaridade antiparalela de cadeias de DNA parentais utilizadas como molde. O substrato para produção destas fitas complementares são os nucleotídeos livres no nucleoplasma de cada célula, que seguem a regra de complementaridade das bases azotadas, na qual a ligação de guanina é sempre estabelecida com citosina, enquanto adenina é sempre pareada a timina, cujas ligações são mediadas por três e duas pontes de hidrogênio, respectivamente.

A replicação do DNA ocorre sempre no sentido 5' - 3', desta forma em uma das fitas o processo ocorre de modo contínuo, ao passo que na fita oposta o processo se dá de modo descontínuo, requerendo a participação auxiliar dos fragmentos de Okazaki. Adicionalmente, a deflagração efetiva do processo é mobilizada por um conjunto de enzimas, cujas funções particulares são rememoradas abaixo:

- Topoisomerase: enzimas que aliviam a torção da estrutura da dupla fita a partir da forquilha de replicação, assegurando a estabilidade conformacional e permitindo a ancoragem das enzimas subsequentemente envolvidas na maquinaria replicativa;
- Helicase: enzimas que promovem a abertura da estrutura de dupla fita da cadeia de DNA, através do rompimento das ligações não covalentes estabelecidas entre as bases complementares;
- Primase: enzimas que atuam nas fitas livres geradas pela ação prévia da topoisomerase e da helicase, de modo a sintetizar um fragmento inicial curto

que atua fornecendo uma extremidade 3' livre que servirá como ponto de ancoragem para as moléculas de polimerase;

- DNA Polimerase: enzimas que acumulam papel central no mecanismo replicativo, atuando no estabelecimento de pontes de hidrogênio entre as bases complementares, promovendo a ligação da fita recém-sintetizada na fita molde. Além disso, a polimerase permite a ligação da pentose de um nucleotídeo com o grupamento fosfato do resíduo subsequente. Além destas funções efectoras, a polimerase ainda é responsabilizada por uma atividade de reparo nos erros eventualmente acumulados durante o processo;
- Ligase: enzimas que tem como função ligar os pequenos fragmentos gerados na replicação da fita descontínua, de modo a unificar estas sequências curtas e produzir uma fita íntegra.

A ação síncrona destas enzimas se distribui ao longo de três fases bem delimitadas: iniciação, extensão da fita ou alongamento e terminação.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As várias aplicações citadas na introdução deste tópico decorrem do uso da reação em cadeia da polimerase, ou simplesmente reação de PCR, que em suma é a transposição *in vitro* do mecanismo celular apresentado anteriormente. A exequibilidade deste método decorre dos achados bioquímicos de Kary Mullis, que conduziu pesquisas envolvendo *Thermus aquaticus*, uma espécie de bactéria extremófila oriunda de lagos termais sulfurosos do parque de Yellowstone. A partir da caracterização destas bactérias, foi possível obter moléculas de polimerase termoestáveis, o que barateou e massificou o uso da PCR, dispensando as onerosas e repetidas etapas utilizadas até então que exigiam o acréscimo manual de variantes enzimáticas termossensíveis, diretamente extraídas de cultivos de bactérias mesófilas generalistas.

Outro elemento que contribuiu para o vertiginoso uso da técnica de PCR diz respeito a automatização do processo, através da utilização de equipamentos denominados de termocicladores, cuja operação permite um controle padronizado do binômio

tempo/temperatura, repetindo as mesmas condições por numerosos ciclos sequenciais, gerando quantidades detectáveis de DNA, suficientes para posteriores etapas de manipulação e uso em finalidades diversas.

O uso destes aparelhos permitiu gerar quantidades exponenciais do alvo gênico de interesse, o que representa uma significativa diferença em relação ao processo *in vivo*, haja visto que aqui é possível amplificar apenas uma região particular da sequência, em função da utilização de oligonucleotídeos iniciadores, que serão detalhados a frente.

A obtenção do material amplificado pode ser analiticamente compreendida a partir do somatório das contribuições individuais de cada um de seus componentes químicos, dessa maneira, segue uma breve listagem dos mesmos acompanhada da descrição de suas finalidades de uso.

Quadro 2.1. Componentes químicos e respectiva função dos elementos envolvidos na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Componentes da Reação	Função Química
DNA alvo	Sequência alvo que se quer amplificar por meio da reação de PCR. Tomando como exemplo uma reação de PCR cujo objetivo é o diagnóstico de uma doença infecciosa em um paciente humano, a sequência que corresponde ao DNA alvo é a sequência gênica do patógeno presente na amostra diretamente colhida do paciente.
Oligonucleotídeos	É um análogo <i>in vitro</i> dos fragmentos de Okazaki presentes no ambiente celular, que equivale a pequenas sequências de nucleotídeos iniciadores (idealmente contendo de 15 a 20 nucleotídeos), que exibem complementaridade com a região a ser flanqueada. Os iniciadores se apresentam aos pares, de modo

	que o segmento <i>forward</i> parecia com a fita contínua, enquanto o segmento <i>reverse</i> estabelece uma complementaridade com a fita descontínua. A construção da sequência destes fragmentos está diretamente vinculada ao nível de especificidade alcançado na reação.
Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (DNTPs)	Bases nitrogenadas púricas (adenina e guanina) e pirimídicas (citossina e timina) dispersas individualmente, importantes para garantir a extensão da fita por ocasião da ligação com a polimerase.
<i>Taq</i> Polimerase	Polimerase termoestável que reconhece os nucleotídeos iniciadores contiguamente ligados a fita molde. Além da enzima propriamente dita, a reação envolve a presença de substâncias tamponantes que asseguram a estabilidade do funcionamento reológico da enzima.
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	Cofator da enzima DNA polimerase, que promove uma melhor performance da atividade efetora da enzima. A presença destes cofatores é importante para driblar o esgotamento enzimático antes do término da reação.

Fonte: Autor, 2022.

O funcionamento destes elementos na reação de PCR é dirigido por uma cinética térmica que compreende três estágios sequenciais bem definidos, cuja transição é controlada pelo termociclador:

- **Desnaturação:** esta etapa inicia todos os ciclos de reação e consiste na aplicação de uma temperatura de 94°C, que promova a abertura da dupla fita através do rompimento das ligações de hidrogênio. No processo endógeno

ocorrido nas células, esta abertura é realizada pela forquilha de replicação e pela ação da topoisomerase e da helicase, que aqui são substituídas pela ação térmica, que ao romper as ligações de hidrogênio, permite a interação com os demais componentes da reação;

- Anelamento: após a separação das fitas na etapa anterior, é promovida uma redução gradual da temperatura até cerca de 55°C a 65°C, momento no qual haverá o pareamento do par de oligonucleotídeos iniciadores, cada um em sua respectiva fita homóloga. A ligação deste par de iniciadores irá delimitar a região alvo que será amplificada, representando uma das principais diferenças da amplificação por PCR em comparação a replicação celular. Vale citar que cada iniciador, a depender de seu tamanho e constituição, terá uma temperatura de anelamento específica, por este motivo a temperatura da etapa de anelamento pode variar de reação para reação, diferente das demais etapas, que possuem temperaturas amplamente padronizadas e definidas;
- Extensão: após o anelamento dos iniciadores nas fitas desnaturadas, ocorre uma elevação de temperatura para 72°C, que corresponde a temperatura de funcionamento ótimo da enzima *Taq* polimerase. A medida que a enzima polimerase se aproxima da região flanqueada pelos iniciadores ela promove a síntese da fita a partir dos DNTs presentes na reação, promovendo o aumento do número de cópias da região gênica de interesse.

Cada ciclo corresponde a sucessão entre estes três estágios, logo, ao final dos cerca de 35 ciclos que compõem a reação completa, o número de cópias será exponencialmente maior que o inicial, gerando uma quantidade suficientemente alta para ser detectada nas etapas metodológicas seguintes. A grosso modo, podemos determinar a quantidade final de material amplificado a partir da aplicação do seguinte modelo matemático:

$$N = N_0 \times 2^n, \text{ onde:}$$

N = Número final de cópias amplificadas;

N_0 = Número inicial de cópias;

n = Número total de ciclos empregados na reação.

Para aplicarmos os conceitos abordados até aqui, propomos a análise da seguinte situação problema. Imagine que uma equipe médica solicita ao laboratório hospitalar a identificação da causa de uma infecção parasitária em um paciente recém internado através do conjunto de ferramentas da biologia molecular.

Nessa situação em particular pense que o exame de identificação molecular precisará diferenciar o material genético do agente etiológico da infecção do material genético do próprio paciente. Para isso, os nucleotídeos iniciadores devem ser específicos para o DNA do causador da doença, assegurando o pareamento correto e a amplificação exclusiva do alvo patogênico, garantindo a especificidade da reação. A temperatura de anelamento a ser programada no termociclador será função direta do tamanho e da composição deste par de iniciadores, enquanto as demais temperaturas utilizadas no exame seguirão os valores padrões. Ao fim da reação, caso ocorra a amplificação do alvo genético admite-se que o paciente estava positivo para infecção por aquele determinado patógeno, por outro lado, caso o resultado não demonstre nenhuma amplificação, infere-se que o paciente estava negativo para aquela determinada doença.

Uma variação possível da técnica de PCR é o que chamamos de RT-PCR, abreviação para reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa. O objetivo central desta reação é permitir a síntese de fitas de DNA a partir de cadeias de RNA mensageiro, o que permite a obtenção apenas das regiões funcionais codificadoras de proteínas, chamadas genericamente de éxons. Para isto, é fundamental a utilização da enzima transcriptase reversa, encontrada em um grupo viral conhecido como retrovírus, que subvertem o dogma central da biologia molecular e produzem cadeias de RNA a partir de DNA, integrando-os posteriormente ao genoma da célula hospedeira através da enzima integrase (EMERY et al., 2004). Um diferencial da RT-PCR em relação ao PCR convencional é a possibilidade de conduzir estudos de expressão, uma vez que aqui

não ocorre a amplificação de regiões regulatórias não codificantes, também chamados de íntrons.

Do ponto de vista prático, a RT-PCR será dividida em duas reações. A primeira responsável pela conversão do RNA em DNA complementar (cDNA), através de um oligonucleotídeo (oligo-dT), menos específico que os envolvidos na PCR convencional. Este oligo-dT corresponde a uma sequência repetida de timinas, que se liga por complementaridade a cauda poli-A das terminações do RNA mensageiro, permitindo a síntese do cDNA. Só após a obtenção completa do cDNA é que se procede à segunda etapa da reação, cujo processo de obtenção do número exponencial de cópias de DNA é similar ao observado na PCR convencional.

Algumas outras variações técnicas da reação de PCR que podem ser citadas são a Multiplex PCR, na qual mais de um segmento genômico é amplificado em uma única reação, de modo que nesta modalidade vários pares de primers estão presentes paralelamente na mesma reação, o que pode representar um aumento na praticidade de operação.

Outra variação é a Nested PCR, que fraciona a reação em dois momentos, o primeiro produzindo a amplificação de um segmento de maior comprimento, e a segunda com a amplificação de um segmento interno menor, que corresponde a região alvo propriamente dita. Este recurso acaba sendo usado em algumas situações nas quais se deseja aumentar as razões de sensibilidade da reação.

Identificação dos produtos de amplificação por técnica de eletroforese

Após a realização da reação de PCR é preciso determinar a eficiência da amplificação do alvo gênico, para isso, uma das principais formas empregadas para visualização e determinação da massa deste segmento amplificado é a utilização da eletroforese. Esta técnica é utilizada na bioquímica desde os anos 30 e consiste em uma metodologia prática de separação de macromoléculas, pautada em seus diferentes tamanhos e cargas.

O princípio fundamental desta técnica consiste na aplicação de uma corrente elétrica em um ambiente condutivo (obtido através da utilização de soluções tamponantes contendo acetato ou borato), de modo que o aparelho possui obrigatoriamente um polo positivo (ânodo) e um polo negativo (cátodo). Após a aplicação da corrente eletroquímica, as moléculas tendem a migrar para o polo com carga contrária a sua, alcançando a neutralização das cargas dos íons. No caso das moléculas de DNA, em função da presença dos grupamentos fosfato, a sua carga global é sempre negativa, logo a aplicação do material amplificado em uma reação de eletroforese mediante determinada voltagem, prevê a migração destas cadeias do cátodo em relação ao ânodo. Esta informação química, permite inferir que sempre que uma cuba de eletroforese for preparada, o material genético deve ser cuidadosamente aplicado nos poços presentes na margem negativa. Caso contrário, a reação não ocorrerá da forma desejada.

A voltagem aplicada ao sistema para promover a migração do DNA costuma oscilar entre 10 e 200 V, com uma corrente de 50 a 3000mA. Esta variação ocorre em função do modelo de equipamento, do tipo de reagente envolvido e da finalidade do ensaio.

Para promover uma adequada separação das moléculas com base em seu tamanho, é necessário a utilização de uma matriz polimérica, que irá atuar como uma espécie de peneira, de modo a permitir a passagem de fragmentos diminutos e reter os fragmentos de maior tamanho. Alguns dos polímeros utilizados para este propósito são a poliacrilamida e principalmente a agarose, esta última derivada de polissacarídeos de algas marinhas, que quando preparados para o uso acabam por assumir uma forma gelatinosa. A concentração do polímero varia diretamente em função do grau de resolução necessário para separação das moléculas. Imagine que um gel constituído por agarose em uma concentração de 1,5% consegue separar fragmentos em intervalos de 50 pares de base (pb), enquanto um gel preparado com agarose a 3% consegue separar fragmentos com diferença de tamanho de 25 pb.

Em resumo, a distância percorrida pela molécula no gel de eletroforese é inversamente proporcional ao seu tamanho, ou seja, os fragmentos que mais se aproximaram do ânodo durante a corrida, são aqueles com um menor comprimento

de pares de base. Para interpretar estes resultados e determinar o tamanho exato das cadeias, são utilizadas moléculas-controle cujo tamanho é conhecido (comumente chamadas de *ladders*), que servem como espécie de réguas métricas de comparação, a partir do qual o tamanho dos amplificados será determinado.

Após a realização da corrida de eletroforese, o gel contendo a amostra será tratado com corantes fluorescentes e/ou substâncias intercalantes de DNA, como brometo de etídeo ou nitrato de prata, que ao impregnarem na molécula e serem contrastados contra uma fonte de luz ultravioleta, geram uma banda colorimétrica visível que corresponde a sequência nucleotídica amplificada anteriormente na reação de PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Até o momento todas as modalidades de PCR abordadas dependiam da ação complementar da eletroforese, entretanto, isto não é uma regra absoluta. Existe uma modalidade de PCR, cujo principal atributo é justamente o fato de dispensar as etapas subsequentes de eletroforese, esta modalidade é denominada reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) ou simplesmente reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) (ARYA *et al.*, 2005).

A utilização da PCR em tempo real prevê a utilização de um sistema de detecção de sinal fluorescente acoplado ao termociclador, de modo que a quantidade de cópias amplificadas pode ser quantificada de modo simultâneo a ocorrência dos ciclos, diferentemente da PCR convencional, que emite apenas um resultado de caráter qualitativo ao final do processo.

O teor quantitativo desta variante de PCR está dimensionado nos valores de *cycle threshold* (C_T) que são calculados pelo equipamento. Esse valor é o ponto no qual o sinal fluorescente (diretamente proporcional a quantidade de DNA) atinge o limiar da fase de amplificação exponencial. Esta determinação numérica baseada nos valores de C_T cria uma maior taxa de reprodutibilidade, o que é algo vantajoso para pensar a aplicação massiva desta técnica em laboratórios de pesquisa e diagnóstico.

Conforme citado anteriormente, a PCR em tempo real depende de um mecanismo de emissão e detecção de sinal fluorescente, haja visto que a quantidade de DNA presente na reação é diretamente proporcional ao sinal captado (BUSTIN *et al.*, 2005). Em virtude disso, o sistema reacional depende do uso de moléculas que apresentem esta excitabilidade ótica. Estas moléculas são conhecidas como fluoróforos, e promovem a absorção e emissão de luz quando postas em um comprimento de onda específico. Existem alguns tipos de modelos de fluoróforos e sondas empregados na PCR em tempo real (TAJADINI; PANJEHPOUR; JAVANMARD, 2014), que serão brevemente citados abaixo:

- SYBR® Green: a molécula se liga entre a cadeia dupla do DNA, e à medida que ocorre a excitação pela luz emitida a sonda emite uma fluorescência. Assim, ciclo após ciclo o sinal fluorescente captado aumenta, em função da maior quantidade de fitas duplas disponíveis para a ancoragem do SYBR® Green. Este fluoróforo de coloração esverdeada apresenta boa sensibilidade e é considerado o de menor custo e maior facilidade de uso. Por outro lado, o fato dele se ligar em qualquer molécula de dupla fita existente na reação, pode representar um problema de especificidade e um considerável viés que superestime o valor de CT obtido;
- TaqMan®: esta molécula corresponde a uma junção de duas regiões, o fluoróforo propriamente dito e uma segunda região chamada de *quencher*, que recebe a energia emitida pelo fluoróforo e a dissipa no sistema. Esta sonda hibridiza nas cadeias de DNA e à medida que a polimerase exerce sua atividade de exonuclease ela rompe a ligação entre o fluoróforo e o quencher, com isso, o quencher não mais dissipa o sinal fluorescente, de modo que este se eleva consideravelmente, indicando o aumento do número de cópias amplificadas;
- Molecular beacons: sistema menos empregado do que os modelos anteriores, cujo funcionamento se baseia em oligonucleotídeos que hibridizam em uma região específica da sequência alvo, e mediante esta complementaridade alteram sua conformação e tornam-se capazes de emitir um sinal fluorescente detectável. Estes marcadores podem ser sintetizados para emitir diferentes

tonalidades colorimétricas, o que permite a utilização de diferentes sondas na mesma reação, de modo a identificar simultaneamente dois alvos distintos (LI; ZHOU; YE, 2008). Dentre todas as moléculas analisadas aqui, esta é a que promove um maior nível de especificidade, conseguindo distinguir sequências alvo que diferem entre si por apenas uma base nitrogenada, o que credencia os mesmos para ensaios de rastreamento de mutações e identificações de padrões polimórficos.

Em termos gerais podemos considerar que a PCR em tempo real possui uma maior praticidade, uma maior velocidade na obtenção de resultados, a possibilidade de uma interpretação quantitativa mais robusta, além de uma maior reprodutibilidade e menores níveis de contaminação experimental. Por outro lado, requerem equipamentos com maiores níveis de sofisticação, e consequentemente com um maior custo de obtenção e manutenção. Assim, não se pode inferir categoricamente que uma modalidade de PCR é melhor ou pior que outra, cabendo ao pesquisador a feitura de uma análise ponderada de sua realidade e de suas necessidades, para com base nisso determinar qual modalidade melhor se adequa a seu contexto de trabalho.

2.3 Métodos de sequenciamento de material genético

Um desdobramento possível das metodologias de amplificação de material genético discutidas anteriormente, é a utilização destes amplificadores para a determinação fidedigna da ordem precisa dos nucleotídeos que compõem uma dada cadeia gênica (PAREEK *et al.*, 2011). Portanto, em linhas gerais, os métodos de sequenciamento possibilitam a determinação da identidade particular de uma molécula de DNA, aumentando consideravelmente o nível de refino em relação aos recursos de PCR.

O advento das tecnologias de sequenciamento é retardatário em relação às primeiras descobertas estruturais da biologia molecular dos anos 50. Somente na década de 70 que os primeiros modelos de determinação das sequências de DNA são postulados (HEATHER; CHAIN, 2016). O primeiro deles é proposto pela dupla Allan Maxam e Walter Gilbert, e parte da premissa que uma clivagem química da terminação 5' de um material amplificado marcado radioativamente irá gerar uma série de pequenos

fragmentos de tamanhos distintos, que serão separados e ordenados por uma corrida de eletroforese em placas de vidro (MAXAM; GILBERT, 1977). Como os fragmentos estão marcados, torna-se possível deduzir a sequência completa com base na interpretação do resultado imagético da autorradiografia.

É importante notar que todo este processo pioneiro está sendo mediado por reagentes químicos clivantes, como os derivados de hidrazina e sulfato de dimetila, dispensando a participação de reações de natureza enzimática.

Ainda na década de 70, o bioquímico britânico Frederick Sanger e sua equipe, propõem uma metodologia alternativa para o sequenciamento de DNA. Diferentemente do modelo anterior, o sequenciamento de Sanger é pautado por uma ação enzimática, centrada na ação da DNA polimerase, se apropriando das características da reação de PCR. Esta metodologia compreende a participação de componentes oriundos da PCR convencional, tais como os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), os oligonucleotídeos iniciadores e a *Taq* polimerase. A este somatório de elementos são acrescidos os didesoxirribonucleotídeos de terminação (ddNTPs), que correspondem a bases nitrogenadas com deleções estruturais na sua região 3', o que impede a formação de ligações fosfodiéster com o resíduo subsequente e conseqüentemente interrompem o processo de extensão da fita.

Como este modelo é uma derivação da reação de PCR, temos que no decorrer da mesma os ddNTPs são inseridos de modo randômico na fita amplificada, e como eles possuem a alteração na região 3', a extensão da fita fica paralisada a partir desse ponto. Estes ddNTPs são acoplados a sondas com sinal de fluorescência (cada base com uma tonalidade distinta), o que permite diferenciá-los com base na emissão de um feixe luminoso automatizado, e com base nesse perfil de reconhecimento a sequência original da fita é inferida pelos algoritmos de leitura.

Imagine que estes ddNTPs estão sendo incorporados de maneira aleatória, assim os fragmentos gerados irão variar entre si em tamanhos equivalentes a um único nucleotídeo. Ao final da reação haverá um gradiente que irá englobar desde o fragmento mais curto, contendo um único resíduo, até o fragmento de maior

comprimento que possua a sequência completa do material amplificado. Quando estes fragmentos forem ordenados pelo sistema de leitura do eletrograma, será possível remontar a sequência completa, conforme demonstrado na simplificação proposta abaixo:

A
AT
ATG
ATGC
ATGCC
ATGCCA
ATGCCAG
ATGCCAGT
ATGCCAGTC
ATGCCAGTCA
...
ATGCCAGTCATGGCTATTACGA
ATGCCAGTCATGGCTATTACGAT

Estes dois modelos apesar de surgirem de modo bastante paralelo, não se difundiram de igual maneira. Em função do modelo de clivagem química de Maxam e Gilbert necessitar do uso de rotulagem radioativa e depender da manipulação de substâncias químicas com alto potencial de toxicidade, o seu uso nunca se popularizou. Deste modo, os maquinários de sequenciamento atualmente presentes nos laboratórios do mundo inteiro seguem predominantemente o modelo enzimático de Sanger, cujos princípios foram detalhados acima.

Derivações das técnicas de sequenciamento e plataformas de nova geração

O método de sequenciamento enzimático abriu caminho para a proposição de novas metodologias de sequenciamento, que passam a ser chamadas genericamente de sequenciamento de nova geração. Alguns destes novos recursos de identificação de cadeias longas de DNA, são:

- Pirosequenciamento: é uma metodologia proposta nos anos 90 por Mostafa Ronaghi, no qual a atividade de síntese de DNA envolve além dos componentes tradicionais, a participação de substratos como adenosina 5' fosfossulfato e luciferina e moléculas enzimáticas como adenosina trifosfato (ATP) sulforilase, apirase e luciferase (HARRINGTON *et al.*, 2013). Durante a etapa de adição no nucleotídeo ocorre a liberação paralela de um grupamento pirofosfato, cuja consequência é a liberação de uma molécula de ATP, que promove a ação da luciferase, cujo saldo reacional é a emissão de um sinal luminoso detectável pelo equipamento, a partir do qual se consegue determinar com precisão quais resíduos formam a fita de DNA;
- Plataformas de sequenciamento de última geração: as chamadas metodologias de sequenciamento de última geração surgidas nos anos 2000, representam um avanço em relação aos métodos enzimáticos clássicos, pois permitem a síntese paralela em larga escala, no qual milhões de fragmentos podem ser sintetizados em uma única reação, diferentemente do método de Sanger que promove o sequenciamento individual dos fragmentos (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016). Em termos práticos, as plataformas de última geração representam uma maior velocidade na obtenção de dados e a possibilidade de sequenciar genomas inteiros em um intervalo de tempo consideravelmente menor. Vários exemplos de plataformas que aplicam este conceito podem ser citados, dos quais as mais representativas são: plataforma Roche 454, plataforma Illumina/Solexa de sequenciamento em bibliotecas, plataforma Ion Torrent de sequenciamento baseado em chips semicondutores e plataforma ABI SOLiD (MARDIS, 2013);
- *Single-molecule, Real Time DNA sequence* (SMRT): o sequenciamento em tempo real de molécula única é uma metodologia derivada da PCR em tempo real, e promove uma extensão onde a molécula de DNA polimerase é fixada e então os nucleotídeos marcados com fluorescência são agregados em fração de milissegundos (ROBERTS; CARNEIRO; SCHATZ, 2013). Esta técnica ocorre com auxílio de nanotecnologia e promove uma alta capacidade de geração de

dados, permitindo o sequenciamento de um genoma longo em uma única corrida, todavia, possuem o mais alto valor operacional e exigem profissionais com alto nível de preparo para operação e interpretação dos dados gerados.

A partir da popularização do conjunto de técnicas discutidas nesse bloco foi possível a descrição de genes inteiros e até de genomas completos de organismos procariotos e eucariotos, o que representou um aumento exponencial na quantidade de dados disponíveis para análises. Isto se tornou um dínamo fundamental para o surgimento de uma área científica chamada de bioinformática, que será objeto de debate nos próximos blocos deste material.

Conclusão

Neste bloco tratamos de um conjunto de ferramentas que subsidiam a realização das rotinas de pesquisa e de trabalho em biotecnologia. Analisamos os fundamentos genéticos que estão envolvidos nas maquinarias celulares, e a partir deste conhecimento *in vivo*, modulamos estratégias para reproduzi-los eficientemente *in vitro*.

Em função da primazia das moléculas de DNA, aprendemos como obtê-las a partir de variadas amostras biológicas, utilizando para isso as ferramentas de extração de ácidos nucleicos. Uma vez obtidas estas cadeias de forma íntegra, se parte para sua amplificação, de modo a gerar quantidades exponenciais dos fragmentos gênicos de interesse. Para esta finalidade, podem ser utilizadas as reações em cadeia da polimerase (ou simplesmente PCR), acompanhadas das técnicas de eletroforese, na qual as moléculas migram em um gradiente polimérico através de impulsos elétricos, de modo a permitir a sua visualização e atestar a eficiência de amplificação.

Além da modalidade convencional, tratamos da reação em cadeia da polimerase em tempo real, evidenciando o fato da mesma permitir uma quantificação do teor de DNA presente nas amostras, além de dispensar as etapas de visualização em eletroforese, haja visto que os equipamentos dispõem de um sistema de leitura óptica que quantifica a intensidade de sinal fluorescente liberado na reação. Para a produção

destes sistemas de reação, foram apresentadas como possibilidades os modelos de SYBR® Green, TaqMan® e molecular beacons.

Como derivação natural dos processos de amplificação de material genético, existem as ferramentas de sequenciamento de material genético, que permitem determinar a identidade particular de uma molécula de DNA, aumentando consideravelmente o nível de refino em relação aos recursos de PCR. Para isso, foram propostos inicialmente o modelo químico de Maxam e Gilbert e o modelo enzimático de Sanger, sendo que o último acabou logrando uma maior popularidade em virtude da reprodutibilidade de seus protocolos e de uma menor toxicidade de seus reagentes.

De modo a dialogar com as novas fronteiras trilhadas pela biotecnologia, foram apresentadas as metodologias de sequenciamento contemporâneas, tais como o pirosequenciamento, baseado em reações exergônicas pautadas no elemento fósforo, o sequenciamento em tempo real de molécula única e as plataformas de nova geração que permitem um ganho de velocidade na produção e interpretação dos dados genômicos, cujos exemplos elencados foram a plataforma Roche 454, plataforma Illumina/Solexa de sequenciamento em bibliotecas, plataforma Ion Torrent de sequenciamento baseado em chips semicondutores e plataforma ABI SOLiD.

REFERÊNCIAS

ALI, N. et al. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1-13, 2017. Hindawi Limited.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, mar. 2005.

BUSTIN, S. et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, jun. 2005. Bioscientifica.

EMERY, S. L. et al. Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 311-316, fev. 2004. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

GOODWIN, Sara; MCPHERSON, John D.; MCCOMBIE, W. Richard. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333-351, 17 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC.

HARRINGTON, C. T. et al. Fundamentals of Pyrosequencing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 9, p. 1296-1303, 1 set. 2013. Archives of Pathology and Laboratory Medicine.

HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, jan. 2016.

LI, Yongsheng; ZHOU, Xiaoyan; YE, Duyun. Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 4, p. 457-461, set. 2008. Elsevier BV.

MARDIS, Elaine R. Next-Generation Sequencing Platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 287-303, 12 jun. 2013. Annual Reviews.

MAXAM, A M; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560-564, fev. 1977. Proceedings of the National Academy of Sciences.

PAREEK, Chandra Shekhar; SMOCZYNSKI, Rafal; TRETYN, Andrzej. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 413-435, 23 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

ROBERTS, Richard J; CARNEIRO, Mauricio O; SCHATZ, Michael C. The advantages of SMRT sequencing. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

TAJADINI, Mohamadhasan; PANJEHPOUR, Mojtaba; JAVANMARD, Shaghayeghhaghjooy. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 85, 2014. Medknow.

3 BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO

APRESENTAÇÃO

Neste terceiro bloco iremos entender como a biotecnologia tem contribuído com a agricultura, com o aumento mundial da produção de alimentos e com a geração de outros bioprodutos de interesse econômico e terapêutico, a partir do melhoramento genético de plantas e animais.

Pois bem, você sabia que o óleo de soja que você utiliza no preparo dos seus alimentos, ou que o salgadinho de milho que você ingere no seu lanche, podem ser derivados diretos de organismos geneticamente modificados? Assim, o nosso objetivo com este bloco é apresentar as principais formas de transgenia e manipulação genética nestes organismos, destacando as suas potencialidades, além de discutir criticamente os aspectos legais e bioéticos que regulam estas atividades e determinam até onde podemos ir enquanto pesquisadores que somos.

3.1 Melhoramento genético vegetal

O melhoramento de plantas acompanha empiricamente o próprio desenrolar das sociedades humanas, sendo iniciado quando estes grupos se tornam sedentários e instituem as primeiras práticas agropastoris. Inicialmente este processo de melhoramento se dava com base na seleção não-sistematizada das variantes que apresentavam as características agronômicas de maior interesse. À medida que os primeiros conhecimentos a respeito de hereditariedade foram sendo formulados pelos pressupostos mendelianos, o melhoramento passou a se basear em enxertias, cruzamentos controlados e monitoramento dos caracteres apresentados nas gerações-filhas.

Entretanto, este melhoramento convencional ficava restrito às barreiras naturais daquela espécie, logo, nem sempre a característica desejada estava disponível na espécie em questão ou os genes presentes para codificar uma determinada característica de interesse não alcançavam a expressão necessária. Mediante este

contexto, a grande contribuição da chamada biotecnologia vegetal, foi permitir a superação das barreiras naturais das espécies, seja por meio inespecíficos como a indução de mutações ou por meio direcionados como a criação de transgênicos, que são organismos que exibem um ou mais genes facultados artificialmente de outra espécie.

Antes de detalhar as diferentes técnicas de melhoramento, reunimos um conjunto de possíveis aplicações de interesse agrônomo e científico que foram, e são, almejadas pelas múltiplas vertentes da biotecnologia vegetal:

- Eliminação de acúleos, espinhos e compostos de potencial tóxico e/ou alergênico em cultivares agrícolas;
- Obtenção de cultivares com maior número de frutos e com frutos de maior tamanho, com menor quantidade de sementes e mesmo com maior liberação de compostos aromáticos;
- Obtenção de cultivares cujos grãos não debulhem com o florescimento da espiga;
- Obtenção de cultivares com maior tolerância a situações de estresse hídrico e térmico;
- Obtenção de cultivares com maior nível de resistência a situações abióticas adversas, como elevadas concentrações de alumínio no solo;
- Obtenção de variantes com maior resistência a ação de patógenos microbianos e pragas entomológicas;
- Desenvolvimento de plantas ornamentais com maior diversidade de cores em suas flores e inflorescências;
- Desenvolvimento de cultivares com retardamento metabólico em suas vias metabólicas, de modo a gerar gêneros alimentícios com maior vida de prateleira e menor perecibilidade;

- Produção de gêneros alimentícios com maior teor nutritivo e/ou vitamínico;
- Produção de transgênicos a serem utilizadas como produtores de compostos de interesse terapêutico, como enzimas, antibióticos, vacinas comestíveis e outros possíveis biofármacos.

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Essa técnica se baseia diretamente no uso desta bactéria gram-negativa presente no solo, causadora de uma doença vegetal caracterizada pelo crescimento de tumores na junção entre o caule e a raiz das espécies de dicotiledôneas. Essa doença é resultado de um processo natural de transferência gênica, de modo que esta capacidade de transferência será utilizada para induzir a inserção de segmentos gênicos de interesse em plantas a serem melhoradas.

O segmento contendo o gene de interesse é inserido no plasmídeo bacteriano (chamado de plasmídeo Ti), após isso as bactérias contendo o plasmídeo com os genes de interesse são cultivadas e postas em contato com as células vegetais (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003). A bactéria promoverá a infecção da planta, e consequentemente irá incorporar o gene de interesse em meio ao genoma vegetal, gerando calos e brotos transformados. Após o desenvolvimento dos brotos é necessário a realização de etapas de rastreio para verificar por meio de testes de DNA se as plantas de fato estão portando aquele gene exógeno, ou seja, se as mesmas de fato podem ser consideradas transgênicas.

No que diz respeito a esta técnica de transformação mediada por bactéria, duas ressalvas importantes precisam ser feitas. Durante o processo de manipulação do plasmídeo bacteriano, a região responsável por induzir o adoecimento deve ser desarmada, caso contrário, ao invés de promover a transgenia, o processo irá induzir a formação de calos cancerosos na planta. Por fim, é importante lembrar que a *Agrobacterium tumefaciens* só consegue infectar as dicotiledôneas, logo esta técnica de transformação vegetal não é passível de ser aplicada em organismos que pertençam ao extenso grupo das monocotiledôneas (GELVIN, 2003).

Muito embora as abordagens mais consagradas envolvam esta bactéria, abordagens mais recentes exploram estes mecanismos de inserção de DNA exógeno utilizando outros organismos microscópicos, notadamente vírus fitopatogênicos. Alguns dos vírus investigados para esta finalidade são os vírus de DNA fita simples do grupo *Geminivirus* e ainda algumas espécies indutoras de faixas de mosaico e desregulação dos vasos circulatorios, distribuídas no extenso gênero *Caulimovirus*.

Transformação nuclear direta

Estes processos se baseiam na manipulação dos protoplastos, que são as células vegetais desprovidas de parede celular e, portanto, mais permissivas a entrada dos segmentos de DNA exógeno. Para atingir este estado protoplásmico, as células são tratadas com celulase para digestão dos polissacarídeos complexos da parede e com pectinase para remoção de agregados e debris celulares restantes. Após isso, os insertos contendo o DNA de interesse podem ser internalizados nas células através de reagentes químicos que induzam permeabilidade, por eletroporação que se vale de pulsos e ondas elétricas para a criação de poros membranares transitórios e por ação de nanomoléculas vesiculares denominadas lipossomas, que empacotam o DNA de interesse no seu interior e atravessam as estruturas de membrana através de interações hidrofóbicas.

Estas técnicas de transformação direcionadas aos protoplastos promovem uma recombinação não homóloga, nos quais a inserção do DNA de interesse no cromossomo vegetal se dá de modo aleatório, e após a inserção este DNA inserido não terá uma replicação independente, uma vez que irá depender da replicação do cromossomo nativo.

Além das manipulações de cloroplastos discutidas aqui, uma outra forma de promover a inserção direta do DNA de interesse é através dos recursos de biobalística. Como a própria terminologia da palavra indica, o DNA é inserido nas células vegetais através de uma espécie de “tiro”, que introduz as múltiplas cópias dos segmentos gênicos de modo aleatório em diferentes pontos do cariótipo celular. Para que o DNA seja propulsionado em uma câmara balística, ele é aderido em diminutas esferas

microscópicas de ouro ou tungstênio que são arremessadas em alta pressão contra as células, de modo a conseguir produzir resultados mesmo em células de revestimento espesso que não seriam transformadas pelas alternativas discutidas anteriormente.

Transformação de cloroplastos

Por fim, uma outra possibilidade para promover a transgenia de organismos vegetais é agir sobre o genoma circular presentes nos múltiplos cloroplastos. Estas organelas possuem característica poliploide e são abundantes nas células fotossintéticas, assim a inserção de genes em seu genoma pode promover níveis de expressão mais acentuados do que insertos presentes no genoma nuclear, o que pode significar uma vantagem deste método em relação aos anteriores.

Outra vantagem considerável é que o genoma presente no cloroplasto não é encontrado nas células germinativas do pólen, isto acaba criando uma barreira natural a propagação da característica transgênica por cruzamentos, o que em termos de biossegurança significa um menor risco de escape gênico para variantes selvagens não modificadas.

Estes processos de transformação homóloga dos cloroplastos possuem uma certa instabilidade, uma vez que cada célula possui inúmeros cloroplastos e nem todos serão transformados homogeneamente, assim o processo deve envolver genes repórteres ou marcas de seleção. Estas marcas de seleção correspondem a características que serão utilizadas em etapas de triagem, de modo a diferenciar as células transformadas daquelas nas quais não houve a transformação desejada. A principal marca de seleção utilizada são as baseadas no uso de antibióticos, nos quais as variantes transformadas possuem tolerância a presença de antibióticos, de modo que após várias rodadas de seleção e regeneração os brotos transformados são identificados e cultivados de modo preciso em sistemas de regeneração *in vitro* com condições climáticas e hormonais bem definidas, gerando cultivares transgênicas que representem ganhos tecnológicos, agrônômicos e econômicos.

3.2 Melhoramento genético animal

Assim como observado anteriormente nos organismos vegetais, as técnicas de edição e melhoramento genético e de transgenia podem ser aplicadas em organismos animais, explorando outras peculiaridades biológicas, que serão detalhadas e discutidas aqui.

Antes de passarmos a analisar os métodos individualmente, é importante recuperar o conceito de organismo transgênico. De acordo com a definição postulada por Fukamizu (1993), pode ser classificado como um organismo transgênico aquele cujo patrimônio genético foi artificialmente manipulado pela introdução, modificação, substituição ou deleção de um gene, alterando todas as células do organismo, inclusive as germinativas, de tal forma que a modificação genética seja transmitida a sua prole direta.

Estes recursos de intervenção gênica podem adotar estratégias distintas, de modo que em algumas situações se opta por adicionar um gene exógeno ou mesmo a hiperpotencialização da expressão de genes já presentes na constituição cromossômica daquele organismo. Em outras situações é possível promover a substituição e até a inativação completa de um gene já existente no genoma nuclear, gerando modelos transgênicos que serão chamados genericamente de *knockout*.

Este montante de possibilidades pode estar a serviço de variadas aplicabilidades zootécnicas, farmacêuticas e científicas, dentre as quais podem ser citadas:

- Seleção de animais e linhagens com maior taxa de prolificidade e maior velocidade em atingir idade reprodutiva;
- Seleção de animais com maior deposição muscular e maior qualidade da carne, cujo exemplo possível é a identificação de suínos com maior expressão do gene responsável por codificar halotano, importante para rastrear animais com potencial de produzir um perfil de carcaça com maior valor agregado;
- Seleção de animais com maior taxa de produção de leite, lã ou ovos;

- Investigação de modelos para obtenção de xenotransplantes, otimizando características de compatibilidade fisiológica e imunológica;
- Obtenção de modelos de estudo para diversas síndromes e condições, de modo a investigar a etiologia de mecanismos patológicos diversos;
- Investigação de modelos que otimizem a condução de ensaios pré-clínicos e clínicos de verificação de inocuidade e de efetividade de biomoléculas de interesse;
- Proposição de animais biorreatores, que consigam produzir em larga escala substâncias e moléculas de interesse farmacológico, a serem liberadas no leite ou na urina, a partir das quais serão purificadas e isoladas (COLLARES *et al.*, 2007). Alguns exemplos de sucesso para esta abordagem são a produção recombinante de múltiplos fatores de coagulação humano, proteína C, hemoglobina, antitrombina, albumina e alfa 1-antitripsina, transferrina e hormônio do crescimento humano;
- Investigação de vias menos usuais de produção de substâncias heterólogas em animais transgênicos, tais como sangue, sêmen, clara de ovos de aves domésticas e ovas de peixe.

Transferência de DNA mediada por espermatozoides

Esta técnica se vale da característica natural dos espermatozoides, de modo a utilizar os mesmos como vetores da transferência gênica. Para isso utiliza-se um anticorpo monoclonal que se ligue ao DNA exógeno que se quer introduzir, este mesmo anticorpo se fixa ao espermatozoide, de modo a garantir que quando ocorrer a fertilização o DNA exógeno terá sido carreado passivamente para a estrutura nuclear do embrião em formação. Algumas alternativas a este processo de fixação baseado em anticorpos são a utilização de pulsos elétricos em aparelhos de eletroporação ou o empacotamento do DNA em microscópicas vesículas lipossomais que serão incubadas com os espermatozoides, a partir do qual ocorrerá a internalização por endocitose.

Apesar de partir de um pressuposto bastante simples, esta técnica enfrenta problemas relacionados a uma baixa taxa de incorporação de DNA no espermatozoide e a alta taxa de degradação promovida por enzimas do fluido seminal que acabam destruindo a molécula de DNA que se quer introduzir no futuro embrião (GORDON, 1989).

Transferência de DNA mediada por infecção viral

Esta estratégia explora a capacidade biológica inata que os retrovírus têm de invadir células hospedeiras (JÄHNER; JAENISCH, 1985). Para isso, a capacidade de multiplicação do vírus deve ser desarmada através da deleção gênica, criando espaço para inserção dos genes de interesse e removendo os genes que possam significar algum efeito deletério sobre o hospedeiro. Uma vez obtidos os retrovírus modificados, estes são introduzidos nas células embrionárias através de injeção direta no espaço perivitelino, ou mesmo de co-cultivo de células embrionárias em suspensões contendo altas concentrações de partículas virais.

Algumas das vantagens deste método são o fato de dispensarem os onerosos e complexos equipamentos de micromanipulação, além de permitirem o acesso a espécies cujas altas quantidades de embriões são indisponíveis. Por outro lado, o uso destes retrovírus possui uma limitação de tamanho em relação a sequência a ser carregada, além de só poderem ser empregados em células em divisão. Outro ponto que deve ser ponderado com cautela é o fato do material retroviral sofrer uma integração aleatória no genoma da célula hospedeira, o que pode significar resultados indesejados como a ocorrência de mutações incompatíveis com a vida embrionária que culminem na morte fetal.

Transferência de DNA mediada por transposons

Este recurso de transgenia é baseado na capacidade exibida por determinadas sequências de DNA, que conseguem se mover internamente no genoma de uma célula, criando um gradiente de possibilidades de integração genômica aleatória. Assim, a sequência gênica de interesse é acoplada a estes transposons, que serão imbricados em meio ao genoma do eventual embrião transgênico. É importante pontuar que para que se tenha controle sobre esse processo é necessário deletar a sequência

responsável por codificar a enzima transposase, caso contrário, o transposon recombinante pode continuar promovendo novas e imprevisíveis recombinações randômicas.

Microinjeção pronuclear

Esta talvez seja a mais popular dentre as técnicas de melhoramento da biotecnologia animal. Este processo foi inicialmente aplicado em animais de bioterismo, e posteriormente expandido para outras espécies de vertebrados, nas quais se incluem suínos, ovinos, bovinos, aves e mesmo peixes. Este modelo, diferente de alguns dos comentados anteriormente, permite a introdução de sequências longas nas células a serem transformadas, o que se justifica no instrumental técnico envolvido na execução da técnica. A condução da mesma envolve um microcomputador acoplado a um microscópio invertido equipado com micromanipuladores de elevada sensibilidade manual, que correspondem a espécies de microagulhas de sucção e a micropipetas que transpõem a zona pelúcida dos oócitos, depositando o DNA exógeno no interior dos pró-núcleos que precedem a fusão definitiva dos núcleos das células germinativas. Em termos gerais, se opta pelo pró-núcleo oriundo do gameta masculino, que em função de seu maior tamanho possuem uma melhor visibilidade, o que confere uma maior facilidade de manipulação.

Após a injeção, o embrião modificado permanece em um sistema *in vitro* de cultivo celular até que atinja um determinado nível de maturação, onde serão avaliados morfológicamente e só então transferidos para o oviduto de fêmeas receptoras sincronizadas hormonalmente. Após o diagnóstico de implantação as fêmeas receptoras serão acompanhadas durante o processo gestacional, e após o parto os filhotes terão amostras colhidas para que se execute testes que confirmem a eficiência da transgenia em seus alelos cromossômicos.

As linhagens transgênicas obtidas por esse caminho tendem a possuir uma elevada estabilidade nos padrões de hereditariedade dos caracteres adquiridos, entretanto, a técnica é bastante laboriosa, além de só poder ser aplicada em embriões em estados

muito seminais de desenvolvimento, e ainda assim, não haverá a garantia que a incorporação do gene de interesse irá ocorrer precisamente na região desejada.

Transferência nuclear

Assim como na técnica anterior, a transferência nuclear também é dependente das etapas de micromanipulação para introdução do DNA exógeno nas células somáticas a serem transformadas. A medida que as células transgênicas estão tendo seu núcleo celular modificado por micromanipulação, é necessário a obtenção de oócitos maturados em fase de meiose provenientes de fêmeas doadoras. Estes oócitos obtidos sofrerão etapas de enucleação, de modo que o núcleo será descartado e apenas o seu citoplasma será aproveitado nas etapas subsequentes.

Após a obtenção da célula modificada e do oócitos receptores enucleados, são realizadas as etapas de transferência nuclear, na qual o núcleo das células transgênicas é transferido para o envoltório citoplasmático das células previamente enucleadas. A transferência é concretizada através do fusionamento entre ambas as partes, por meio de eletroporação ou de soluções catalisadoras de reações químicas. Caso se alcance êxito, o animal transgênico carregará as características genotípicas contidas no núcleo da célula doadora.

3.3 Aspectos regulatórios e biossegurança

Apesar de uma série de vantagens e incrementos tecnológicos que os recursos de transgenia e edição gênica aplicados ao melhoramento genético representaram, é preciso ponderar as desvantagens e os possíveis ônus que estas técnicas podem significar. O advento das técnicas de engenharia genética reverberou uma série de preocupações relacionadas a questões de escape gênico, e os possíveis impactos ecológicos destes fenômenos sob o patrimônio genético nativo e mesmo relacionados a questões bioéticas e suas implicações jurídicas e estatutárias.

No intuito de coibir o uso irresponsável e desproporcional destas técnicas e definir os limites de aplicação destas abordagens nos organismos animais, vegetais e sobretudo relacionados a manipulação de células tronco e materiais de origem humana é que se

determinou a criação regimental da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). De modo mais preciso caba a CTNBio formular e implementar as diretrizes relacionadas aos organismos geneticamente modificados no Brasil, assim como estabelecer normas e pareceres técnicos que assegurem a biossegurança das populações humanas, dos demais organismos vivos e do ambiente em relação a atividades que envolvam direta ou indiretamente a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados.

Todas estas determinações e resoluções que tangem a política nacional de biossegurança estão fixadas no texto legal da lei nº 11.105 de 24 de março de 2005. No intuito de construir um panorama geral a respeito das normas que regulamentam o uso das técnicas de melhoramento e transgenia apresentadas neste bloco e dos principais marcos tratados por este ditame legal, estão apresentados abaixo os seus principais artigos, parágrafos e incisos.

Art. 1º Esta Lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.

§ 3º Os interessados em realizar atividade prevista nesta Lei deverão requerer autorização à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, que se manifestará no prazo fixado em regulamento.

§ 4º As organizações públicas e privadas, nacionais, estrangeiras ou internacionais, financiadoras ou patrocinadoras de atividades ou de projetos referidos no caput deste artigo devem exigir a apresentação de Certificado de Qualidade em Biossegurança, emitido pela CTNBio, sob pena de se tornarem corresponsáveis pelos eventuais efeitos decorrentes do descumprimento desta Lei ou de sua regulamentação.

Art. 3º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I – organismo: toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas;

II – ácido desoxirribonucleico - DNA, ácido ribonucleico - RNA: material genético que contém informações determinantes dos caracteres hereditários transmissíveis à descendência;

III – moléculas de DNA/RNA recombinante: as moléculas manipuladas fora das células vivas mediante a modificação de segmentos de DNA/RNA natural ou sintético e que possam multiplicar-se em uma célula viva, ou ainda as moléculas de DNA/RNA resultantes dessa multiplicação; consideram-se também os segmentos de DNA/RNA sintéticos equivalentes aos de DNA/RNA natural;

IV – engenharia genética: atividade de produção e manipulação de moléculas de DNA/RNA recombinante;

V – organismo geneticamente modificado - OGM: organismo cujo material genético – DNA/RNA tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética;

VI – derivado de OGM: produto obtido de OGM e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM;

VII – célula germinal humana: célula-mãe responsável pela formação de gametas presentes nas glândulas sexuais femininas e masculinas e suas descendentes diretas em qualquer grau de ploidia;

VIII – clonagem: processo de reprodução assexuada, produzida artificialmente, baseada em um único patrimônio genético, com ou sem utilização de técnicas de engenharia genética;

IX – clonagem para fins reprodutivos: clonagem com a finalidade de obtenção de um indivíduo; X – clonagem terapêutica: clonagem com a finalidade de produção de células-tronco embrionárias para utilização terapêutica;

XI – células-tronco embrionárias: células de embrião que apresentam a capacidade de se transformar em células de qualquer tecido de um organismo.

§ 1º Não se inclui na categoria de OGM o resultante de técnicas que impliquem a introdução direta, num organismo, de material hereditário, desde que não envolvam a utilização de moléculas de DNA/RNA recombinante ou OGM, inclusive fecundação in vitro, conjugação, transdução, transformação, indução poliploide e qualquer outro processo natural.

§ 2º Não se inclui na categoria de derivado de OGM a substância pura, quimicamente definida, obtida por meio de processos biológicos e que não contenha OGM, proteína heteróloga ou DNA recombinante.

Art. 4º Esta Lei não se aplica quando a modificação genética for obtida por meio das seguintes técnicas, desde que não impliquem a utilização de OGM como receptor ou doador:

I – mutagênese;

II – formação e utilização de células somáticas de híbrido animal;

III – fusão celular, inclusive a de protoplasma, de células vegetais, que possa ser produzida mediante métodos tradicionais de cultivo;

IV – autoclonação de organismos não-patogênicos que se processe de maneira natural.

Art. 5º É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

I – sejam embriões inviáveis; ou

II – sejam embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

§ 1º Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

§ 2º Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos à apreciação e aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

§ 3º É vedada a comercialização do material biológico a que se refere este artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15 da Lei no 9.434, de 4 de fevereiro de 1997.

CAPÍTULO III

Da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio

Art. 10º A CTNBio, integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia, é instância colegiada multidisciplinar de caráter consultivo e deliberativo, para prestar apoio técnico e de assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da PNB de OGM e seus derivados, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGM e seus derivados, com base na avaliação de seu risco zoofitossanitário, à saúde humana e ao meio ambiente.

Parágrafo único. A CTNBio deverá acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia, bioética e afins, com o objetivo de aumentar sua capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais e das plantas e do meio ambiente.

Art. 11º A CTNBio, composta de membros titulares e suplentes, designados pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, será constituída por 27 (vinte e sete) cidadãos brasileiros de reconhecida competência técnica, de notória atuação e saber científicos, com grau acadêmico de doutor e com destacada atividade profissional nas áreas de biossegurança, biotecnologia, biologia, saúde humana e animal ou meio ambiente.

Art. 14º Compete à CTNBio:

I – estabelecer normas para as pesquisas com OGM e derivados de OGM;

II – estabelecer normas relativamente às atividades e aos projetos relacionados a OGM e seus derivados;

III – estabelecer, no âmbito de suas competências, critérios de avaliação e monitoramento de risco de OGM e seus derivados;

IV – proceder à análise da avaliação de risco, caso a caso, relativamente a atividades e projetos que envolvam OGM e seus derivados;

V – estabelecer os mecanismos de funcionamento das Comissões Internas de Biossegurança – CIBio, no âmbito de cada instituição que se dedique ao ensino, à pesquisa científica, ao desenvolvimento tecnológico e à produção industrial que envolvam OGM ou seus derivados;

VI – estabelecer requisitos relativos à biossegurança para autorização de funcionamento de laboratório, instituição ou empresa que desenvolverá atividades relacionadas a OGM e seus derivados;

VII – relacionar-se com instituições voltadas para a biossegurança de OGM e seus derivados, em âmbito nacional e internacional;

VIII – autorizar, cadastrar e acompanhar as atividades de pesquisa com OGM ou derivado de OGM, nos termos da legislação em vigor;

IX – autorizar a importação de OGM e seus derivados para atividade de pesquisa;

X – prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao CNBS na formulação da PNB de OGM e seus derivados;

XI – emitir Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB para o desenvolvimento de atividades com OGM e seus derivados em laboratório, instituição ou empresa e enviar cópia do processo aos órgãos de registro e fiscalização referidos no art. 16 desta Lei;

XII – emitir decisão técnica, caso a caso, sobre a biossegurança de OGM e seus derivados no âmbito das atividades de pesquisa e de uso comercial de OGM e seus derivados, inclusive a classificação quanto ao grau de risco e nível de biossegurança exigido, bem como medidas de segurança exigidas e restrições ao uso;

XIII – definir o nível de biossegurança a ser aplicado ao OGM e seus usos, e os respectivos procedimentos e medidas de segurança quanto ao seu uso, conforme as normas estabelecidas na regulamentação desta Lei, bem como quanto aos seus derivados;

XIV – classificar os OGM segundo a classe de risco, observados os critérios estabelecidos no regulamento desta Lei;

XV – acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico-científico na biossegurança de OGM e seus derivados;

XVI – emitir resoluções, de natureza normativa, sobre as matérias de sua competência;

XVII – apoiar tecnicamente os órgãos competentes no processo de prevenção e investigação de acidentes e de enfermidades, verificados no curso dos projetos e das atividades com técnicas de DNA/RNA recombinante;

XVIII – apoiar tecnicamente os órgãos e entidades de registro e fiscalização, referidos no art. 16 desta Lei, no exercício de suas atividades relacionadas a OGM e seus derivados;

XIX – divulgar no Diário Oficial da União, previamente à análise, os extratos dos pleitos e, posteriormente, dos pareceres dos processos que lhe forem submetidos, bem como dar ampla publicidade no Sistema de Informações em Biossegurança – SIB a sua agenda, processos em trâmite, relatórios anuais, atas das reuniões e demais informações sobre suas atividades, excluídas as informações sigilosas, de interesse comercial, apontadas pelo proponente e assim consideradas pela CTNBio;

XX – identificar atividades e produtos decorrentes do uso de OGM e seus derivados potencialmente causadores de degradação do meio ambiente ou que possam causar riscos à saúde humana;

XXI – reavaliar suas decisões técnicas por solicitação de seus membros ou por recurso dos órgãos e entidades de registro e fiscalização, fundamentado em fatos ou conhecimentos científicos novos, que sejam relevantes quanto à biossegurança do OGM ou derivado, na forma desta Lei e seu regulamento;

XXII – propor a realização de pesquisas e estudos científicos no campo da biossegurança de OGM e seus derivados;

XXIII – apresentar proposta de regimento interno ao Ministro da Ciência e Tecnologia.

Conclusão

Neste bloco foram detalhadas as formas pela qual a biotecnologia pode contribuir com o melhoramento genético de animais e plantas, de modo a atingir uma série de aplicações econômicas e terapêuticas de interesses, tais como a obtenção de cultivares com maior nível de resistência a situações abióticas adversas, obtenção de variantes com maior resistência a ação de patógenos microbianos e pragas entomológicas, produção de alimentos com maior teor nutritivo, seleção de rebanhos com maior taxa de produção de leite, lã ou ovos, investigação de modelos para estudos de processos fisiopatológicos e para obtenção de xenotransplantes e produção de transgênicos a serem utilizados como biorreatores para geração de compostos de interesse terapêutico, como enzimas, antibióticos, vacinas comestíveis e outros possíveis biofármacos.

Para atingir estas finalidades nos organismos vegetais, podem ser empregadas algumas técnicas, cujas mais representativas são a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, a transformação nuclear direta e a transformação de cloroplastos.

Já nos organismos animais, os caminhos metodológicos propostos envolvem biotécnicas de reprodução de diferentes níveis de complexidade, dentre as quais a transferência de DNA mediada por espermatozoides, a transferência de DNA mediada por infecção viral, a transferência de DNA mediada por transposons, a microinjeção pronuclear e a transferência nuclear envolvendo células somáticas modificadas.

Contudo, apesar deste largo espectro de possibilidades de edição gênica, o bloco chamou atenção para necessidade de construir marcos regulatórios que determinem as situações e circunstâncias nas quais estes recursos podem ou não ser empregados, o que gera um importante e fértil debate a respeito da beneficência e da não maleficência que o conhecimento científico deve promover. Particular atenção deve ser dada à lei 11.105 de 24 de março de 2005, que além de criar a comissão técnica nacional de biossegurança (CTNBio), oferece todo o substrato legal para discutir o bojo destas questões no território e na realidade brasileira.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Gisele M. de; SARTORETTO, Laudete M.; BRASILEIRO, Ana C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 465-476, out. 2003. FapUNIFESP (SciELO).

BRASIL. Lei nº 11105, de 24 de março de 2005. Brasília, DF, 24 mar. 2005.

COLLARES, T. et al. Animais transgênicos biorreatores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 462-478, 2007.

FUKAMIZU, Akiyoshi. Transgenic animals in endocrinological investigation. **Journal Of Endocrinological Investigation**, v. 16, n. 6, p. 461-473, jun. 1993. Springer Science and Business Media LLC.

GELVIN, Stanton B. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, mar. 2003. American Society for Microbiology.

GORDON, Jon W. Transgenic Animals. **International Review of Cytology**, p. 171-229, 1989. Elsevier.

JÄHNER, Detlev; JAENISCH, Rudolf. Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. **Nature**, v. 315, n. 6020, p. 594-597, jun. 1985. Springer Science and Business Media LLC.

ROBL, J.M. et al. Transgenic animal production and animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 127-133, jan. 2007. Elsevier BV.

ZAMBRYSKI, P. et al. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **The Embo Journal**, v. 2, n. 12, p. 2143-2150, dez. 1983. Wiley.

4 BIOTECNOLOGIA APLICADA ÀS CIÊNCIAS MÉDICAS

Apresentação

Imagine se a cerca de duas décadas atrás alguém comentasse da possibilidade de reconstruir tecidos humanos e até órgãos inteiros em laboratório, provavelmente o fato seria tratado como algo inatingível ou simplesmente como um puro objeto de ficção científica. Todavia, atualmente, devido a interdisciplinaridade e a intersecção da biotecnologia com as ciências médicas, notícias como essa começam a se tornar possíveis.

Neste bloco, trataremos destas novas fronteiras da medicina, na qual o conhecimento biotecnológico torna-se indispensável, de modo que discutiremos juntos os fundamentos e as perspectivas mais contemporâneas no que concerne ao uso de vacinas gênicas contendo DNA e ainda de células tronco na elaboração de novas estratégias terapêuticas para o enfrentamento de doenças desafiadoras. O bloco apresenta ainda um breve panorama a respeito do uso da bioengenharia na elaboração de materiais seguros e biocompatíveis, além de reunir um moderno catálogo com casos de sucesso nesta área.

4.1 Células tronco e terapias celulares

Uma das vertentes mais promissoras desta integração do conhecimento genômico com as ciências médicas é o desenvolvimento das chamadas terapias celulares. Segundo Borojevic e Balduino (2004), estas terapias celulares são procedimentos médicos que usam células vivas para melhorar o funcionamento ou promover a regeneração de tecidos e órgãos acometidos por doenças, processos degenerativos, ou que sofreram lesões traumáticas. Assim, vislumbra-se a possibilidade de introduzir genes cujo efeito de sua expressão tenha como impacto positivo a capacidade de remediar ou prevenir a progressão de uma determinada manifestação patológica.

Classificação das células tronco

A principal forma de classificar estas terapias celulares é de acordo com a linhagem celular que será empregada. Assim, os principais tipos celulares possíveis são:

- Células somáticas nas quais é possível introduzir genes que possuam uma finalidade corretiva em determinados tipos celulares específicos;
- Células germinativas na qual a introdução de genes corretivos ocorre em células de caráter reprodutivo, de modo a promover alterações mais amplas, uma vez que a mutação introduzida será manifestada em todas as células do adulto, inclusive as reprodutivas;
- Células tronco, que correspondem ao principal campo de investigação de uso destas terapias celulares. Isso se justifica na capacidade de autorreplicação esboçada por estas células, apresentando a capacidade de gerar cópias idênticas de si mesmo e ainda de se diferenciarem em tipos celulares componentes dos mais variados tecidos constitutivos do organismo a que correspondem.

Pelo fato da primazia que as células tronco ocupam nestas aplicações de terapias celulares, iremos nos concentrar em apresentar suas características e os recursos necessários para sua manipulação, de modo a alcançar efeitos biotecnológicos satisfatórios. A principal diferença que deve ser apresentada aqui, diz respeito a sua capacidade de diferenciação variável, seguindo este critério prático as mesmas podem ser tipificadas em:

- Células totipotentes: este tipo celular é o que possui a maior amplitude de diferenciação, possuindo a capacidade de originar todos os mais de duzentos tecidos que formam o corpo humano, incluindo os tecidos responsáveis por estruturar a placenta e os demais anexos embrionários durante o processo gestacional. Apesar de apresentarem uma considerável versatilidade, este estágio celular é encontrado somente nas primeiras fases de divisão embrionária, quando o total de células embrionárias ainda não ultrapassa o

montante de 32 células, o que corresponde a aproximadamente quatro dias de vida. Em função disto é que decorrem as principais dificuldades operacionais e bioéticas para manipular as células de caráter totipotente;

- Células pluripotentes: este estágio celular possui como sinonímia a terminologia de células multipotentes. As mesmas podem ser obtidas nas camadas internas dos blastocistos, ou seja, quando o embrião possui de 32 a 64 células, o que ocorre por volta do quinto dia de vida embrionária. Este estágio celular consegue se diferenciar em praticamente todos os tipos celulares, exceto as células placentárias e dos demais anexos embrionários;
- Células oligopotentes: este estágio corresponde a fases mais avançadas do desenvolvimento fetal, em função disto possuem uma menor amplitude de diferenciação, conseguindo se diferenciar em uma quantidade reduzida de tipos celulares. A fim de exemplificar uma região tecidual no qual este tipo celular está presente podemos citar as criptas do epitélio intestinal, ou mesmo células-tronco vasculares que se bifurcam em células musculares e células das túnicas de revestimento endotelial;
- Células unipotentes: este estágio celular corresponde a células mais desenvolvidas e com maior acúmulo de especificidades, de modo que só conseguem dar origem a células de seu próprio tipo celular.

Além da sua capacidade de diferenciação, um outro critério importante para entender estas células tronco é quanto a sua origem de obtenção.

- Células tronco embrionárias: como o próprio nome sugere, são obtidas de embriões humanos e em virtude disto possuem uma maior capacidade de diferenciação, sendo geralmente catalogadas como totipotentes ou pluripotentes. A obtenção destas se dá a partir de embriões inviáveis para implantação ou a partir de processos de clonagem. No intuito de coibir práticas irregulares e estabelecer limites bioéticos o uso destas células está condicionado e definido no artigo quinto da lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, previamente apresentada em nosso material;

- Células tronco adultas: estas células encontradas nos tecidos adultos possuem como função fisiológica inata a substituição de determinadas populações celulares que vão morrendo ao longo da história do paciente, auxiliando no reparo de lesões que eventualmente decaiam sobre seus tecidos e órgãos. Entretanto, em função de sua origem, as mesmas possuem uma capacidade de diferenciação mais estreita, de modo que no máximo conseguem ser pluripotentes, apesar de sua maioria corresponder a células oligopotentes. Em termos causais, esta característica cria uma dificuldade operacional para as terapias celulares, uma vez que grande parte dos tecidos humanos não podem ser eficientemente obtidos a partir do cultivo celular destas células adultas.

Estas células tronco adultas podem ser obtidas a partir do tecido hepático, da polpa dentária, do tecido hematopoiético, do conteúdo medular contido nos ossos longos e planares e mesmo do tecido placentário e do cordão umbilical. Após sua obtenção se aplicam uma série de abordagens que se destinam ao seu cultivo celular para obtenção de uma quantidade exponencial que sustente as etapas de diferenciação ou mesmo a sua criopreservação para utilização em momentos futuros.

Caracterização básica das terapias celulares

Uma vez apresentadas as características e peculiaridades das células troncos passamos a construir uma panorama de compreensão das terapias celulares propriamente ditas. Este uso terapêutico de linhagens celulares pode ocorrer por caminhos distintos. Uma possibilidade é a introdução sistêmica de populações celulares sadias de modo a substituir as populações celulares que apresentem algum nível de comprometimento. Um exemplo bastante comum desta abordagem são os transplantes de células da medula óssea para o tratamento de pacientes leucêmicos que possuem a hematogênese comprometida por eventos neoplásicos.

Outra abordagem possível decorre da expansão *in vitro* das células progenitoras com consequente implantação no sítio da lesão a ser recuperada, como por exemplo o uso de substitutos de pele para recobrir áreas cutâneas extensamente lesionadas, obtidos a partir de queratinócitos e fibroblastos. Essa abordagem demonstra-se bastante

promissora sobretudo no campo do desenvolvimento de compostos dermoepidérmicos para o tratamento de portadores de feridas crônicas e queimados com falta de áreas doadoras.

Além das possibilidades citadas, uma terceira vertente diz respeito ao uso de células progenitoras pluripotentes que consigam gerar estruturas de maior complexidade tecidual, que consigam suprir funções ausentes, como por exemplo a produção de ilhotas pancreáticas em pacientes com severos distúrbios endocrinológicos. Uma alternativa ao uso de células progenitoras pluripotentes pode ser o co-cultivo de células tronco oligopotentes de variadas origens teciduais.

Independentemente do tipo de metodologia empregada, a terapia celular pode ser adicionalmente classificada em autóloga ou alogênica. As terapias autólogas são aquelas nas quais as células a serem diferenciadas são provenientes do próprio paciente, enquanto as terapias envolvendo transplante alogênico usam células provenientes de indivíduos da mesma espécie, mas com constituição genética diferente.

4.2 Bioengenharia e biomateriais nas ciências médicas

Além das células tronco propriamente ditas, as terapias celulares utilizam outros componentes para promoverem a diferenciação, a recolonização e a remodelação do tecido alvo. Alguns dos compostos requeridos são fatores de crescimento, hormônios e demais mediadores que estimulem a atividade proliferativa das células e ainda uma série de biomateriais que podem ser utilizados como substratos materiais para organização tridimensional dos tecidos recuperados, criando interfaces que permitam a interação entre os múltiplos componentes químicos e celulares presentes naquele sistema. Neste espectro do uso dos biomateriais da bioengenharia tecidual é importante pontuar enfaticamente que estes compostos devem obrigatoriamente ser biocompatíveis, biomiméticos e bioativos.

No intuito de apresentar algumas opções de biomateriais que podem ser investigados para a engenharia tecidual e para usos em terapias celulares podemos citar brevemente uma vasta quantidade de variantes lipídicas e sobretudo de polímeros,

dentre os quais o ácido hialurônico, sulfato de condroitina, a dextrana, a quitosana, a protamina, a polietilenimina, a poliamidoamina e outras proteínas cationizadas como albumina, atelocolágeno e gelatina.

Para finalizarmos esta breve seção destinada a oferecer uma breve provocação a respeito do potencial das aplicações da terapia celular e da sua íntima ligação com a engenharia de tecidos, deixamos uma lista de produtos já autorizados e catalogados pela *Alliance for Regenerative Medicine* que se valem diretamente destas novas fronteiras do conhecimento biotecnológico.

- Alofisel®: terapia alogênica de células-tronco para tratar fístulas perianais complexas em pacientes com a doença de Crohn;
- Cartistem®: agente terapêutico celular contendo células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical, indicado para o tratamento de defeitos da cartilagem do joelho, como cartilagem articular traumática, artrite degenerativa e artrite reumatoide;
- Cellgram-AMI®: injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea autóloga para o tratamento de infarto agudo do miocárdio;
- Cupistem®: tratamento autólogo de células-tronco mesenquimais para redução de resposta inflamatória e promoção da regeneração de tecidos articulares;
- CureSkin®: terapia autóloga de fibroblastos para o tratamento de cicatrizes de acne;
- Holoclar®: terapia celular baseada em culturas autólogas de células-tronco limbares para promoção da regeneração do epitélio da córnea, permitindo a recuperação da acuidade visual;
- Kaloderm®: terapia celular alogênica para queimaduras profundas de segundo grau e úlceras diabéticas no pé;
- KeraHeal®: terapia celular baseada em queratinócitos autólogos para o tratamento de queimaduras de segundo grau;

- KeraHeal-Allo®: produto de terapia de queratinócitos do tipo hidrogel para o tratamento de queimaduras de segundo grau;
- LaViv (Azficel-T) ®: terapia celular baseada em fibroblastos autólogos;
- Neuronata-r®: terapia autóloga de células-tronco mesenquimais de medula óssea aprovada para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica;
- Queencell®: terapia baseada em células tronco mesenquimais para o tratamento de distúrbios no tecido conjuntivo;
- Spherox®: produto contendo esferoides de condrócitos autólogos humanos para uso em situações de má formação de cartilagem;
- Stemirac®: terapia de células-tronco mesenquimais aprovada para o tratamento de lesões medulares;
- Temcell®: produto de células mesenquimais, utilizado para o tratamento de lesão aguda por radiação, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença de Crohn, diabetes tipo I e infarto do miocárdio;
- Aurix®: hematogel biodinâmico composto de gel de plasma rico em plaquetas;
- Apligraf®: substituto de pele vivo composto por camadas de fibroblastos humanos e colágeno de origem bovina;
- CardioCel®: substrato cardiovascular que medeia adesão de células tronco envolvidas em processos de regeneração tecidual para o tratamento de anormalidades cardiovasculares;
- Dermagraft®: substituto dérmico formado por células humanas aderidas em malha solúvel;
- Epicel®: produto permanente de substituição de pele cultivado a partir das células dérmicas do próprio paciente. Os queratinócitos autólogos são co-cultivados com células murinas irradiadas para formar autoenxertos epidérmicos a serem utilizados em vítimas de queimaduras profundas;

- Hyalograft 3D®: terapia celular que cultiva fibroblastos de pele autólogos em matrizes tridimensionais derivadas de ácido hialurônico, útil para o tratamento de úlceras diabéticas;
- JACC®: produto combinado de condrócitos autólogos e gel de colágeno, indicado para quadros de comprometimento traumático de cartilagem e osteocondrite patelar;
- Transcyte®: substituto de pele composto por uma malha de nylon semi-admissível e biocompatível para o tratamento da epidermólise bolhosa;
- Vergenix-STR®: matriz de colágeno tipo I empregada em quadros de distúrbios do tecido conjuntivo.

4.3 Vacinas gênicas

Outra importante interface do conhecimento genético irradiado pela biotecnologia nas ciências médicas diz respeito ao desenvolvimento de vacinas gênicas e a construção de novas possibilidades de cunho imunoprofilático.

As estratégias vacinais nada mais são do que formas de imunizar previamente um indivíduo, de modo que ao entrar em contato com um dado agente etiológico a sua memória imunológica elicitte uma resposta humoral rápida e efetiva, em vistas a neutralizar a ação patogênica do organismo infeccioso.

Este princípio foi postulado inicialmente pelo britânico Edward Jenner que a partir de amostras de secreções pustulares da glândula mamária de bovinos produziu as primeiras estratégias imunoprotetivas contra a varíola humana, abrindo caminho para a consolidação da primeira geração de compostos vacinais, que correspondiam a microrganismos vivos com virulência atenuada ou ainda a agentes microbianos mortos e inativados. Exemplos possíveis desta primeira geração de vacinas são as estratégias empregadas para enfrentamento de coqueluche e mesmo de tuberculose. Todavia, esta forma de manufatura biológica despertou ao longo do tempo alguns questionamentos no que diz respeito a sua inocuidade, a sua dificuldade de padronização e quanto a sua efetividade.

Na tentativa de aplacar estas questões e enlargar a efetividade de uso das vacinas, é que se começou a pensar naquilo que foi chamado de vacinas de segunda geração. Estas são na verdade vacinas que substituíram os organismos completos por frações de antígenos purificados e/ou recombinantes, produzidos a partir de abordagens da biotecnologia industrial e da produção de organismos modificados pelas técnicas do DNA recombinante, conforme já explicado nos blocos anteriores. Este salto geracional permitiu a elaboração de vacinas com maior taxa de protetividade adquirida e com menores registros de colateralidades, além de permitirem o desenvolvimento de vacinas polivalentes obtidas a partir do consórcio de epítomos antigênicos distintos.

Todavia, mesmo com todo este avanço observado no campo da vacinologia, muitos desafios persistem, sendo assim as novas fronteiras da biotecnologia e o uso do amplo arsenal de ferramentas da biologia molecular permitiu vislumbrar o desenvolvimento de vacinas gênicas. Neste tipo de vacina ao invés de utilizar um microrganismo completo ou partes dele, se opta pela utilização de fragmentos gênicos ou mesmo de genes completos que codificam antígenos potencialmente imunogênicos. Para isto, estes segmentos são carregados por DNA plasmidial, que são moléculas de DNA extracromossômico dispostas no ambiente celular de bactérias.

Estes plasmídeos têm como função direta realizar uma espécie de transporte do DNA de interesse para o interior das células do indivíduo a ser imunizado. Para isso estes plasmídeos devem atender a algumas condições, dentre elas possuir origem de replicação em bactérias, o que permite a sua eficiente duplicação, de modo a obter centenas de cópias por célula, além de necessitarem de genes de seleção que permitam identificar precisamente os clones em que a inserção se deu de modo adequado. É necessário ainda um sítio múltiplo de clonagem a ser clivado com enzimas de restrição, permitindo a inserção do gene de interesse, e por fim é necessário a presença de promotores que permitam a transcrição do gene de interesse em células eucarióticas (RODRIGUES JÚNIOR *et al.*, 2004).

Após estas etapas de construção do plasmídeo contendo o DNA de interesse, é necessário a administração do plasmídeo no hospedeiro, para que eles consigam se internalizar nas células e fornecer ao organismo a informação genética necessária para

a síntese do antígeno com as características apropriadas para a deflagração da resposta imune.

Vias de administração das vacinas gênicas

Para promover a internalização destes plasmídeos modificados no organismo dos indivíduos que serão vacinados, podem ser explorados diferentes recursos, os quais serão apresentados e detalhados a seguir.

- **Via Intramuscular:** possui como maior característica a praticidade e o baixo custo, entretanto, dependem de elevadas quantidades de plasmídeos para desencadear uma resposta imune, haja visto que esta forma de distribuição cria uma maior dificuldade de penetrar no núcleo das células em função do tamanho e da carga da molécula, além de deixarem o conteúdo plasmidial mais susceptível ao ataque enzimático de nucleases endógenas;
- **Carreadores constituídos por microrganismos vivos:** este sistema de administração explora a habilidade intrínseca que determinados agentes microbianos têm de promover a invasão de células da superfície de mucosas, e ao fazerem isto carregam passivamente o DNA plasmidial para o interior das células de interesse. Para utilizar microrganismos para este fim se faz necessário a sua modificação genética, para assegurar que eles invadam as células e entreguem o DNA de interesse, mas não provoquem nenhum tipo de dano para os tecidos e órgãos do paciente que recebeu a vacina;
- **Carreadores constituídos por sistemas particulados:** este sistema de administração é dependente de partículas microscópicas onde a molécula imunogênica de interesse é incorporada no interior de pequenas partículas, através de técnicas de encapsulamento e adsorção. A grande vantagem alcançada por este sistema de entrega é a facilidade de transporte e a proteção que estas partículas criam para o imunógeno, diminuindo as chances que eles sejam degradados antes do tempo.

Alguns dos sistemas particulados disponíveis para este fim são:

- **Biobalística:** neste modelo o DNA é adsorvido em partículas de ouro, e essas são depositadas em espécies de cartuchos, que aceleram as nanopartículas contra a pele do hospedeiro a ser imunizado. Ao atingir a célula, o DNA se desprende da nanopartícula de ouro, alcança o núcleo celular e promove a síntese do imunógeno que irá conferir proteção;
- **Lipossomos catiônicos:** são microscópicas vesículas aquosas circundadas por bicamadas lipídicas que criam envoltórios que abrigam o conteúdo plasmidial e garantem que estas substâncias se distribuam até os tecidos do hospedeiro através dos mecanismos celulares de endocitose;
- **Microesferas poliméricas biodegradáveis:** este sistema de entrega se utiliza de microesferas poliméricas para envelopar o DNA plasmidial e garantir sua biodisponibilidade, assegurando que o organismo do hospedeiro consiga processá-lo e a partir disto induza uma memória imunológica protetiva.

Farmacocinética e biodistribuição do DNA plasmidial

Após a administração o DNA plasmidial alcança os tecidos, de modo que o tempo de permanência e de expressão do antígeno varia de tecido para tecido. Esse tempo de permanência na qual o DNA insertado permanece no tecido é uma razão direta da eficácia da vacina gênica, afinal se o DNA ficar disponível por um intervalo curto, não haverá tempo suficiente para que o sistema imune por meio dos linfócitos T e B processe as moléculas a serem expressas. Assim um dos principais desafios é garantir um tempo de meia vida razoavelmente elevado.

Outro fator a ser ponderado neste processo de biodistribuição é que um único plasmídeo pode carrear paralelamente genes distintos, o que pode ser uma forma de otimizar o delineamento de estratégias vacinais utilizando estas vacinas gênicas, criando a longo prazo uma alternativa exequível para redução de custos totais de produção e administração.

Apesar de chamar atenção para uma série de vantagens que estas vacinas oferecem, é importante analisar com bastante cautela os eventuais efeitos colaterais indesejados que hipoteticamente esta abordagem pode carregar. A inserção de um segmento de DNA exógeno no genoma humano pode criar mecanismos de integração genômico em sítios indesejáveis, de modo que o resultado desta integração gênica acabe provocando mutações em regiões codificantes importantes ou ainda acabe por apresentar um risco de ativação de oncogenes que possam significar um aumento da probabilidade de aparecimento de eventos neoplásicos.

Além disto, a depender da forma que o processo de biodistribuição ocorra, ao invés de promover a ativação de uma resposta imune duradoura ele pode acabar induzindo um processo de tolerância imunológica, na qual a proteína a ser sintetizada não seja percebida pelos órgãos linfoides do paciente como uma molécula imunogênica, e consequentemente não ative os mecanismos da imunidade celular e humoral. O risco contrário também deve ser ponderado, é preciso que os ensaios clínicos destas vacinas verifiquem a possibilidade de indução de respostas de caráter autoimune ou ainda a produção inespecífica de anticorpos, que ao invés de reconhecerem a partícula imunogênica acabem se ligando indesejavelmente as demais partes do plasmídeo.

Conclusão

Neste bloco foram apresentadas diferentes aplicações biotecnológicas que dialogam diretamente com as ciências médicas, de modo a produzir novas abordagens possíveis para a promoção da saúde e para a consolidação de novos recursos terapêuticos.

Uma das mais promissoras abordagens envolvendo estas ferramentas biotecnológicas são as terapias celulares, entendidas genericamente como procedimentos médicos que usam células vivas para melhorar o funcionamento ou promover a regeneração de tecidos e órgãos acometidos por doenças, processos degenerativos, ou que sofreram lesões traumáticas. Para obter tal efeito se recorre a versatilidade das células tronco, que são células que acumulam a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares. Quanto a sua origem estas células podem ser classificadas como células tronco embrionárias ou adultas, e quanto a sua capacidade de diferenciação elas

podem ser tipificadas em totipotentes, pluripotentes, oligopotentes e unipotentes, sendo que quanto mais recentes os estágios embrionários de onde são obtidas maior será o seu espectro de diferenciação.

A execução propriamente dita destas terapias celulares pode se dar por um caminho autólogo ou alogênico, e seguir diferentes abordagens nas quais se incluem a introdução sistêmica de populações celulares sadias de modo a substituir as populações celulares que apresentem algum nível de comprometimento, a expansão *in vitro* das células progenitoras com consequente implantação no sítio da lesão a ser recuperada e ainda ao uso de células progenitoras pluripotentes que consigam gerar estruturas de maior complexidade tecidual. No intuito de subsidiar o desenvolvimento destas estruturas teciduais de maior complexidade é que são mobilizados a participação de diversos biomateriais que correspondem a produtos biocompatíveis, biomiméticos e bioativos que possam ser utilizados no contexto regenerativo da engenharia tecidual.

Outra contribuição biotecnológica diz respeito às vacinas gênicas. Essas são uma espécie de terceira geração da vacinologia, na qual genes e/ou fragmentos gênicos inseridos em moléculas de DNA plasmidial são postos em contato com o hospedeiro humano através de via intramuscular ou de sistemas de carregamento baseados em microrganismos vivos e sistemas particulados, de modo a induzir a atividade codificante de antígenos potencialmente imunogênicos, que produzam como efeito final a ativação de uma resposta imunológica protetiva duradoura.

REFERÊNCIAS

ALLIANCE FOR MEDICINE REGENERATIVE. **Available Products**. Disponível em: <https://alliancerm.org/available-products/>. Acesso em: 11 jul. 2022.

BOROJEVIC, R.; BALDUINO, A. **Terapias Celulares e Bioengenharia Tecidual**. In: MIR, L. (Org.). Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004. p.295-310.

DOLCIMASCOLO, A. *et al.* Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. **Biomaterial-Supported Tissue Reconstruction or Regeneration**, 22 maio 2019. IntechOpen.

FRANCK, Claudio L. *et al.* A complexidade cicatricial em queimaduras e a possibilidade da terapia com células-tronco derivadas do tecido adiposo: revisão. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 16, n. 2, p. 111-116, 2017.

ISAAC, C. *et al.* Construction of a skin substitute composed of porcine collagen matrix populated with human dermal fibroblasts and keratinocytes: histological evaluation. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 4, p. 593-598, out./dez. 2012.

MIR, Luís. **Genômica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 1114 p.

MITALIPOV, Shoukhrat; WOLF, Don. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. **Engineering Of Stem Cells**, p. 185-199, 2009. Springer Berlin Heidelberg.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 28, 18 nov. 2010. Universidade Federal da Bahia.

RODRIGUES JÚNIOR, J. M. *et al.* É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 378-387, ago. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726-736, set. 2008. Springer Science and Business Media LLC.

ZORZI, G. *et al.* Biomateriais para formulações de base nanotecnológica visando terapia gênica ocular. **Química Nova**, p. 1-1, 19 ago. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

5 BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Apresentação

Neste bloco serão apresentadas as formas pelas quais o conhecimento biotecnológico contribui para o campo industrial. Pretendemos despertar sua curiosidade para entender como as características de crescimento de um microrganismo podem ser importantes para compreender a produção de cerveja, ou mesmo como a respiração anaeróbia vai ser importante para gerar produtos de complexidade industrial que movimentam milhões de reais por ano.

Com este bloco, esperamos unir teoria e prática para despertar seu interesse para as inúmeras oportunidades que a tecnologia da fermentação oferece. Iremos apresentar os elementos fundamentais para compreender as etapas de preparo de matéria prima, operação de biorreatores e esterilização de sistemas industriais, para que em posse desses conhecimentos você possa futuramente se aventurar por este robusto campo de trabalho, que inclui indústrias químicas, farmacêuticas e de produção de bebidas e alimentos.

5.1 Fermentação bioquímica e fermentação biotecnológica

A biotecnologia industrial possui como ponto de partida a compreensão dos processos fermentativos realizados por uma ampla gama de microrganismos de interesse, no intuito de produzir derivados de valor econômico. Portanto, saber classificar estes fenômenos é fundamental para conseguir entender e trabalhar na operacionalização industrial dos fenômenos biotecnológicos. É comum que haja algum nível de confusão na compreensão das diferenças existentes entre o conceito de fermentação estritamente bioquímica e o conceito amplo de fermentação biotecnológica, sendo assim, faremos um breve apanhado a respeito destas terminologias.

A fermentação bioquímica corresponde a um processo metabólico envolvido em determinadas especificidades químicas. Este processo compreende a capacidade que determinadas células, sobretudo as microbianas, possuem de metabolizar um substrato que irá atuar como matéria prima para a obtenção de energia, na forma de

adenosina trifosfato, ou simplesmente ATP. Todavia, é preciso destacar fortemente que este processo químico de fermentação possui como característica marcante o fato de ocorrer em ambientes anaeróbios, ou seja sem a presença de oxigênio. Logo, a fermentação bioquímica dispensa algumas etapas reacionais que estão presentes na respiração celular dependente de oxigênio. Em função desta condição de anaerobiose o saldo energético da fermentação bioquímica é menor, o que significa dizer que a partir do mesmo substrato energético a quantidade de moléculas de ATP produzidas na fermentação é inferior ao que seria produzido por células que se valem do mecanismo clássico de respiração celular baseado no funcionamento das etapas de glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeias de fosforilação oxidativa.

Esta fermentação de conteúdo bioquímico pode ser subtipificada em algumas modalidades, dentre elas a fermentação alcoólica na qual coexistem duas etapas subsequentes, a primeira na qual as moléculas de piruvato são convertidas em acetaldeído, na qual ocorre a liberação de dióxido de carbono, e uma segunda etapa em que o acetaldeído produzido é reduzido a etanol pela ação da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo, ou simplesmente NADH.

Um outro caminho é a fermentação láctica, na qual as moléculas de piruvato são reduzidas a forma de lactato. Por fim, é possível apontar a fermentação acética, situação em que os microrganismos efetuam a fermentação alcoólica, e a partir do etanol produzido ocorre uma reação de oxidação que converte este álcool em ácido acético.

Enquanto as definições de fermentação bioquímica estavam condicionadas ao atendimento de especificidades químicas, temos que o conceito de fermentação biotecnológica alcança uma definição conceitual mais ampla e irrestrita. Pode ser classificada como fermentação biotecnológica qualquer reação realizada por sistemas celulares, na qual eles se tornem agentes de transformação de uma dada matéria prima em vista de gerar produtos que irão ganhar distintas aplicabilidades e finalidades de uso, independente da natureza química da reação enzimática ocorrida.

No intuito de demonstrar a gigante vocação da biotecnologia industrial e o enorme leque de possibilidades de inserção no mercado que estes profissionais possuem, listamos abaixo os principais grupos de bioprodutos que são obtidos a partir da utilização destes processos, cujas etapas serão tratadas de modo detalhado nas próximas seções deste bloco.

- Produção de álcoois: particular destaque é dado para a produção de etanol;
- Produção de ácidos: ácido cítrico, ácido itacônico, ácido glucônico, ácido láctico, ácido acético e oxogluconatos;
- Produção de solventes: reagentes acetono-butanólicos, reagentes obtidos por fermentação de butanol-isopraponol e reagentes obtidos por fermentação de acetona-etanol;
- Produção de vitaminas: cianocobalamina, riboflavina, ácido ascórbico, biotina e ergosterol;
- Produção de antibióticos: particular destaque para o grupo dos antibióticos β -lactâmicos, dos quais é possível citar a penicilina produzida por hifas fúngicas;
- Produção de polissacarídeos: agentes de viscosidade, agentes gelificantes, poliésteres e bioplásticos;
- Produção de aminoácidos: ácido glutâmico, lisina e triptofano;
- Produção de inoculantes agrícolas e bioinseticidas: particular destaque para microrganismos que promovam a fixação de nitrogênio em culturas agrícolas e agentes micorrízicos arbusculares;
- Produção de enzimas de origem animal: pancreatina, pepsina, renina e catalase;
- Produção de enzimas de origem vegetal: papaína, bromelina, ficina e malte;
- Produção de bebidas: vinho, sidra, cerveja, aguardentes, vinagres e leites fermentados;

- Produção de alimentos: queijos, manteigas, produtos cárneos, hortaliças e azeitonas fermentadas, cacau, produtos panificados, missô, natô, molho de soja, chá e silagens utilizadas na nutrição animal;
- Produção de modificações de fécula e aplicações na indústria de celulose e papel;
- Produção de estratégias de tratamento de efluentes sanitários domésticos e industriais.

5.2 Tecnologia industrial da fermentação

Para que todos os produtos anteriormente citados possam ser produzidos em larga escala é necessária a utilização de um conjunto de procedimentos industriais que dizem respeito à tecnologia da fermentação. Em termos gerais estes procedimentos objetivam utilizar agentes biológicos de transformação que através de suas rotas metabólicas convertam matérias primas em bioprodutos, estando para isso em biorreatores com condições definidas e com garantias de esterilidade. No intuito de conferir os conhecimentos necessários para que você domine estas técnicas e possa almejar este campo de trabalho, iremos detalhar abaixo os principais elementos envolvidos nestes processos.

Tratamentos iniciais

Para implementação destes processos de biotecnologia industrial a primeira coisa a ser feita é a definição da natureza da matéria prima e principalmente eleger quais serão os organismos empregados na condução do processo. A partir da junção destes dois elementos é que se realiza o preparo do mosto, que nada mais é do que uma mistura rica em fontes nutricionais que serão utilizadas como fonte energética para um processo fermentativo.

As matérias primas são efetivamente escolhidas através da ponderação de alguns critérios, dentre os quais o teor e a quantidade de açúcar fermentescível presente, a viabilidade econômica relacionada ao preço de produção e ao preço de transformação deste açúcar fermentescível, a facilidade de aquisição e transporte da matéria prima e

o balanço energético envolvido nas etapas de biotransformação. Estas matérias primas ricas em carbono sob a forma de açúcares podem ser divididas em três categorias gerais, as matérias primas ricas em sacarina cujos exemplos possíveis são a cana de açúcar e a beterraba, as matérias primas amiláceas cujos representantes de maior destaque são a mandioca, o milho, o trigo, a cevada e o malte e por fim as matérias primas ricas em celulose como a palha, o bagaço residual da moagem da cana e resíduos de madeira.

Além das fontes de carbono, é necessário a suplementação com fontes de nitrogênio, de modo a assegurar a correta síntese proteica dos microrganismos envolvidos. Estas fontes podem ser inorgânicas a partir da utilização de amônia e sais de amônio ou pode ser oriunda de substratos orgânicos, como peptonas e extrato de leveduras, que possuem um custo elevado, ou mesmo de resíduos de outros processos industriais como o líquido de maceração de milho proveniente da manufatura do amido e a farinha de soja proveniente da fabricação de óleo, o que contribui com a sustentabilidade econômica e ambiental dos processos. É requerida ainda a participação de eventuais micronutrientes e compostos secundários, como vitaminas e hormônios e ainda sais minerais como potássio, fósforo, enxofre, magnésio, zinco, cálcio, ferro, cobalto, cobre, boro e titânio.

Além da definição das características dos meios de cultivo, é salutar a correta escolha dos organismos que irão atuar como agentes de transformação. Neste amplo espectro de possibilidades, podem ser citados diversos organismos quimiorganotróficos como as bactérias, os fungos leveduriformes e os fungos filamentosos. De modo que a escolha do organismo de eleição está diretamente associada à capacidade que aquele organismo tem de produzir o composto desejado, além da adequação do mesmo às condições de pH, temperatura, aeração, saturação, índice Brix e osmolaridade do meio.

Processos fermentativos

Após a realização de todas as etapas iniciais referentes ao preparo dos microrganismos e das matérias primas, inicia-se o processo fermentativo propriamente dito, no qual o

mosto fermentado é acondicionado em biorreatores para que haja a conversão da matéria prima em produto de interesse. Estes biorreatores são espécies de tanques ou dornas que acondicionam o material a ser fermentado e permitem o controle de uma série de variáveis envolvidas no processo fermentativo, como o volume de entrada e saída de material, a temperatura interna, a necessidade de refrigeração, a aeração, a quantidade de oxigênio dissolvido, a taxa de agitação, a dispersão de material espumoso, o pH, a densidade, dentre outras.

O tamanho destes biorreatores é variável, e depende diretamente da necessidade requerida. Existem pequenos reatores cujo volume total está em torno de 1 a 2 m³ de capacidade, sendo empregados para o cultivo de microrganismos patogênicos, para a produção de enzimas de diagnóstico ou reagentes para biologia molecular. Existem biorreatores com uma capacidade intermediária, que variam de algumas dezenas de metros cúbicos até a ordem de 200 m³, que em geral são utilizados na produção de enzimas, antibióticos, vitaminas e aminoácidos. Finalmente, alcançando os maiores volumes existem os fermentadores que são utilizados para processos que exigem um menor controle de variáveis, carecendo de pouca ou nenhuma assepsia. Esta categoria de reatores pode atingir volumes de até milhares de metros cúbicos de capacidade, e são observados em processos como a fermentação alcoólica e o tratamento biológico de dejetos em estações de tratamento de efluentes.

Neste sentido, observe que o tamanho do equipamento é inversamente proporcional a capacidade de controle das condições da reação e ao nível de pureza atingido, de modo que em reatores de grande capacidade volumétrica o nível de controle é baixo e, portanto, não podem ser utilizados para a produção de insumos farmacêuticos e médicos, que por exigirem um nível de esterilidade e padronização rígidos devem ser obrigatoriamente produzidos em biorreatores de pequeno porte.

Uma vez definido o biorreator que será utilizado e iniciado o processo de fermentação, acontecerão três fases reacionais bem definidas. A primeira delas é a fase preliminar, caracterizada por um aumento discreto da temperatura e pela multiplicação inicial dos microrganismos, que precisam se adaptar ao meio para só então atingirem sua fase de crescimento logarítmico. A segunda fase corresponde a fermentação principal,

também denominada de fermentação tumultuosa, na qual os microrganismos atingem seus picos de crescimento populacional, e como consequência desta intensificação da atividade enzimática de caráter exotérmico se observa uma maior elevação no gradiente térmico, além de uma maior tendência a formação de espumas superficiais indesejáveis que dificultam a aeração homogênea. Esta fase também é marcada pelo maior consumo de matéria prima, pela maior taxa de liberação do bioproduto e de outros metabólitos celulares, que em geral tendem a promover uma acidificação do meio.

Por fim ocorre a fase complementar ou de pós-fermentação, que coincide com a fase estacionária do crescimento microbiano no qual os microrganismos entram em crescimento críptico, em função disso observa-se uma maior estabilidade no interior do reator além de uma tendência de equilíbrio térmico. Esta fase tende a apresentar uma intensificação da acidez do sistema, que decorre do aumento de debris celulares que se acumularam ao longo das fases de crescimento do inóculo.

Categorias de operação da fermentação

O processo fermentativo pode ser conduzido nos biorreatores de formas distintas, e a partir disso classificados em categorias diferentes. A primeira categoria possível diz respeito aos processos descontínuos, também chamados de bateladas. Neste tipo de produção a matéria prima e os microrganismos são misturados e após isso nada é adicionado ao sistema, exceto oxigênio, antiespumantes e controladores de pH.

As vantagens reunidas por este processo são a maior facilidade de operação, o menor risco de contaminação, o menor custo de construção de equipamentos e a possibilidade de adequação do processo para períodos curtos. Por outro lado, estes processos de batelada possuem uma menor produtividade volumétrica além de poderem promover mais facilmente o esgotamento da capacidade nutritiva do meio de cultivo. As bateladas também permitem uma maior acumulação de compostos tóxicos e devido ao maior tempo de permanência no interior do fermentador o produto pode ser degradado mais facilmente.

Estes processos de fermentação descontínua podem ser subtipificados em batelada simples, quando a fermentação inicia apenas após o preenchimento completo do fermentador e em batelada alimentada, quando a adição dos microrganismos ao mosto acontece à medida que a dorna vai sendo abastecida.

A segunda categoria possível diz respeito a processos contínuos, nos quais a entrada de mosto e a saída de produtos acontecem paralelamente, através de reatores interligados entre si por sistemas de cascata. Este dinamismo dos processos contínuos permite uma maior produtividade, reduz o consumo de insumos e otimiza o volume dos equipamentos de modo a dispensar o uso de fermentadores de enormes dimensões. Pelo fato destes processos contínuos ocorrerem de modo aberto é possível utilizar diferentes ferramentas de automação e controle que confirmam uma maior capacidade de controle do que está ocorrendo no interior das dornas.

Em contraposição, estes processos contínuos tornam-se sabidamente mais difíceis de operar, além de se tornarem mais permissivos a ocorrência de contaminações, haja visto que está ocorrendo paralelamente a entrada e saída de líquidos no equipamento. Em virtude da maior saída de produto do interior dos fermentadores pode ser que este processo exija uma maior sofisticação nas etapas de purificação da pós-produção, o que pode ser mais um elemento de aumento de custos. Em função dessas ponderações listadas anteriormente é que estes processos acabam tendo uma maior utilização em sistemas de bancada voltados para o desenvolvimento de novos produtos e processos do que propriamente em grandes plantas industriais.

5.3 Esterilização dos sistemas biotecnológicos de produção industrial

Após a operação dos fermentadores propriamente dita é necessário que os profissionais envolvidos compreendam e dominem os fundamentos de promoção da esterilidade, para que se assegure o padrão de qualidade e reprodutibilidade do processo e se evite a ocorrência de contaminações nos produtos que serão utilizados na produção de alimentos, de enzimas de diagnóstico, de reagentes, de insumos hospitalares e farmacêuticos.

Antes de apresentarmos quais recursos devem ser empregados em que momentos do processo, queremos recuperar dois conceitos que provavelmente você já ouviu falar. O primeiro deles é a desinfecção, que em suma corresponde a processos menos rigorosos de eliminação de agentes microbianos, para isso são costumeiramente requeridos a utilização de agentes químicos da classe dos desinfetantes, geralmente em estado líquido e em temperatura ambiente. Além disso, existem processos de esterilização propriamente ditos, em que se empregam processos físicos e químicos que destroem e inativam todas as formas de vida presentes em um determinado material, incluindo os variados grupos de agente microbianos.

Algumas das possibilidades de esterilização física empregam o calor seco de fornos e muflas e o calor úmido de autoclaves e demais fontes de vapor saturado, além de radiação ultravioleta e radiações ionizantes. Quimicamente esta esterilização pode ser alcançada através do uso de solventes orgânicos como glutaraldeído e formaldeído e em situações mais pontuais através do emprego de óxido de etileno.

Isto posto, apresentamos abaixo que ferramentas utilizar em cada um dos elementos que integram esses sistemas de fermentação envolvidos na biotecnologia industrial.

- Materiais de laboratório: esterilizado por calor úmido (autoclaves), seco (fornos) e mais raramente por radiação ultravioleta;
- Interior dos biorreatores e tubulações: esterilizados pela aplicação de calor úmido (vapor saturado);
- Equipamentos destinados ao pós-processamento e purificação dos produtos obtidos por fermentação (nos quais se incluem bombas, filtros, centrífugas, misturadores, homogeneizadores, separadores, colunas cromatográficas): esterilização por aplicação de calor úmido e/ou pela utilização de reagentes químicos;
- Meios de cultura: esterilização por calor úmido, e em determinadas situações para que não haja o comprometimento nutricional de alguns destes tipos de

meios nutritivos, faz-se necessária a utilização de processos de filtração em conjuntos de membranas de diferentes dimensões;

- Ar: esterilização em sistemas de filtração para remoção de particulados;
- Materiais de armazenamento final e embalagens: esterilizadas fisicamente por calor úmido e radiação gama, e quimicamente através de lavagens com reagentes sanitizantes.

Conclusão

Neste bloco, apresentamos um panorama contendo as infinitas possibilidades de trabalho relacionadas a esta interface das ciências biológicas com o ambiente industrial. Verificamos a existência de variados bioprodutos metabólicos, tais como álcoois, ácidos, solventes, vitaminas, antibióticos, aminoácidos, polissacarídeos de diferentes comprimentos de cadeia, derivados de celulose, bioplásticos, inoculantes agrícolas, bioinseticidas, enzimas de origem animal e vegetal, alimentos, bebidas, dentre tantos outros possíveis.

Foram apresentadas as diferenças terminológicas existentes entre a fermentação estritamente bioquímica e a fermentação biotecnológica em sentido amplo, de modo a detalhar as peculiaridades bioquímicas envolvidas no metabolismo energético dos microrganismos que serão utilizados como agente de transformação.

No entendimento da tecnologia da fermentação foram apresentadas as etapas que correspondem aos tratamentos iniciais, que contemplam a escolha do microrganismo adequado e a definição exata da matéria prima que será mobilizada como substrato reacional. Estas matérias primas podem ser divididas em três categorias gerais, as matérias primas ricas em sacarina, as matérias primas amiláceas e as matérias primas ricas em conteúdo celulósico.

Após a definição das variáveis iniciais, realiza-se propriamente a fermentação nos biorreatores, que podem possuir diferentes tamanhos e capacidades operacionais. Esta fermentação obedece a uma cinética pautada em três fases: a fase preliminar, a fermentação principal e a fase complementar ou de pós-fermentação. Ainda levando

em conta os pormenores apresentados no processo, é possível dividir a condução da fermentação em dois grandes nichos, a fermentação descontínua ou em batelada, marcada por um processo fechado e a fermentação contínua, marcada por um processo no qual a entrada de mosto e a saída de produtos no reator ocorrem simultaneamente.

Por fim, foram apresentados os mecanismos voltados para a garantia da esterilidade dos processos, de modo que para isso podem ser mobilizados tanto recursos de esterilização física quanto recursos de esterilização química, cujo emprego depende das características da superfície ou material a ser sanitizado.

REFERÊNCIAS

AQUARONE, E. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: volume 4 biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 544 p.

BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; AQUARONE, Eugênio. **Biotecnologia Industrial**: volume 1 fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 288 p.

LIMA, U. D. A. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: volume 3 processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 293 p.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Artmed, 2018. 1312 p.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: volume 2 engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 560 p.

6 INTRODUÇÃO A BIOINFORMÁTICA

Apresentação

Nos blocos anteriores, apresentamos uma série de técnicas associadas à biologia molecular e a edição gênica, que são responsáveis por gerar uma quantidade exponencial de dados, que permitem a proposição e a investigação de novas informações ali contidas. Para armazenar, processar e analisar estes dados e criar aplicações derivadas é que surgiu a Bioinformática. Conceitualmente a bioinformática pode ser definida como um conjunto de técnicas correlatas que são advindas da biologia, da matemática, da estatística, e da computação e são aplicadas na verificação de hipóteses relacionadas a biologia molecular em suas múltiplas ômicas.

Portanto ao longo deste bloco, queremos detalhar e te preparar para o uso de algumas ferramentas da biologia computacional, que em larga escala possibilitam a organização e a disponibilização em plataformas multiusuários das informações biológicas obtidas, em vistas de promover o melhor entendimento de aspectos integrados da biologia dos organismos, postulando as inter-relações entre sequência, estrutura tridimensional, padrões de expressão, interações e função das variadas moléculas orgânicas, além de criar canais robustos para inferência de dados evolutivos.

6.1 Banco de dados e ferramentas de busca

Uma das grandes vantagens criadas com a era da bioinformática, foi justamente a possibilidade de elaborar plataformas de armazenamento que reúnem uma quantidade exponencial de dados, gerados e alimentados por iniciativa de pesquisadores em todo o mundo. É justamente sobre estes robustos bancos de dados que trataremos nesta seção.

Imagine que antes do advento destas ferramentas, para que você conseguisse identificar a sequência gênica de um fragmento de interesse ou a composição de aminoácidos de uma determinada proteína, você deveria empreender tempo e

recursos para caracterizar esta molécula na bancada do seu laboratório, estando sujeito a inúmeros percalços no decorrer deste processo. Hoje, com a bioinformática você pode simplesmente buscar pelo nome do seu gene ou proteína de interesse e em questão de segundos você irá reunir as características disponíveis sobre elas nos respectivos bancos de dados consultados.

Assim, pode-se definir de modo amplo que estes bancos de dados são reservatórios online de dados genômicos, proteômicos, transcriptômicos e metabolômicos, que podem ou não passar por uma série de refinamentos adicionais e que subsidiam buscas comparativas com novas sequências produzidas. Estes bancos de dados são submetidos a sistemas de gerenciamento que operacionalizam as etapas de construção e manipulação, assegurando a credibilidade dos mesmos e permitindo que os dados possam ser lidos eficientemente por diferentes algoritmos e softwares.

Antes de apresentar individualmente as plataformas, suas funcionalidades e instruções de uso, é importante ponderar que estes bancos de dados se dividem em duas grandes categorias generalistas, são elas:

- Banco de dados primários: esta categoria é marcada pela deposição de dados brutos oriundos dos equipamentos de sequenciamento, que não passaram por uma série de inferências e previsões adicionais. Os dados que alimentam diretamente esta modalidade podem ser referentes a sequências nucleotídicas de genes, cromossomos ou mesmo de genomas completos, e ainda sequências de resíduos de aminoácidos obtidos por espectrometria e estruturas cristalográficas de pequenas cadeias;
- Banco de dados secundários: esta categoria reúne as plataformas que se apropriam dos dados primários, e a partir deles propõem derivações que podem ser tanto estruturais quanto funcionais. Para deixar este conceito mais compreensível, imagine uma situação hipotética na qual a partir dos dados brutos obtidos pelo sequenciamento de uma proteína seja proposto um modelo tridimensional, que mimetize na tela do computador a forma com que esta proteína se comporta no ambiente celular. Esta situação apresentada

equivale a um exemplo perfeito da lógica de funcionamento de um banco de dados secundários.

Bancos de dados de ácidos nucleicos

Esta modalidade reúne as plataformas mais comumente utilizadas no contexto da bioinformática, através das quais é possível consultar e comparar sequências de RNA e DNA de fragmentos gênicos, de genes completos, de cromossomos e até de genomas inteiros.

Dentre os bancos de ácidos nucleicos disponíveis, o mais utilizado e intuitivo é o que está hospedado na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Este pode ser consultado através do endereço <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> e permite a construção de múltiplos filtros de busca, envolvendo espécies desejadas, tipo de cadeia nucleotídica e mesmo pacote de informações a ser verificado, dos quais o GenBank acaba sendo o recorrido com maior frequência.

No intuito de demonstrar a utilização deste banco de dados, verifique o exemplo a seguir. Se procedeu uma busca demonstrativa no endereço eletrônico apresentado acima a respeito de sequências completas que codifiquem a enzima lactase em humanos, para isso foram utilizados os seguintes termos de busca em inglês “*Lactase Human Gene complete*”, após isto basta consultar a opção de busca no ícone “*Search*”. Feito isto, o algoritmo de busca reuniu os resultados encontrados, conforme demonstrado na Figura 6.1 abaixo.

The screenshot shows the NCBI Gene database search results for the query 'Lactase Human Gene complete'. The search results are displayed in a table with columns for 'Items: 1 to 20 of 27'. The first three items are listed, each with a checkbox, a title, and a description. The first item is 'Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100063642, MGC:190816 lactase (LCT) mRNA, encodes complete protein'. The second item is 'Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100062309, MGC:190456 lactase (LCT) mRNA, encodes complete protein'. The third item is 'Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100069422, MGC:199324 lactase (Lct) mRNA, encodes complete protein'. The search results are also displayed in a table with columns for 'Items: 1 to 20 of 27'. The first three items are listed, each with a checkbox, a title, and a description. The first item is 'Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100063642, MGC:190816 lactase (LCT) mRNA, encodes complete protein'. The second item is 'Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100062309, MGC:190456 lactase (LCT) mRNA, encodes complete protein'. The third item is 'Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100069422, MGC:199324 lactase (Lct) mRNA, encodes complete protein'.

Fonte: NCBI

Figura 6.1 – *Lactase Human Gene complete*

Ao clicar no ícone referente a cada um dos resultados rastreados, é possível obter um conjunto de informações adicionais como o número de acesso da sequência, o artigo científico que descreve este resultado, o número de pares de bases e principalmente a sequência completa em formato de fácil leitura (também chamado de formato FASTA), conforme ilustrado Figura 6.2 abaixo.

The screenshot shows the NCBI FASTA format view for the 'Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100063642, MGC:190816 lactase (LCT) mRNA, encodes complete protein'. The FASTA format is displayed in a text area, showing the sequence in uppercase letters. The sequence is preceded by a header line starting with '>'. The header line contains the accession number 'BC156950.1' and the description 'Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100063642, MGC:190816 lactase (LCT) mRNA, encodes complete protein'. The sequence itself is a long string of uppercase letters, representing the nucleotide sequence. The FASTA format is a standard format for representing nucleotide sequences, where the sequence is preceded by a header line starting with '>'.

Fonte: NCBI

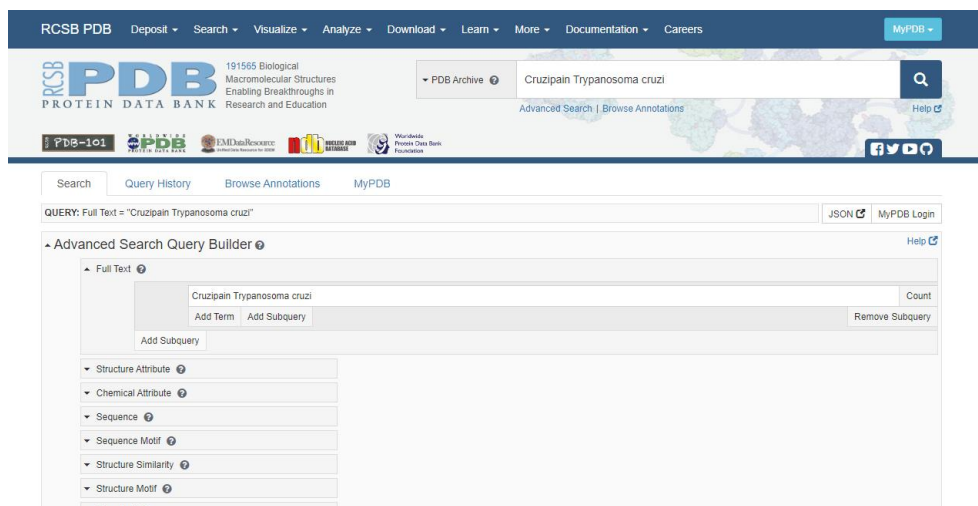
Figura 6.2 – FastA

Bancos de dados de sequências e estruturas proteicas

Este segundo conjunto de bancos reúnem dados e inferências a respeito de peptídeos e proteínas, possuindo desde dados referentes a suas sequências até dados correspondentes a sua forma molecular. Quando se trabalha puramente com as sequências primárias de aminoácidos é importante ponderar que muitas delas são provenientes de traduções das sequências de ácidos nucleicos e o mais importante, apenas com base nas sequências não é possível determinar as modificações pós-traducionais que a proteína sofre no ambiente nativo. Levando em consideração estes fatores, é interessante tentar ao máximo utilizar os bancos de dados estruturais, que oferecem um maior aporte de informações e permitem um maior número de inferências.

Dentre os possíveis bancos de dados de estruturas proteicas, ganha destaque o PDB (*Protein Data Bank*), cujo acesso se dá através do seguinte endereço eletrônico <https://www.rcsb.org/>. Este banco oferece informações e detalhes a respeito da espécie de origem, da sequência de aminoácidos e do experimento utilizado para propor o modelo, além de reunir as coordenadas atômicas e verificar a existência de pontes dissulfeto unidas por resíduos de cisteína e a distribuição de dobramentos secundários como as alfa-hélices e as folhas beta-pregueadas. O banco de dados também oferece hiperlink para que se verifique quais são os autores daquela estrutura e quais trabalhos acadêmicos a embasam.

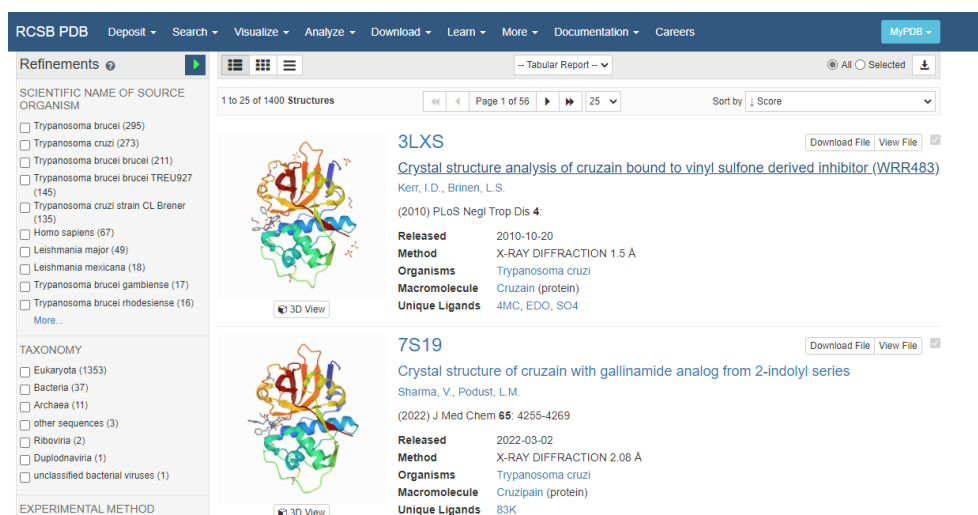
Para demonstrar a utilização deste banco, acompanhe o exemplo a seguir. Imagine que se queira observar a estrutura da cruzipaina, uma proteína enzimática do protozoário *Trypanosoma cruzi*, que possui uma importância na deflagração da patogenia da Doença de Chagas. Para isso foi utilizado como critério de busca os termos “*Cruzipain Trypanosoma cruzi*”, conforme demonstrado nas Figuras 6.3 e 6.4 a seguir.



Fonte: PDB

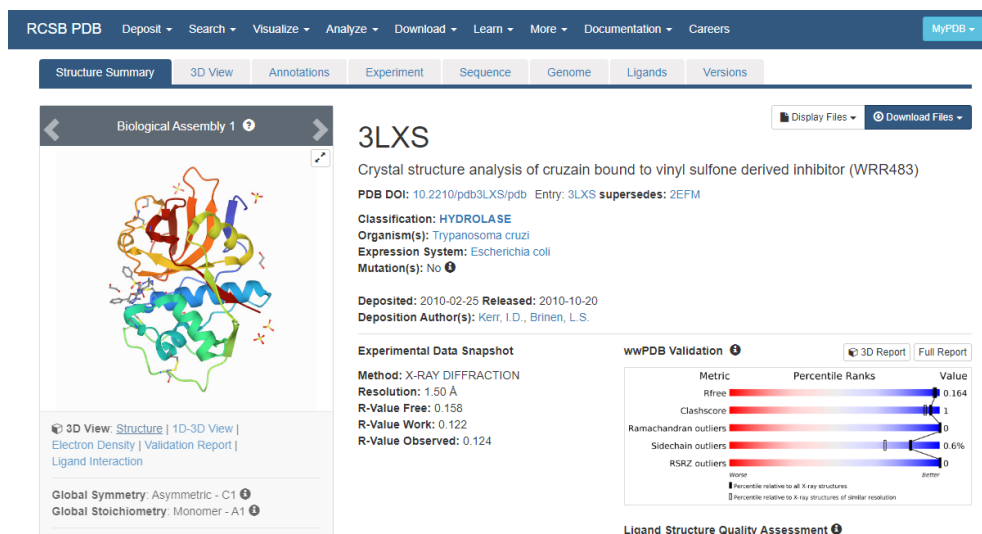
Figura 6.3 – Cruzipain *Trypanosoma cruzi*

Após a realização da busca, foram reunidos uma série de modelos estruturais que representam a proteína, além de suas respectivas características bioquímicas e genéticas, conforme pode ser consultado nas Figuras 6.4 e 6.5 a seguir.



Fonte: PDB

Figura 6.4 – 3LXS e 7S19

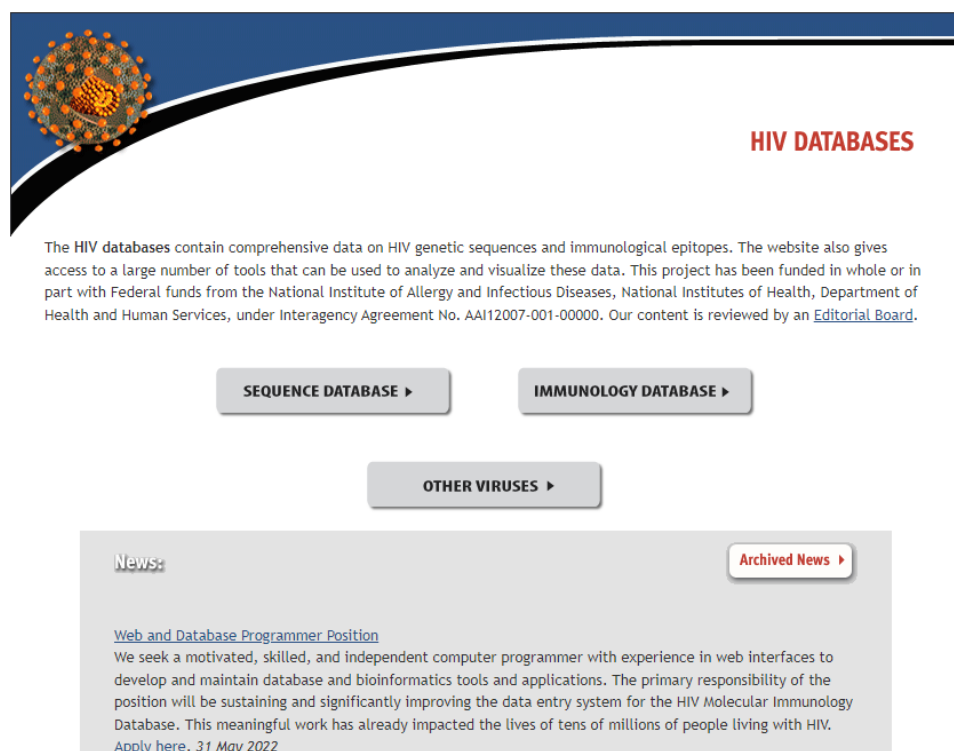


Fonte: PDB

Figura 6.5 – 3LXS

Bancos de dados especializados

Esta subcategoria corresponde a banco de dados de estruturas tais como observado anteriormente, entretanto eles reúnem apenas dados que atendam a uma finalidade em específico. Um exemplo contundente de um banco de dados com esta característica é o *HIV Databases*, hospedado em <http://www.hiv.lanl.gov/content/index> e que reúne informações e estruturas relacionadas a segmentos genéticos e epítomos imunológicos específicos do vírus HIV, conforme ilustrado na Figura 6.6 a seguir.



Fonte: HIV Databases

Figura 6.6 – Informações e Estruturas

Bancos de dados de vias metabólicas

Estes bancos aglutinam em torno de si correlações entre as informações bioquímicas da molécula e as variadas rotas metabólicas e regulatórias que as mesmas participem. Estes bancos oferecem um portfólio com mapas de genomas, mapas de vias e tabelas de ortólogos (que são genes de espécies diferentes, mas que compartilham a mesma funcionalidade entre si).

Um exemplo interessante de banco com esta aplicabilidade é o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que além de investigar as rotas metabólicas citadas anteriormente ainda disponibiliza um sistema para identificação e padronização de enzimas, que segue os padrões numéricos fixados pelo Comitê de Nomenclatura Bioquímica da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular e da União Internacional de Química Pura e Aplicada. Esta plataforma pode ser acessada através do domínio <https://www.genome.jp/kegg/>.

Tomaremos como exemplo a mesma enzima consultada anteriormente, a cruzipaina. Se realizarmos uma busca a respeito desta enzima no KEGG, conseguiremos verificar todo o catálogo de informações a respeito dela, além de obter a sua respectiva nomenclatura química oficial, conforme demonstrado na Figura 6.7 a seguir.

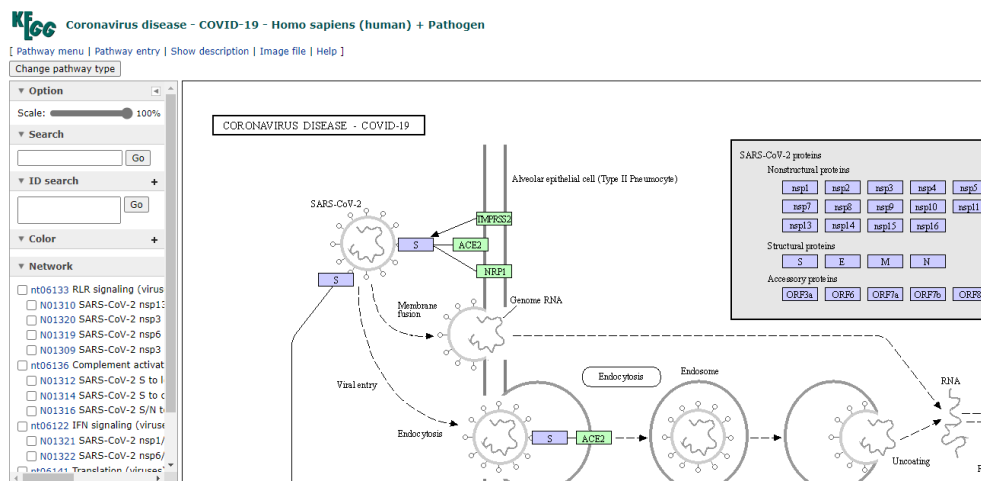
 ENZYME: 3.4.22.51 Help	
Entry	EC 3.4.22.51 Enzyme
Name	cruzipain; congopain; cruzain; evansain; trypanopain
Class	Hydrolases; Acting on peptide bonds (peptidases); Cysteine endopeptidases BRITE hierarchy
Reaction(IUBMB)	Broad endopeptidase specificity similar to that of cathepsin L
Comment	In peptidase family C1. Is located in the digestive vacuoles of the parasitic trypanosome and contributes to the nutrition of the organism by digestion of host proteins.
History	EC 3.4.22.51 created 2003
Orthology	K08571 cruzipain
Genes	TCR: 506529.550 507537.20 507603.260 507603.270 508595.40 509401.30 509429.320 509429.329 510889.261 Taxonomy
Reference	1 [PMID:11472258] Authors Jose Cazzulo J, Stoka V, Turk V Title The major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. Journal Curr Pharm Des 7:1143-56 (2001) DOI:10.2174/1381612013397528
Other DBs	ExplorEnz - The Enzyme Database: 3.4.22.51 IUBMB Enzyme Nomenclature: 3.4.22.51 ExPASy - ENZYME nomenclature database: 3.4.22.51 BRENDA, the Enzyme Database: 3.4.22.51 CAS: 141588-22-9

All links
Gene (10)
KEGG ORTHOLOGY (1)
KEGG GENES (9)
Protein sequence (58)
UniProt (5)
SwISS-PROT (1)
RefSeq(pep) (5)
PDBSTR (47)
DNA sequence (56)
RefSeq(nuc) (10)
GenBank (23)
EBL (23)
3D Structure (20)
PDB (20)
Protein domain (8)
InterPro (8)
All databases (152)
[Download RDF](#)

Fonte: KEGG

Figura 6.7 - Cruzipaina

Para explorar a capacidade de registro bioquímico deste banco, utilizaremos um outro exemplo, desta vez para mostrar os mapas metabólicos disponíveis no campo KEGG PATHWAY presente na plataforma. Dentre as dezenas de mapas disponíveis selecionaremos a opção “*Coronavirus disease - COVID-19*” e em questão de segundos a plataforma irá reconstruir o mapa metabólico que envolve as múltiplas moléculas envolvidas no processo de invasão celular e desencadeamento da infecção, conforme pode ser verificado na Figura 6.8 a seguir.



Fonte: KEGG

Figura 6.8 – Coronavirus disease - COVID-19

Após apresentar estes múltiplos bancos e suas ferramentas gerais, sugerimos que você utilize sua curiosidade para explorá-los ainda mais, utilizando outros exemplos e testando outras combinações de possibilidades, para que assim consiga ir aperfeiçoando seus conhecimentos de bioinformática e correlacionando com os saberes já adquiridos ao longo do seu curso.

6.2 Análise de homologias

Após compreender o funcionamento dos bancos de dados e como manobrá-los para realizar a busca de sequências e estruturas, é importante dominar as ferramentas de comparação de sequências baseadas em homologia. Imagine que na sua atividade de pesquisa você obteve uma determinada sequência e gostaria de confirmar a que organismo, gene ou proteína ela corresponde, para isso você pode comparar a sua sequência com todas as outras já depositadas no banco de dados, e em questão de segundos você obterá um resultado que identifique a sua sequência de interesse.

Para executar este tipo de tarefa a ferramenta mais substancial é o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que se encontra hospedado na plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e pode ser acessado através do seguinte endereço eletrônico <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Este algoritmo executa comparações de sequências em pares através do alinhamento local da sequência de interesse (chamada de *query*), com as sequências previamente existentes (chamadas de *subject*). Antes de avançarmos nos eventos que compreendem a utilização do BLAST, é importante consolidar o conceito de alinhamento local, que em linhas gerais significa buscar o pareamento de um segmento de uma sequência contra algum segmento de outra sequência.

Para proceder tais comparações o algoritmo trabalha regido pelo seguinte ordenamento de passos:

1. Duas sequências em questão são comparadas pelo programa de alinhamento que vai gerar uma pontuação numérica (chamada de *score*, cuja abreviatura é “S”);
2. Cada uma das sequências é repetidamente embaralhada, gerando um conjunto de sequências embaralhadas de cada tipo (mesmo comprimento e composição);
3. As sequências embaralhadas, de cada tipo, são comparadas através dos valores de *score* obtidos por cada uma delas;
4. É realizado o cálculo da média dos *scores* e o seus respectivos valores de desvio padrão. Em função disto são obtidos outros índices numéricos como o valor *P* que indica a probabilidade de ocorrer um alinhamento aleatório com um *score* igual, ou melhor, que o *score* do alinhamento observado e o valor *Expect* (ou simplesmente valor *E*), que avalia a probabilidade de ocorrência de um alinhamento com *score* equivalente, ou melhor, que o *score* do alinhamento observado;
5. Após a ponderação de todos estes valores, o próprio algoritmo apresenta o resultado que corresponde ao melhor alinhamento obtido durante a busca.

No intuito de deixar mais didático esse processo, acompanhe o exemplo de aplicação que será conduzido a seguir. Imagine uma situação hipotética na qual um laboratório

hospitalar ao analisar a amostra biológica proveniente de uma paciente, conseguiu obter a sequência gênica demonstrada a seguir:

```
ACACGGTATCCCATATAAGGCTAACAAGCGTGCTGTACCCGACAGAATTGACTGGCGTGAAT
CCGGTTATGTGACGGAGGTGAAAGATCAGGGAGGCTGTGGTTCTTGTTGGGCTTTCTCAACA
ACAGGTGCTATGGAAGGACAGTATATGAAAAACGAAAAAACTAGTATTTTCATTCTCTGAGC
AACAACTGGTCGATTGTAGCGGTCCTTTTGGCAATTATGGTTGTAATGGTGGAATAATGGAA
AATGCATACGAATATTTGAAACGATTTGGATTGGAACCGAGTCTTCTTATCCTTACAGGGC
TGTGGAAGGACAGTGTGATACAACGAGCAGTTGGGAGTTGCCAAAGTGACTGGCTACTAT
ACGGTACATTCTGGCGATGAGGTAGAATTGCAAAATCTAGTCGGTTGCCGAAGACCTGCTGC
GGTCGCTTTGGATGTGGAGTCAGACTTCATGATGTACAGGAGTGGTATTTATCAGAGCCAAA
CTTGTTACCGGATCGTTTGAACCATGGAGTGTGGCTGTGCGTTATGGAATACAGGATGGT
ACTGACTACTGGATTGTGAAAAACAGTTGGGGAACGTGGTGGGGTGAGGACGGTTACATTC
GAATGGTTAGGAAAAGAGGTAACATGTGTGGAATTGCTTCTCTGGCCAGT
```

Apesar de se obter a sequência gênica presente na amostra daquela paciente, não se sabe exatamente a que gene e a que organismo a sequência em questão corresponde, não sendo possível confirmar a causa do adoecimento. Para tentar resolver esta situação pode-se recorrer ao BLAST, de modo a inserir a sequência encontrada no campo “Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)”, clicar no ícone “BLAST” e verificar por meio do alinhamento local baseado em homologia a que organismo a mesma equivale, conforme pode ser verificado na imagem a seguir:

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite Home Recent Results

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear

ACACGGTATCCCATATAAGGCTAACAAGCGTGCTGTACCCGACAGAATTG
ACTGGCGTGAATCCGGTTATGTGACGGAGGTGAAAGATCAGGGAGGCTG
TGGTTCTTGTTGGGCTTTCTCAACAACAGGTGCTATGGAAGGACAGTATA
TGAAAAACGAAAACTAGTATTTTCATTCTCTGAGCAACACTGGTCGATT

Query subrange

From To

Or, upload file Escolher Arquivo Nenhum arquivo escolhido

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Fonte: NCBI

Figura 6.9 – BLAST

Feito isto, o algoritmo apresentou o resultado esboçado na Figura 6.10 abaixo, na qual fica evidenciado que a sequência gênica em questão apresentou uma total similaridade com o trematódeo *Fasciola hepatica*, que por sua vez é causador da fasciolose, uma infecção zoonótica que pode causar quadros de severo comprometimento hepático em pacientes humanos.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Fasciola hepatica cathepsin L-like protease mRNA, complete cds	Fasciola hepatica	1232	1232	100%	0.0	100.00%	1041	L33772.1
✓	Fasciola hepatica cathepsin L mRNA, complete cds	Fasciola hepatica	1182	1182	100%	0.0	98.65%	1054	AF271385.1
✓	Fasciola hepatica procathepsin L5 mRNA, partial cds	Fasciola hepatica	1164	1164	99%	0.0	98.20%	936	KY392883.1
✓	Fasciola gigantica cathepsin L (cat-L1C) mRNA, complete cds	Fasciola gigantica	989	989	100%	0.0	93.41%	981	AF239265.1
✓	Fasciola hepatica partial mRNA for cathepsin L1 (ORF1)	Fasciola hepatica	900	900	100%	0.0	91.03%	933	AJ279092.1
✓	Fasciola hepatica cathepsin L1 mRNA, partial cds	Fasciola hepatica	891	891	92%	0.0	92.59%	748	DQ533986.1
✓	Fasciola gigantica cathepsin L1 (cl1) mRNA, complete cds	Fasciola gigantica	867	867	100%	0.0	90.12%	981	JQ342985.1
✓	Fasciola hepatica clone Porto 1 cathepsin L protein mRNA, complete cds	Fasciola hepatica	867	867	100%	0.0	90.12%	1078	AY519971.1
✓	Fasciola hepatica cathepsin L-like mRNA, partial cds	Fasciola hepatica	867	867	100%	0.0	90.12%	938	AY029229.1
✓	Fasciola hepatica secreted cathepsin L 1 (CL1) mRNA, complete cds	Fasciola hepatica	856	856	100%	0.0	89.82%	1088	U62288.2
✓	Fasciola hepatica cathepsin L mRNA, partial cds	Fasciola hepatica	856	856	100%	0.0	89.82%	988	AF490984.1
✓	Fasciola hepatica cathepsin L-like proteinase mRNA, complete cds	Fasciola hepatica	856	856	100%	0.0	89.81%	1062	L33771.1
✓	Fasciola gigantica cathepsin L1-YN mRNA, partial cds	Fasciola gigantica	850	850	100%	0.0	89.69%	915	KT713623.1
✓	Fasciola sp. Wuh2-1 CTSL1 mRNA for cathepsin L1, complete cds	Fasciola sp.	850	850	100%	0.0	89.67%	981	LC557123.1
✓	Fasciola hepatica cathepsin L-like proteinase mRNA, complete cds	Fasciola hepatica	850	850	100%	0.0	89.67%	983	HM584609.1
✓	Fasciola gigantica cathepsin L (cat-L4) mRNA, partial cds	Fasciola gigantica	850	850	100%	0.0	89.69%	907	EU158180.1
✓	Fasciola hepatica cathepsin L mRNA, partial cds	Fasciola hepatica	850	850	100%	0.0	89.67%	979	AY277628.1
✓	Fasciola sp. cysteine protease mRNA, complete cds	Fasciola sp.	846	846	100%	0.0	89.67%	1063	S70380.1

Fonte: NCBI

Figura 6.10 – Resultado

Modalidades de ferramentas de BLAST

O recurso de busca baseado em homologia contido no BLAST pode atender a diferentes necessidades e a diferentes características de dados, de modo que é fundamental optar pela modalidade que atende a sua necessidade de análise. As opções existentes contemplam as seguintes situações:

- **blastn**: identificação de sequência de nucleotídeos em um banco de dados de sequências de nucleotídeos;
- **blastp**: identificação de sequência de aminoácidos em um banco de dados de sequências de proteínas;
- **blastx**: identificação de sequência de nucleotídeos traduzida em todas as seis fases de leitura em um banco de dados de sequências de proteínas;

- **tblastn:** identificação de sequência de aminoácidos em um banco de dados de sequências de nucleotídeos dinamicamente traduzido em todas as fases de leitura;
- **tblastx:** identificação das traduções de uma sequência de nucleotídeos em banco de dados contendo sequências nucleotídicas traduzidas em suas fases de leitura.

6.3 Aspectos introdutórios da bioinformática aplicada a filogenia

Outra abordagem da bioinformática bastante importante no contexto das ciências biológicas diz respeito a aplicação destes recursos computacionais para aclarar e revisitar o processo evolutivo que tangencia as relações entre os organismos. Antes de propriamente apresentarmos a racionalidade dos algoritmos de bioinformática, recuperaremos alguns conceitos importantes para lembrarmos as múltiplas inter-relações filogenéticas existentes.

De modo amplo podemos determinar que a filogenia é um campo existente na sistemática que se concentra em identificar e compreender as relações evolutivas estabelecidas temporalmente entre as diferentes formas de vida, de modo a identificar padrões de ancestralidade, inferir tempos de divergência que justifiquem os processos de especiação e assim determinar a história evolutiva de um gene, proteína ou mesmo de uma espécie.

Dentro deste panorama, apresentamos a seguir algumas definições teóricas que terão importante repercussão na elaboração computacional dos modelos de árvores filogenéticas.

- **Homologia:** caracteres que possuem descendência do mesmo ancestral comum;
- **Identidade:** termo aplicado a situações nas quais o alinhamento revela a presença do mesmo resíduo (ácido nucleico ou aminoácido), na mesma posição, em ambas as sequências comparadas;

- Similaridade: medida do nível percentual de similitude existente entre as duas (ou mais) sequências comparadas;
- Agrupamento: união de itens que compartilhem o mesmo padrão de similaridade;
- Genes ortólogos: segmentos gênicos que comungam da mesma função, entretanto ocorrem em espécies distintas;
- Genes parálogos: segmentos derivados do mesmo ancestral, que existem em um mesmo genoma, mas com funções diferentes;
- Grupo monofilético: equivale aos agrupamentos que incluem uma espécie ancestral e todas as suas espécies descendentes;
- Grupos irmãos: grupos monofiléticos distintos, mas que compartilham entre si o mesmo ancestral comum;
- Grupos parafiléticos: agrupamento formado por apenas alguns táxons descendentes de um mesmo ancestral. Em linhas gerais é possível dizer que um grupo parafilético corresponde a um grupo monofilético do qual se retirou uma ou mais espécies descendentes;
- Grupos polifiléticos: agrupamento formado pela reunião de dois ou mais grupos monofiléticos.

Todos estes conceitos recuperados da genética e da evolução, na prática subsidiam a construção computacional das topologias das árvores filogenéticas, que nada mais são do que a representação gráfica da reconstrução do caminho evolutivo percorrido por um gene, proteína ou organismo. Estas representações gráficas são construídas a partir de alguns elementos, dentre os quais os vários pontos chamados de nós e as arestas que interligam estes pontos. Outro detalhe importante a ser observado e analisado é o comprimento das arestas, uma vez que seu tamanho é diretamente proporcional à distância evolutiva que separa dois pontos.

No intuito de facilitar a interpretação destes modelos, observe a reinterpretação didática de uma árvore filogenética polifilética que se encontra apresentada na Figura 6.11 a seguir.

ÁRVORE FILOGENÉTICA

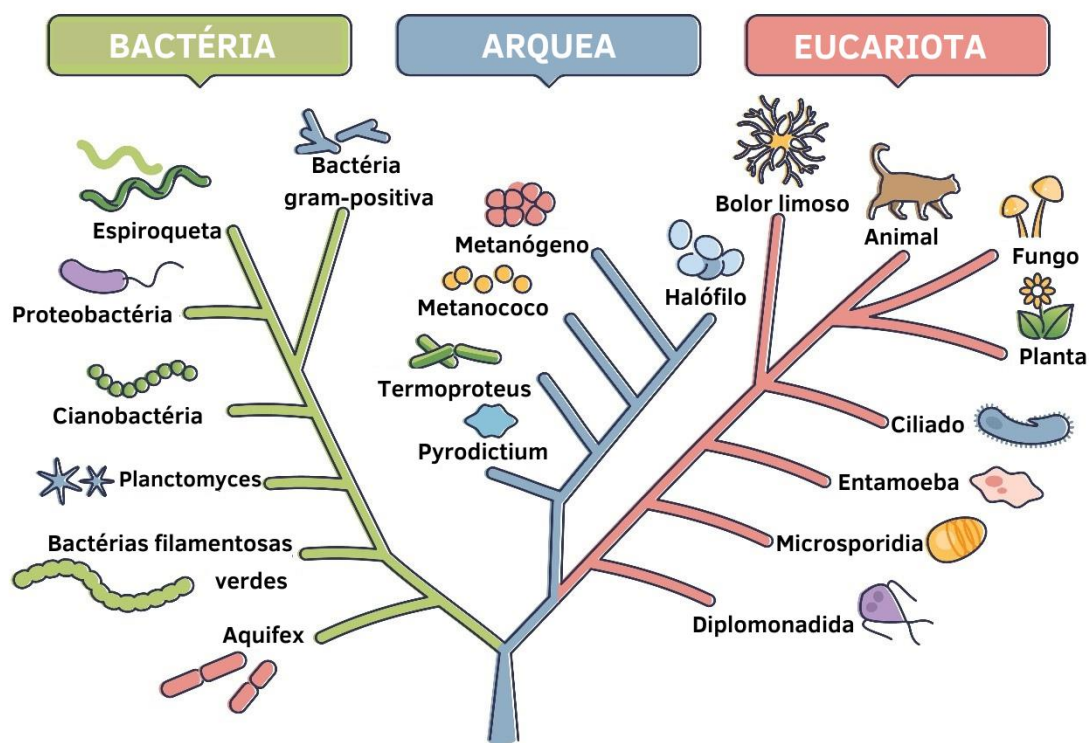


Figura 6.11 – Árvore filogenética polifilética

Se você observar atentamente a Figura 6.11, poderá perceber que cada grupo taxonômico está representado em um nó da árvore (por exemplo, existe um nó correspondente aos ciliados, aos fungos, as plantas e assim sucessivamente). Observe ainda que estes pontos estão entrelaçados pelas várias arestas, e a partir das mesmas é possível observar o caminho evolutivo de cada um dos táxons representados. Conforme explicado anteriormente, as distâncias entre os nós representam o seu nível de proximidade evolutiva, por exemplo, na Figura 6.11 você pode observar que a distância existente entre as células eucarióticas de plantas e fungos é bem menor do que a distância observada entre as plantas e as células procarióticas bacterianas, logo

é possível concluir que as plantas possuem um maior grau de parentesco evolutivo com os fungos do que com as bactérias.

Na prática, estas árvores filogenéticas podem possuir diferentes graus de complexidade e robustez, prova disto é a Figura 6.12 apresentada abaixo que corresponde a uma inferência filogenética proposta por Silva *et al.*, (2019) baseada em sequências do gene de catepsina L-like de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, de modo a demonstrar os níveis de proximidade existentes entre as diferentes espécies que integram o gênero.

Métodos de inferência

A construção das árvores e dendogramas filogenéticos podem se basear em mecanismos distintos, todavia, o mais amplamente aplicado é o método de máxima parcimônia, e por este motivo ele foi o escolhido para iniciar as abordagens deste material.

A premissa fundamental para compreensão deste modelo é de que a história evolutiva se dá de modo parcimonioso, ou seja, é mais provável que se observe uma mudança do que duas. Assim o percurso evolutivo pode ser compreendido através do caminho no qual o menor número de eventos foi necessário para atingir um determinado resultado.

Além da máxima parcimônia, um outro modelo bastante em voga é o método de máxima verossimilhança, que é derivado direto da matemática estatística, e por esta razão é caracterizado como sendo um modelo de natureza probabilística. A aplicação racional desta premissa na biologia evolutiva infere que a evolução pode ser explicada pela árvore que atingir um maior valor numérico de probabilidade, independente do caminho evolutivo ser ou não o mais parcimonioso.

Vantagens reunidas por este método são o fato de apresentarem menor variância do que o modelo de máxima parcimônia, além de permitir que um modelo proposto para um determinado mecanismo evolutivo possa ser extrapolado para uma outra situação, haja visto que os processos evolutivos que ocorrem em um determinado sítio acontecem de forma bastante similar em muitos outros.

Além destes modelos mais comuns, existem outras variações possíveis, tais como a elaboração dos relógios moleculares, métodos de inferência bayesiana, análises de cunho filogeográfico e modelos derivados da teoria da coalescência. Estes produzem respostas a serem utilizadas em contextos mais pontuais e integram abordagens matemáticas de maior complexidade e robustez.

Conclusão

Neste bloco foram detalhadas as formas pelas quais o entrecruzamento da informática e da biologia produziram uma nova fronteira do conhecimento, chamada de bioinformática, cujo produto direto é a geração de um número sem precedentes de possibilidades de análises a serem elaboradas a partir dos dados gerados pelos experimentos de genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica.

Inicialmente a bioinformática requer que esta gama de dados seja depositada e analisada em bancos de dados. A depender de sua natureza, os mesmos podem ser classificados como primários, quando receberem dados brutos que não passaram por uma série de inferências e predições adicionais, ou em dados secundários, quando forem alimentados com dados estruturais e/ou funcionais derivados de interpretações dos dados primários. Adicionalmente, estes bancos podem ser tematicamente agrupados em bancos de dados de ácidos nucleicos, bancos de dados de sequências e estruturas proteicas, bancos de dados especializados e bancos de dados de vias metabólicas e regulatórias.

Uma vez consolidadas as informações nos respectivos bancos e plataformas, é possível realizar atividades de comparação entre múltiplas sequências através de um processo de busca de homologias, das quais a mais importante aplicação é a ferramenta de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que se encontra hospedada na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Os algoritmos de BLAST funcionam sempre a partir do estabelecimento de comparações entre sequências de interesse (chamadas de *query*), contra sequências previamente existentes (chamadas de *subject*).

Algumas vertentes existentes na plataforma BLAST são o blastn (que permite a identificação de sequência de nucleotídeos em um banco de dados de sequências de nucleotídeos), o blastp (que permite a identificação de sequência de aminoácidos em um banco de dados de sequências de proteínas), o blastx (que identifica sequências de nucleotídeos traduzida em todas as fases de leitura em bancos de sequências de proteicas), o tblastn (que identifica sequências de aminoácidos em bancos de

sequências de nucleotídeos traduzidos em todas as fases de leitura) e tblastx (que identifica as traduções de uma sequência de nucleotídeos em bancos contendo sequências nucleotídicas traduzidas em suas fases de leitura).

Por fim, foi explorado a intersecção entre os conhecimentos da bioinformática e da biologia evolutiva, de modo a apresentar modelos que permitam produzir as árvores filogenéticas. Estas árvores são na verdade representações gráficas que delineiam e recuperam o caminho evolutivo percorrido por um gene, proteína ou mesmo por um organismo. Os algoritmos computacionais que realizam estas inferências se distribuem em diferentes formatos, todavia, os métodos de máxima verossimilhança e sobretudo o método de máxima parcimônia são os mais largamente recrutados para tal finalidade.

Alcançamos o fim da disciplina de Biotecnologia com a apresentação deste conteúdo, obviamente não esgotamos todas as possibilidades contidas nesta instigante área científica, contudo, esperamos que os conceitos reunidos ao longo destes blocos tenham conseguido despertar sua curiosidade a respeito das múltiplas e inesgotáveis possibilidades de aplicação biotecnológica, de modo a oferecer subsídios reais para o exercício de sua atividade profissional e para sua ampla inserção no mercado de trabalho.

REFERÊNCIAS

BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool.** Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 11 jul. 2022.

BOROJEVIC, R.; BALDUINO, A. **Terapias Celulares e Bioengenharia Tecidual.** In: MIR, L. (Org.). Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004. p.295-310.

HIV DATABASES. **The HIV Databases.** Disponível em: <https://www.hiv.lanl.gov/content/index>. Acesso em: 11 jul. 2022.

KEGG. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.** Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: 11 jul. 2022.

MATIOLI, Sérgio Russo; FERNANDES, Flora Maria de Campos. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2012. 256 p.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 11 jul. 2022.

PDB, Rcsb. **Protein Data Bank**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 11 jul. 2022.

SILVA, Ryan Emiliano da; SAMPAIO, Bruna Matarucco; TONHOSOLO, Renata; COSTA, Andrea Pereira da; COSTA, Luiz Eduardo da Silva; NIERI-BASTOS, Fernanda Aparecida; SPERANÇA, Márcia Aparecida; MARCILI, Arlei. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **Bmc Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 28 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.