

PARTE II

BIOLOGIA

07

GENÉTICA II BIOLOGIA MOLECULAR

meSalva!

BIOLOGIA MOLECULAR

SOMOS TODOS/AS MOLÉCULAS!

E aí, galera do MeSalva! Prontos para entrar no mundo da Biologia Molecular? Essa área da Bio estuda os organismos do ponto de vista molecular, focando na base de todos os seres vivos: os ácidos nucleicos. Essas moléculas são responsáveis por formar o RNA e o DNA, que dão origem as proteínas, aquele aglomerado de moléculas que mantém os seres vivos vivos, lembram? Vocês já ouviram falar do dogma central da Biologia? Ele explica como ocorre o fluxo de informações genéticas e tudo que envolve esse processo. Podemos resumi-lo da seguinte maneira: um DNA dá origem a um RNA, que dá origem a uma proteína, representado na figura abaixo:

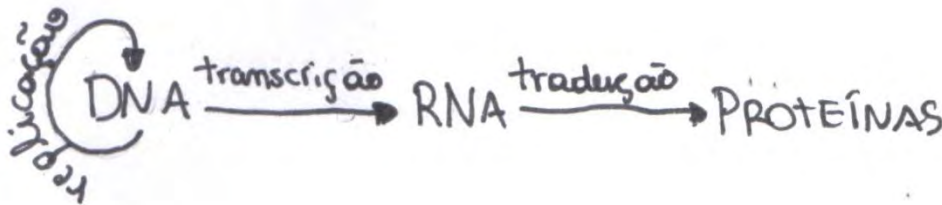


FIGURA 1: DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA.

Atualmente se sabe que um RNA também é capaz de originar um DNA, através da transcrição reversa, o que desconstrói esse dogma.

Na Biologia Molecular também estudamos como utilizar sistemas biológicos e/ou organismos vivos para a produção de produtos de interesse para o ser humano, que faz parte do ramo da Biotecnologia. Essa área reúne técnicas que são muito utilizadas na agricultura de grande escala, nos alimentos e na medicina. A Biotecnologia faz uso da informação genética dos organismos. Através da manipulação de moléculas de DNA é possível gerar clones, organismos transgênicos, mapear genes nos cromossomos, determinar sua sequência de bases nitrogenadas (sequenciamento gênico), realizar o aconselhamento genético, o diagnóstico pré-natal, identificar pessoas (DNA *fingerprint*), produzir hormônios, realizar terapia gênica, entre outras coisas.

Nessa apostila iremos estudar o fluxo de informações genéticas nas células, o DNA, o RNA, as proteínas, as moléculas e os processos envolvidos na Biologia Molecular, abrangendo todas as técnicas utilizadas na Biotecnologia. Prontas/os? Então, vamos lá!

A GENÉTICA E OS GENES: A NATUREZA QUÍMICA DO MATERIAL GENÉTICO

Então, pessoal do MeSalva!, no material genético está armazenada a informação necessária para organizar, produzir e conduzir muitos dos elementos e processos dos seres vivos (incluindo nós, os humanos). Organismos constituídos por estruturas celulares têm seu material genético formado por ácido desoxirribonucleico (DNA). O DNA apresenta-se condensado por proteínas histonas na célula eucariótica em interfase, formando a cromatina.

Obs.! Caso você precise lembrar o que significa interfase, cromatina e histonas, procure as aulas e o material sobre Citologia (núcleo e divisão celular).

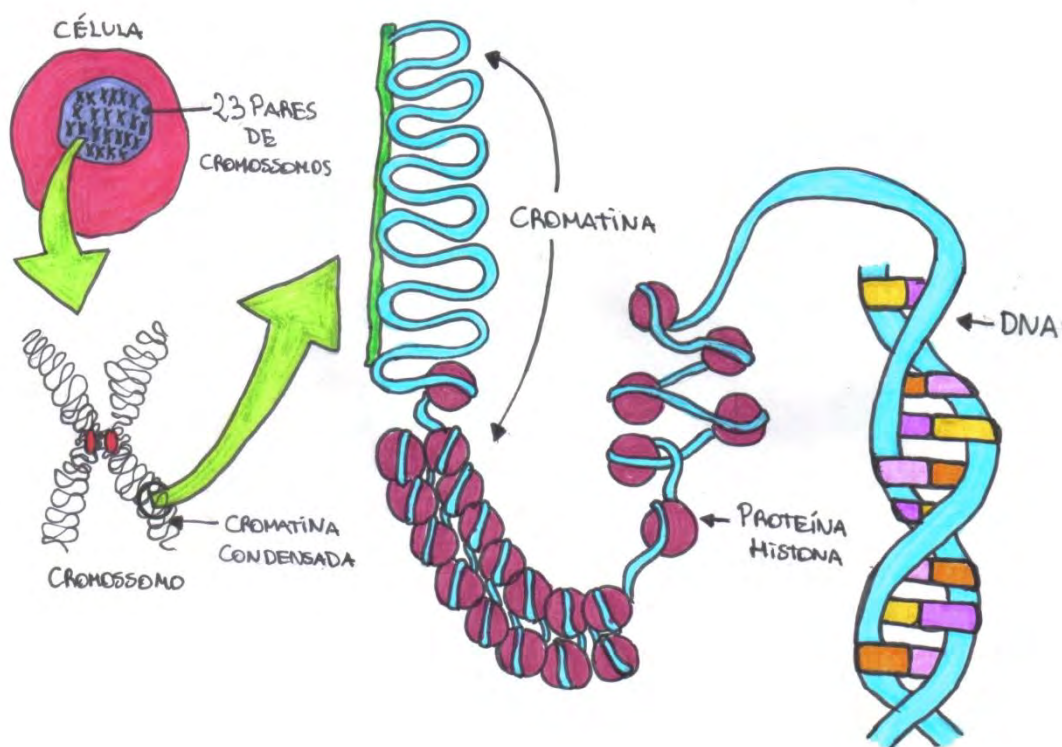


FIGURA 2: FORMAÇÃO DA CROMATINA E POSTERIORMENTE DO CROMOSSOMO, MOSTRANDO O DNA ASSOCIADO A PROTEÍNAS HISTONAS. PERCEBA QUE A CROMATINA É FORMADA POR FITAS DE DNA CONDENSADAS E O CROMOSSOMO É AINDA MAIS CONDENSADO.

O DNA é um ácido nucleico, assim como o RNA. Os ácidos nucleicos são formados por sequências de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por três elementos: um fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada.

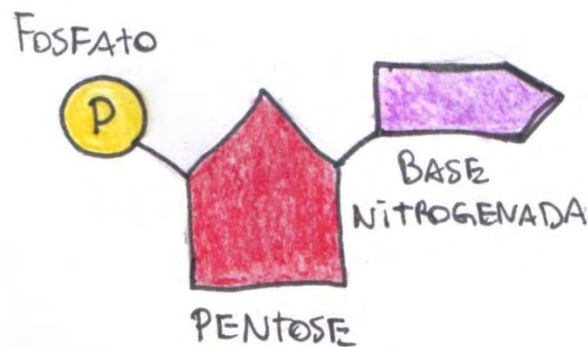


FIGURA 3: NUCLEOTÍDEO.

Existem diferenças entre os nucleotídeos de DNA e RNA. No caso do DNA, a pentose é chamada de desoxirribose, devido à ausência de um oxigênio ligado ao carbono 2' da pentose. No caso do RNA, a pentose é a ribose, que possui o oxigênio.

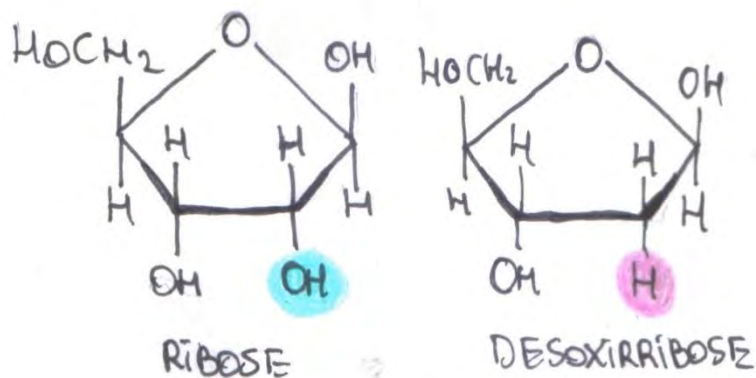


FIGURA 4: DIFERENÇA ENTRE OS AÇÚCARES QUE COMPÕEM O DNA E O RNA. A RIBOSE APRESENTA UM GRUPO CARBOXILA (OH) LIGADO AO CARBONO 2, ENQUANTO A DESOXIRRIBOSE NÃO.

Por causa dessas diferenças, os nucleotídeos de DNA podem ser chamados de desoxirribonucleotídeos e os de RNA de ribonucleotídeos. Outra diferença entre o DNA e o RNA está em suas bases nitrogenadas. Temos adenina no DNA, timina, citosina e guanina. Temos as mesmas no RNA, com uma diferença. Entra a uracila no lugar da timina. Outra diferença importante é que usualmente o DNA é formado por uma dupla fita, enquanto o RNA é normalmente encontrado como uma fita simples.

As sequências de nucleotídeos do DNA podem servir de informação (como veremos adiante) para a formação de proteínas. Essas sequências codificantes podem ser chamadas de genes. Os genes, então, possuem informação que pode ser passada de pais para filhos através da herança genética. Além disso, como codificam para proteínas, os genes influenciam o desenvolvimento das características de um organismo, desde elementos como a cor dos olhos até o comportamento. Perceba que não usamos a palavra "determinam", porque uma característica sempre surgirá de uma interação entre genes e ambiente (lembre-se, o fenótipo é resultado do genótipo interagindo com o ambiente).

Os genes possuem regiões não codificantes em eucariotos, chamadas de íntrons, e regiões codificantes, chamadas de éxons.

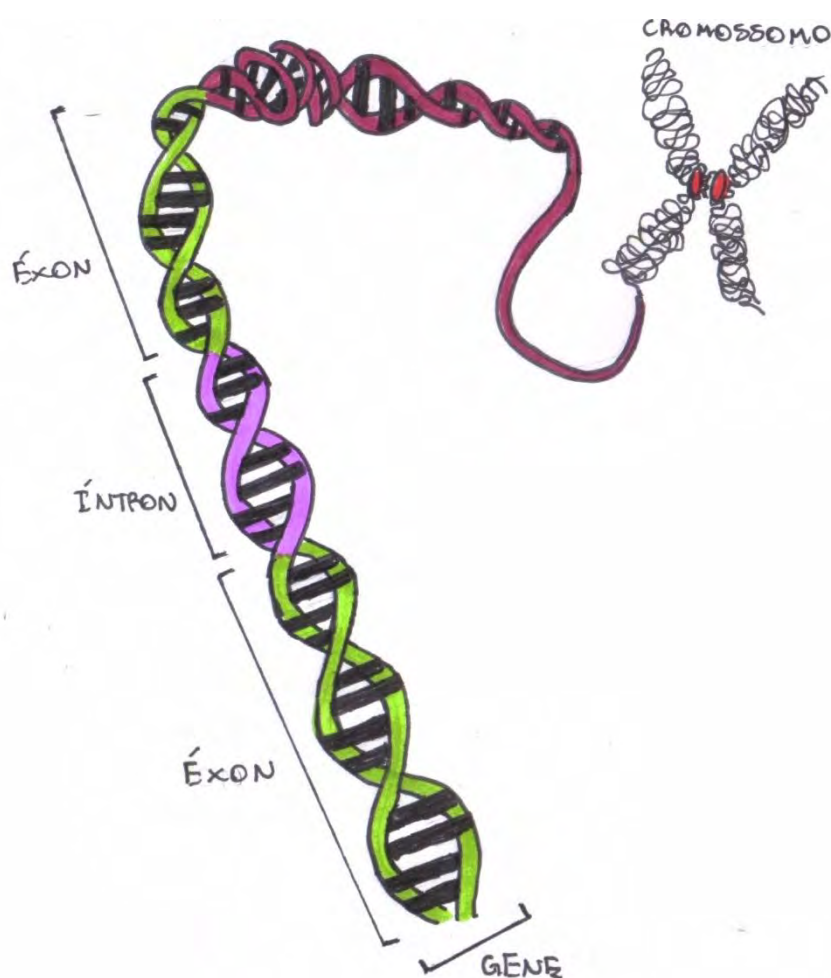


FIGURA 5: GENE FORMADO POR ÉXONS E ÍNTRONS.

Durante o processo de transcrição de um gene, quando ele será utilizado para a produção de uma molécula de RNA, os íntrons precisam ser removidos através de um processo chamado de splicing.

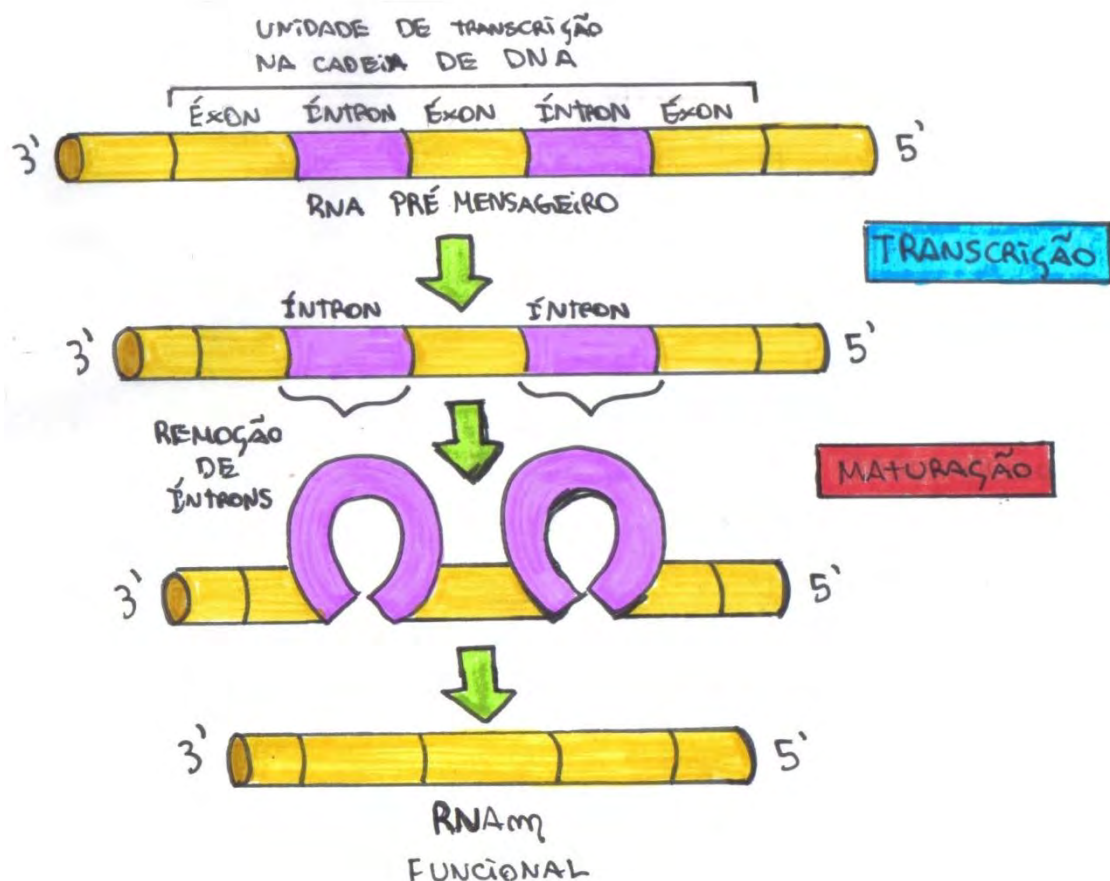


FIGURA 6: PROCESSO DE MATURAÇÃO OU PROCESSAMENTO DO RNA, EM QUE HÁ REMOÇÃO DOS ÍNTRONS.

SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Para manter um organismo vivo, é necessário que ele esteja sempre produzindo proteínas, pois elas são responsáveis por executar as mais diversas funções nesse organismo. Como vimos antes, o DNA armazena a informação genética e são essas informações que darão origem a todas as proteínas em todas as células. Já deu para perceber que não estamos falando de pouca informação, né? E como há muita informação, o DNA fica enroladinho dentro do núcleo, bem compactado, como um novelo de lã que, para ser acessado – isto é, ler o código genético presente nas células – precisa se desenrolar. Ao se desenrolar, podemos

transcrevê-lo em RNA e, em seguida, traduzi-lo em uma proteína. Esse processo se inicia, então, com o desempacotamento desse DNA que irá se replicar para poder ser transcrito

REPLICAÇÃO

As duas fitas da molécula de DNA se separam na replicação, cada uma servindo de molde para a fabricação de uma nova metade complementar, gerando duas moléculas idênticas à original. É por isso que a replicação do DNA é chamada de semiconservativa: a molécula que está sendo formada apresenta uma fita do DNA original e uma fita nova. A duplicação do DNA ocorrerá em um local específico da molécula, a bolha de replicação, delimitada pelas forquilhas de replicação.

Algumas enzimas são necessárias para que o processo possa acontecer, tendo início com a helicase, responsável por separar as fitas duplas do DNA que permanecem separadas e estabilizadas pela proteína SSB (single stranded binding protein). Enquanto isso, a enzima topoisomerase se certifica de que a fita dupla fora da forquilha de replicação não se torça demais devido à tensão de abrir o espiral do DNA.

Cada nucleotídeo que forma o DNA apresenta 5 carbonos nas extremidades da sua pentose, dois desses ligados a uma base nitrogenada e a um fosfato, como podemos ver na imagem abaixo.

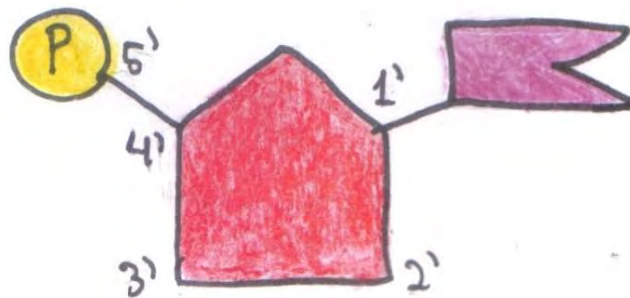


FIGURA 7: NUCLEOTÍDEO COM SEUS CARBONOS NUMERADOS.

Mas qual a importância disso? É que a próxima enzima a entrar em ação é a DNA polimerase, que “anda” pela fita de DNA aderindo os novos nucleotídeos no sentido 5’ para 3’. Só que ela não consegue começar a colocar os nucleotídeos na fita sem um primer, que é um fragmento de RNA formado por uma primase que possibilita o início da formação da nova cadeia de DNA. A replicação das duas fitas ocorre ao mesmo tempo, uma com síntese contínua, pois ocorre com apenas um primer de DNA, sem interrupções, e outra chamada de descontínua, pois sua síntese demanda mais de um primer de RNA, sendo também

sintetizados fragmentos de DNA entre um primer e outro, chamados de fragmentos de okazaki. Para que essa fita se torne contínua, os primers de RNA devem ser removidos e substituídos por sequências de nucleotídeos de DNA que são, então, ligadas aos fragmentos de okazaki pela DNA ligase. Esse processo se repete ao longo da fita dupla de DNA até que toda ela tenha sido duplicada.

Finalizada a replicação, damos início ao próximo passo para formar uma proteína: a transcrição do DNA.

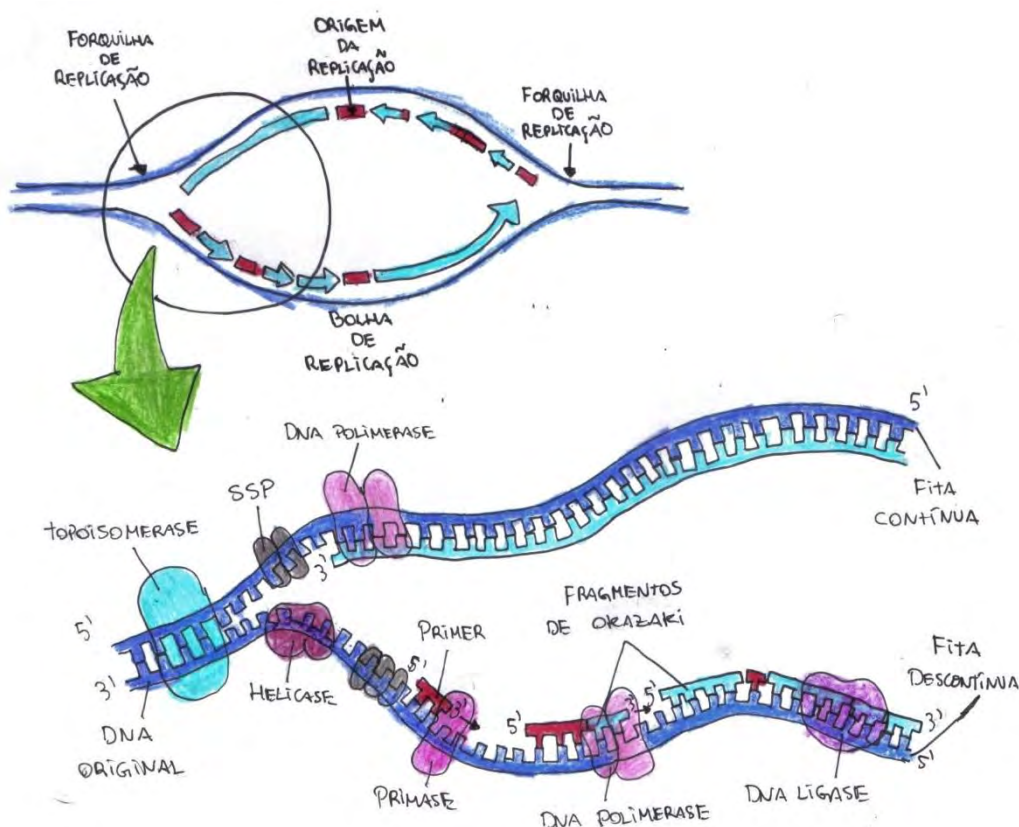


FIGURA 8: REPLICAÇÃO DO DNA E AS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO.

TRANSCRIÇÃO

A transcrição consiste na formação de uma fita de RNA habilitada a deixar o núcleo, em eucariotos (como procariotos não possuem núcleo, a transcrição ocorre no citoplasma). Para que isso seja possível, um complexo enzimático chamado RNA polimerase é recrutado: ele é responsável por desenrolar, abrir e copiar a molécula de DNA no seguimento apropriado (o gene). É válido lembrar que “copiar” significa produzir uma fita de RNA a partir da

incorporação dos nucleotídeos complementares aos que compõem o gene a ser transcrito. A base nitrogenada uracila está presente apenas no RNA.

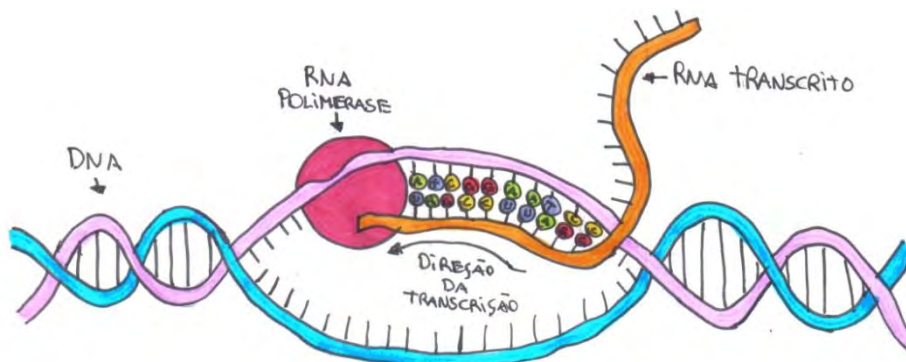


FIGURA 9: TRANSCRIÇÃO DO DNA.

O gene a ser transcrito tem início e final definidos por certas sequências de bases nitrogenadas: a região promotora e a sequência de término da transcrição. Depois de “lido”, o DNA volta a se enrolar e a formar suas pontes de hidrogênio.

O CÓDIGO GENÉTICO

O RNA resultante do processo de transcrição usualmente é um RNA mensageiro (RNAm). Ele possui esse nome porque “leva” a mensagem para a produção de uma proteína. Cada trinca de nucleotídeos do RNAm corresponde a um aminoácido específico a ser incorporado pelo ribossomo ao polipeptídeo que está em formação. Estas trincas são chamadas de códons.

Existem 20 tipos diferentes de aminoácidos e cada RNAm maduro é formado por uma sequência de quatro tipos de bases nitrogenadas (A, U, G, C). A combinação de quatro bases nitrogenadas em grupos de três dá 64 códons, ou seja, um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de uma trinca. Por isso o código genético é dito degenerado ou redundante. Apesar de degenerado, ou seja, de um aminoácido poder ser codificado por mais de um códon, um códon nunca codificará mais de um aminoácido. E o que isso quer dizer? Que o código é degenerado, mas não é ambíguo. AUG determina o aminoácido metionina e é a região promotora. UAA, UAG e UGA são códons finalizadores, que indicam a sequência de término.

		2ª BASE					
		U	C	A	G		
1ª BASE	U	UUU } FENILALANINA (FEN) UUC } UUA } LEUCINA (LEU) UUG }	UCU } SERINA (SER) UCC } UCA } UCG }	UAU } TIROSINA (TIR) UAC } UAA } CÓDON DE FINALIZAÇÃO UAG }	UGU } CISTEÍNA (CIS) UGC } UGA } CÓDON DE FINALIZAÇÃO UGG }	3ª BASE	U C A G
	C	CUU } LEUCINA (LEU) CUC } CUA } CUG }	CCU } PROLINA (PRO) CCC } CCA } CCG }	CAU } HISTIDINA (HIS) CAC } CAA } GLUTAMINA (GLU) CAG }	CGU } ARGININA (ARG) CGC } CGA } CGG }		U C A G
	A	AUU } ISOLEUCINA (ILE) AUC } AUA } AUG } METIONINA (MET) CÓDON DE INICIAÇÃO	A CU } TREONINA (TRE) ACC } ACA } ACG }	A AU } ASPARAGINA (ASN) AAC } AAA } LISINA (LIS) AAG }	AGU } SERINA (SER) AGC } AGA } ARGININA (ARG) AGG }		U C A G
	G	GUU } VALINA (VAL) GUC } GUA } GUG }	G CU } ALANINA (ALA) GCC } GCA } GCG }	GAU } ÁCIDO ASPÁRTICO (ASP) GAC } GAA } ÁCIDO GLUTÂMICO (GLU) GAG }	GGU } GLICINA (GLI) GGC } GGA } GGG }		U C A G

FIGURA 10: TABELA COM OS CÓDIGOS GENÉTICOS. OS MESMOS CÓDONS SÃO UTILIZADOS PARA OS MESMOS AMINOÁCIDOS NOS MAIS VARIADOS ORGANISMOS, POR ISSO O CÓDIGO TAMBÉM É CONSIDERADO UNIVERSAL.

TRADUÇÃO

Além do RNAm, outros dois tipos de RNA participam da tradução. O RNA transportador (RNAt), que transporta os aminoácidos, e o RNA ribossômico (RNAr), que, com proteínas, formam os ribossomos. Todos os RNAm possuem um códon de iniciação (AUG), que corresponde ao aminoácido metionina, vários códons que determinam a sequência de aminoácidos do polipeptídeo e um códon de terminação, que marca o final daquela cadeia polipeptídica. O RNAt possui uma extremidade com a sequência ACC, onde o aminoácido se liga, e outra extremidade com uma sequência de três bases nitrogenadas, chamada anticódon, responsável por reconhecer o códon no RNAm e transportá-lo à proteína que será formada.

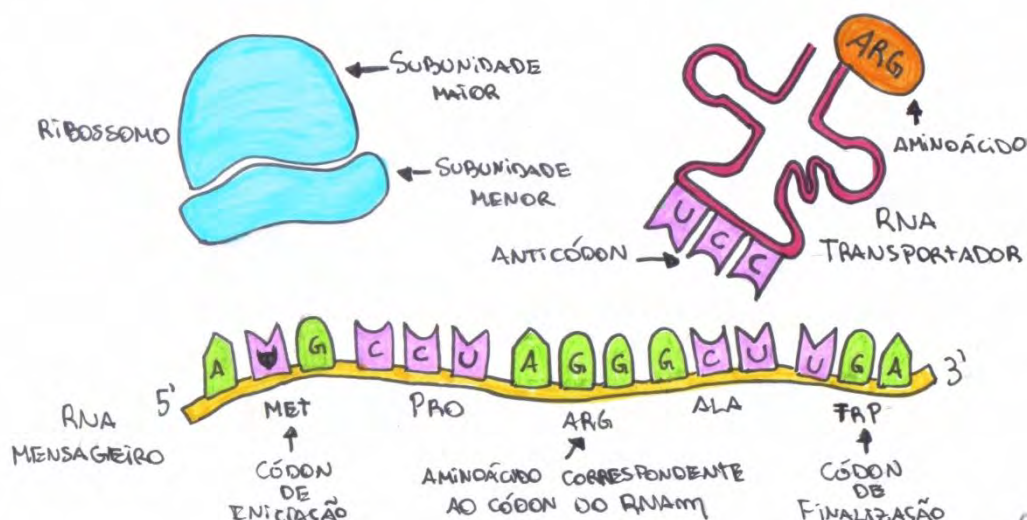


FIGURA 11: RIBOSSOMO, RNA MENSAGEIRO E RNA TRANSPORTADOR: AS MOLÉCULAS DE RNA ENVOLVIDAS NA TRADUÇÃO.

Existem três etapas na tradução: iniciação, alongamento e terminação. Na iniciação, a menor porção do ribossomo se une ao RNAt da metionina e juntos passam a percorrer a molécula de RNAm até encontrarem o códon de iniciação. Quando o encontram, ocorre a união da subunidade maior do ribossomo. Durante a etapa de alongamento, um RNAt do aminoácido correspondente ao próximo códon na sequência de iniciação AUG (metionina) do RNAm e se encaixa no ribossomo. Uma ligação peptídica é estabelecida entre os dois aminoácidos e o RNAt da metionina é liberado. O ribossomo desloca-se no RNAm e outro RNAt, com um terceiro aminoácido correspondente ao terceiro códon do RNAm, se liga ao ribossomo. Ocorre uma nova ligação peptídica entre o segundo e o terceiro aminoácido. O RNAt do segundo aminoácido é liberado e o ribossomo se desloca para o próximo códon, formando a cadeia de aminoácidos até que a proteína esteja completa.

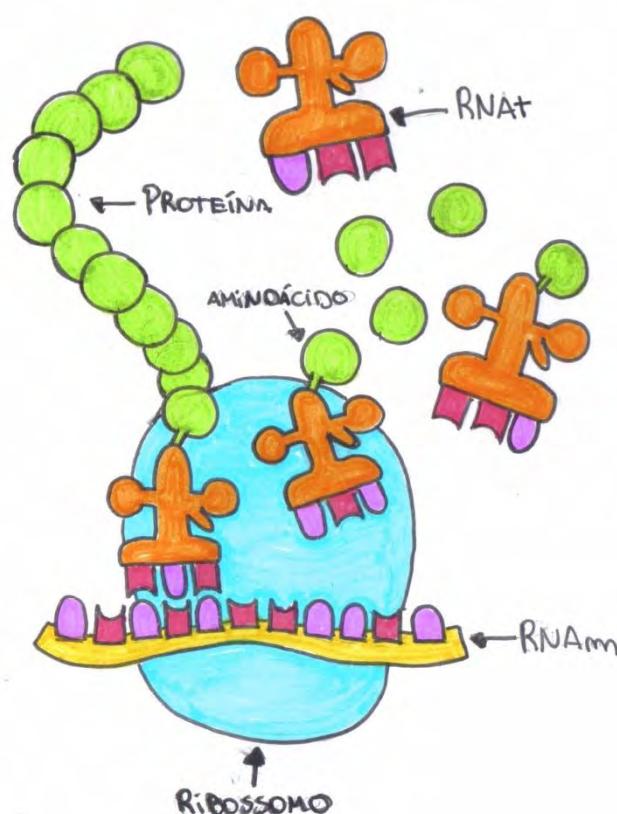


FIGURA 12: ETAPA DE ALONGAMENTO.

Na etapa final, de terminação, a síntese do polipeptídeo é encerrada e o RNAm é liberado no citoplasma, dissociado do ribossomo. Após a tradução, as proteínas podem sofrer modificações (modificações pós-traducionais) que irão compor suas estruturas terciárias e quaternárias. As proteínas que efetuam esses dobramentos são chamadas chaperonas. Importante: vários ribossomos podem ler uma mesma molécula de RNAm ao mesmo tempo (polissomos) e esse processo dura de 20 a 60 segundos. Quando o processo de tradução ocorre em ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático rugoso, ele é iniciado no citosol, mas termina no retículo rugoso. O polipeptídeo formado é liberado no interior do retículo, não no citosol.

MUTAÇÕES GÊNICAS

E assim formamos as proteínas! Ufa. Mas nem tudo é “certinho” como explicamos aqui. Muitas vezes, durante a síntese de proteínas importantes para o funcionamento das nossas células, surgem alterações nos genes que podem resultar em diversas doenças. Pode

ocorrer, por exemplo, a substituição incorreta da base nitrogenada durante a duplicação de uma molécula de DNA. Nesse caso, o códon produzido será outro, o que pode causar alteração na proteína em virtude da substituição de um aminoácido. Essas modificações acidentais são chamadas mutações genéticas e podem provocar alterações nas características dos indivíduos.

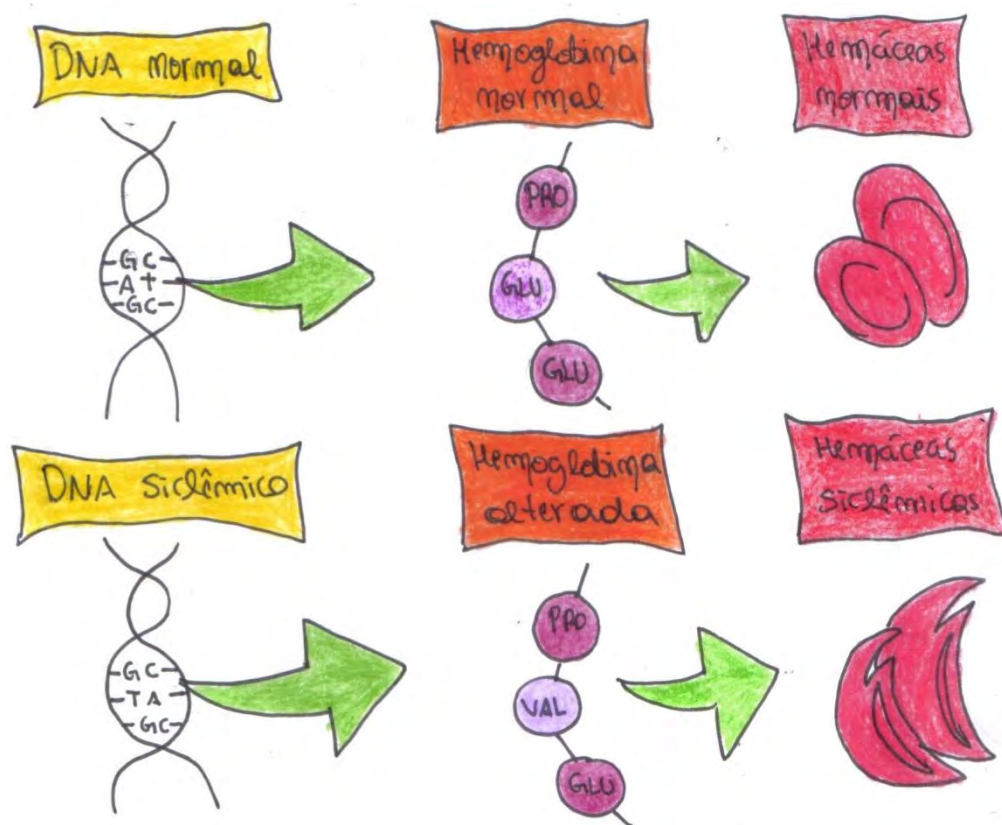


FIGURA 13: MUTAÇÃO DO DNA. NOTE QUE, AO MUDAR A BASE NITROGENADA, A PROTEÍNA QUE SERÁ FORMADA TAMBÉM MUDA, RESULTANDO EM UMA ALTERAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DO INDIVÍDUO.

BIOÉTICA

Antes de começarmos a falar sobre as técnicas utilizadas na Biotecnologia, é necessário entendermos que nem tudo nessa área de estudo é lindo e maravilhoso. Precisamos pensar que estamos lidando com seres vivos, com pessoas, com um mundo inteiro à nossa disposição e não podemos brincar de Deus e manipular tudo isso sem pensar nas consequências. E é aí que entra a Bioética, estudo que envolve as implicações morais das pesquisas científicas nas áreas da Biologia e da Medicina. A Bioética, por abranger as questões éticas e morais com as quais os cientistas lidam ao realizar suas pesquisas com seres vivos, é um campo de estudo fortemente ligado à Filosofia. A manipulação de animais e plantas, a alteração de material genético e o desenvolvimento de medicamentos e procedimentos aplicados às populações envolvem discussões e desconstruções de pensamentos

culturalmente enraizados pela lógica de produção e pela moral religiosa. É necessário pensar e refletir sobre o efeito que essas tecnologias têm em nossa vida e na vida dos outros seres que habitam esse planeta, as questões morais que envolvem técnicas como a clonagem, a transgenia e o uso de células-tronco na ciência. E tudo isso é dificultado pelos efeitos que a mídia têm em discussões polêmicas como essa, tendendo sempre para um moralismo demasiado e uma glorificação das tecnologias “desenvolvimentistas”. Por isso é muito importante que pensemos sobre o modo de produção e manipulação que construímos com o planeta e o efeito que isso causa em nós mesmos e no restante dos seres vivos.

DNA RECOMBINANTE

Como a linguagem do código genético é universal e compreendida da mesma maneira por todos os organismos, a biologia molecular se aproveitou dessa propriedade para produzir substâncias de interesse. Mas como isso funciona? Há organismos (como as bactérias) que são facilmente cultivados em laboratório. Ao conseguirmos implantar fragmentos de DNA exógeno, ou seja, de outro organismo, no material genético das bactérias, elas passarão a sintetizar não apenas os produtos/proteínas para as quais tem a informação adquirida do seu próprio DNA, mas também os produtos resultantes dos genes de interesse inseridos no organismo.

Desde 1973, quando foram pela primeira vez realizadas com sucesso, as aplicações da manipulação gênica têm-se estendido para diversas áreas, como a pecuária, medicina e agricultura. O procedimento de DNA recombinante baseia-se na obtenção de moléculas híbridas de DNA, resultantes da fusão de trechos de DNA de diferentes espécies.

A técnica do DNA recombinante consiste no isolamento de um trecho de DNA em que se tem interesse e na sua inserção no DNA de outro organismo. Assim, o DNA recombinante é a molécula de DNA que recebeu um trecho de DNA (ou gene) que pertence a outro organismo. Esse procedimento geralmente envolve o isolamento de um gene humano com potencial terapêutico, como a insulina, por exemplo, e a introdução desse gene em uma célula animal, bacteriana ou de leveduras.

Selecionar e isolar o fragmento de interesse é um processo que envolve o corte dos cromossomos da interfase, procedimento realizado por enzimas de restrição ou endonucleases de restrição, naturalmente encontradas em bactérias. Cada enzima de restrição é específica para uma determinada sequência de bases nitrogenadas. Desta forma, o corte não é feito ao acaso. Para ‘fixar’ estes fragmentos em outros organismos (geralmente bactérias), os cientistas utilizam enzimas chamadas DNA ligases, também específicas para determinadas sequências de bases nitrogenadas. O DNA destes organismos, agora com um trecho de DNA humano, é chamado recombinante.

O evento central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, em que ocorre a transferência de um gene de interesse de um organismo para outro. Vamos estudar outras técnicas no decorrer da apostila.

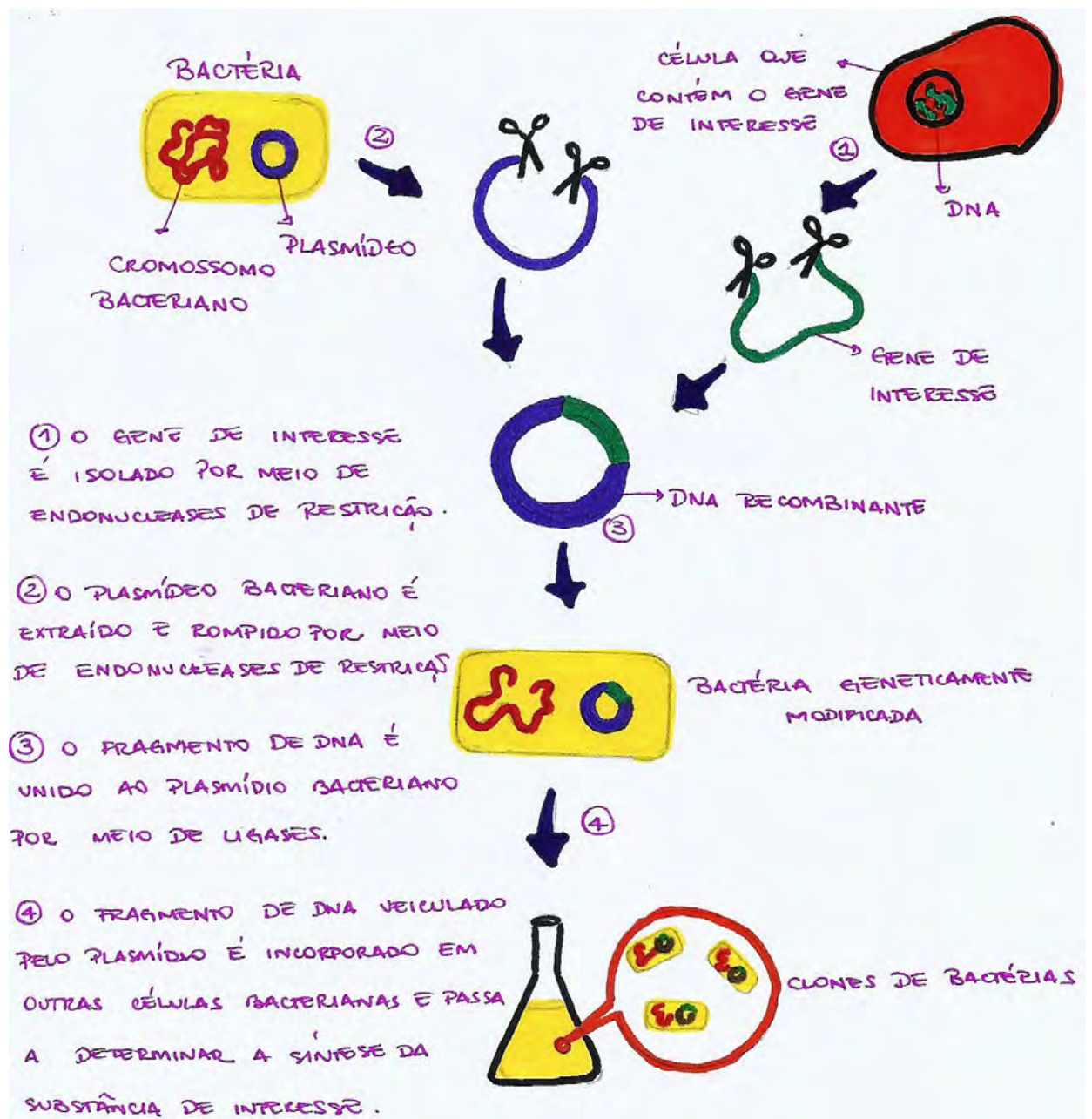


FIGURA 1: TÉCNICA DE DNA RECOMBINANTE.

CLONAGEM DE DNA

Este processo consiste na produção de inúmeras cópias idênticas de um mesmo fragmento da molécula de DNA. O início do procedimento é semelhante ao do DNA recombinante:

- ◆ Isolamento do gene humano por enzimas de restrição;
- ◆ Inserção do gene no DNA de outros organismos (chamados de vetores);

Depois de isolados, os trechos são inseridos em organismos, como vírus e bactérias (vetores), pois, além de aceitarem esta manipulação, eles multiplicam as moléculas recombinantes ao se reproduzirem, dando origem a um grande número de cópias idênticas (clones).

Bactérias possuem, além do seu cromossomo circular, moléculas menores – e também circulares – de DNA conhecidas como plasmídeos. Essas moléculas são utilizadas como vetores, pois não contêm genes essenciais à vida das bactérias (geralmente são genes de resistência a antibióticos).

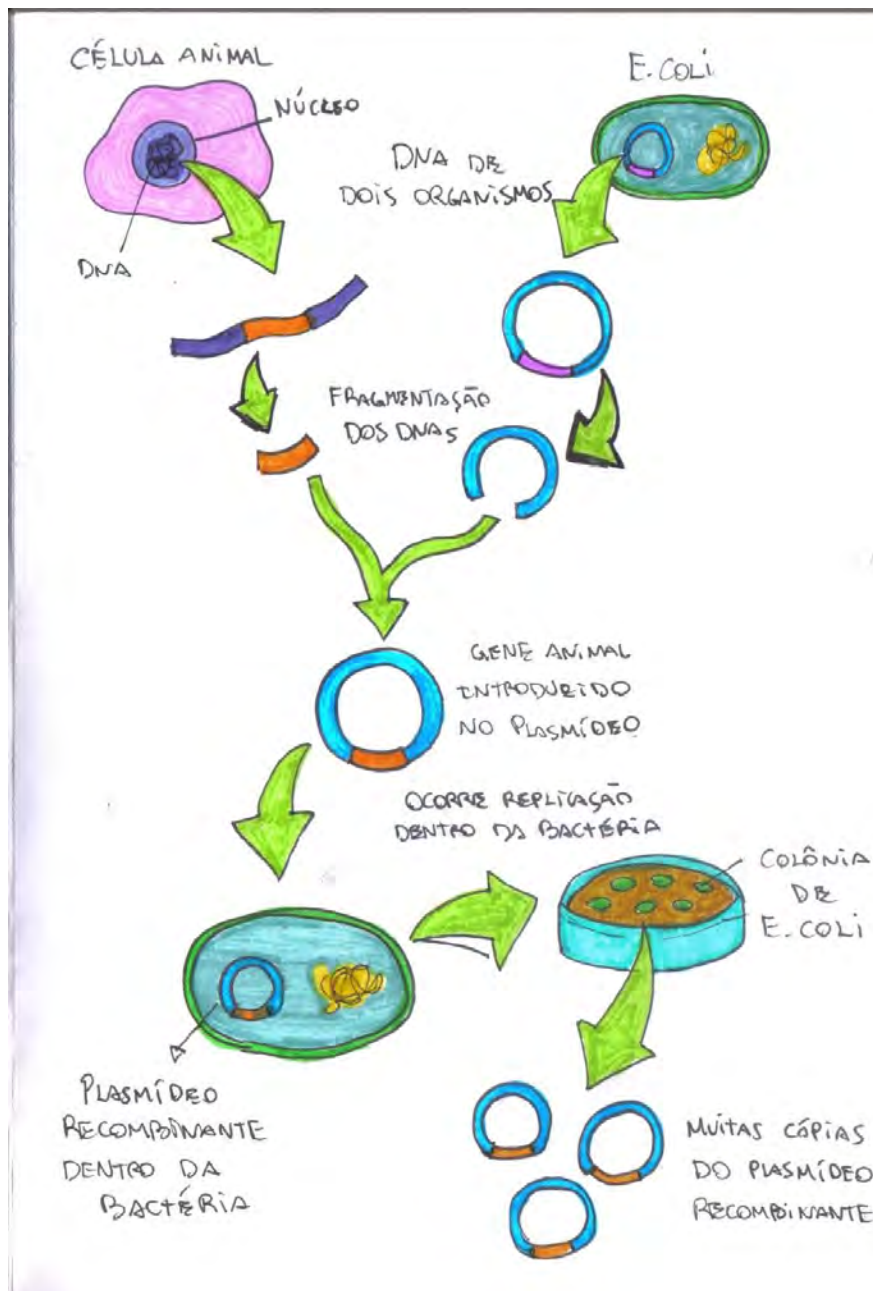


FIGURA 2: TÉCNICA DE CLONAGEM DE DNA COM O USO DE BACTÉRIAS.

Quando o vetor utilizado para clonagem é um vírus, existem algumas etapas a mais no processo: após o isolamento do DNA viral e sua recombinação com o gene de interesse, o meio em que DNA recombinante se encontra recebe proteínas virais e enzimas para que o vírus se constitua. Feito isso, os vírus são introduzidos em culturas de bactérias ou de células de outros organismos, onde ocorre grande replicação do DNA recombinante, formando vários vírus geneticamente idênticos.

Estas técnicas têm sido cada vez mais desenvolvidas e são usadas com muitas finalidades. Algumas delas são:

- ✓ Produção de insulina ou somatotropina (hormônio do crescimento): quando clonamos o gene humano em bactérias (e o estimulamos para entrar em atividade), os micro-organismos passam a produzir grandes quantidades de insulina, que é posteriormente isolada e purificada para a utilização humana;
- ✓ Produção de algumas proteínas do sangue: a albumina e o fator VIII;
- ✓ Produção de alguns tipos de ativadores das defesas orgânicas para o tratamento do câncer, como o fator necrosante de tumores;
- ✓ Criação de vacinas sintéticas contra malária e hepatite B;
- ✓ Criação e desenvolvimento de biotecnologias para pesquisa segura de substâncias cuja manipulação envolve alto risco biológico, como na preparação de vacinas com vírus infecciosos, de modo a controlar o risco de vazamento descontrolado;
- ✓ Transgenia;
- ✓ Teste de paternidade.

Estudaremos as técnicas mais importantes em seguida.

IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS

A técnica de identificação de pessoas, também conhecida como *DNA fingerprint*, é tão segura para identificar indivíduos quanto as impressões digitais. Devemos fazer uma ressalva aos gêmeos monozigóticos, que possuem o mesmo patrimônio genético e não se distinguem pela análise de DNA. No entanto, suas impressões digitais podem ser ligeiramente diferentes, pois estas características surgem durante o desenvolvimento embrionário e são mantidas após do nascimento.

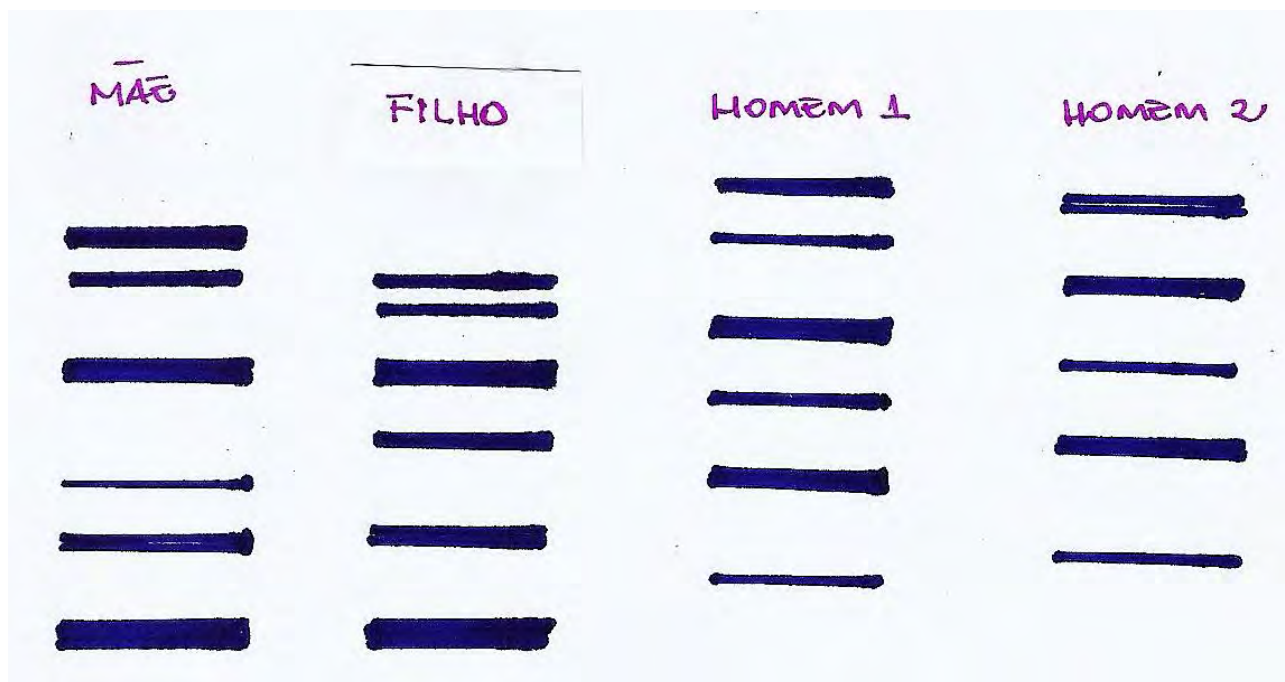


FIGURA 3: TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS OU *FINGERPRINT*. SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONSEGUEM DETERMINAR A PATERNIDADE DE UMA CRIANÇA. NA IMAGEM SABEMOS QUE, NEM O HOMEM 1 E NEM O 2 É O RESPECTIVO PAI DA CRIANÇA.

Essa técnica tem sido útil para identificar suspeitos de crimes e determinar paternidade, entre outros objetivos, com 99,9% de precisão. Para realizá-la são utilizadas sequências de DNA não codificantes, formadas por repetições de unidades compostas por poucos nucleotídeos (sequências VNTRs: número variável de repetições em sequência). Cada indivíduo herda dos pais um padrão específico de repetições desses nucleotídeos.

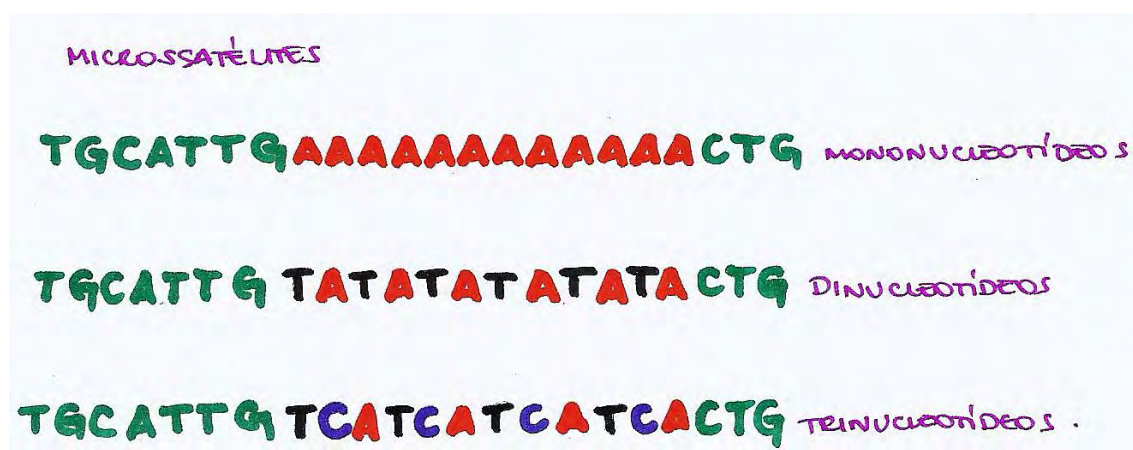


FIGURA 4: EXEMPLOS DE SEQUÊNCIAS VNTRs.

Obtendo-se células nucleadas de um indivíduo, pode-se obter este padrão ao isolar o DNA nuclear e cortá-lo utilizando enzimas específicas de restrição para VNTRs. Com o DNA fragmentado, segue-se o procedimento:

Aplica-se a metodologia de eletroforese em gel (figura 5), então as moléculas de DNA migram no gel do polo negativo para positivo, uma vez que o DNA apresenta carga negativa. Quando a corrente elétrica é desligada, formam-se faixas no gel que indicam o peso das moléculas de DNA: as moléculas grandes migram menos na placa de gel, as menores migram mais. Desta forma, separam-se as cadeias de DNA (desnaturação) com o auxílio de uma membrana de nitrocelulose e as cadeias de DNA serão acrescidas de sondas (trechos de DNA já conhecidos e marcados radioativamente) que se ligam (hibridizam) aos trechos específicos de VNTRs. Então, um filme de raios X é colocado sobre a membrana de nitrocelulose e a radioatividade impressiona esse filme, de forma que nele se obtêm as bandas indicando os locais onde ocorreram as hibridações (onde estão as VNTRs, unidas às sondas). Desta forma, o padrão de VNTRs do indivíduo investigado se revela e está pronto para comparações com o DNA de outros indivíduos.

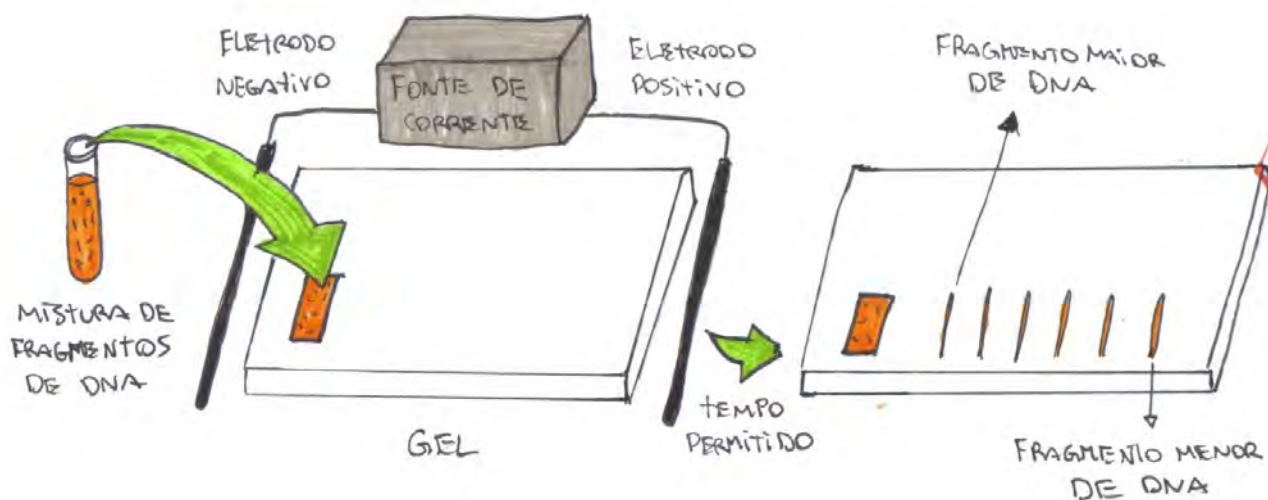


FIGURA 5: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE. AMOSTRAS CONTENDO FRAGMENTOS DE DNA DE DIFERENTES TAMANHOS SÃO DEPOSITADAS EM PEQUENAS DEPRESSÕES DO GEL, QUE FICAM SUSTENTADAS POR PLACAS DE VIDRO E IMERSAS EM SOLUÇÃO AQUOSA. ELETRODOS LIGADOS NAS DUAS EXTREMIDADES ESTABELECEM UM POLO NEGATIVO E OUTRO POSITIVO. DESTA FORMA, OS FRAGMENTOS MIGRAM NO GEL (OS MAIORES SE DESLOCAM MENOS E OS MENORES, MAIS). QUANDO A CORRENTE ELÉTRICA É DESLIGADA, OS FRAGMENTOS FICAM SEPARADOS POR TAMANHO, FORMANDO FAIXAS NO GEL. CADA COLUNA CORRESPONDE ÀS DIFERENTES AMOSTRAS DE DNA (NA FIGURA ACIMA, HÁ APENAS UMA).

PCR

Sabemos que a análise de material genético (DNA) obtido a partir de materiais biológicos é útil em inúmeras situações, entre elas a importância no teste de paternidade, diagnóstico de doenças genéticas, etc. Entretanto, a ‘pequena’ quantidade de DNA disponível na amostra dificulta muito o campo da pesquisa e do estudo desta área da ciência. Em 1983, o bioquímico norte-americano Kary Mullis, estudando bactérias termofílicas, resistentes a altas temperaturas, desenvolveu a reação em cadeia da polimerase, técnica que acelera a multiplicação de fragmentos de DNA.

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite o aumento da eficiência da análise de pouco material genético através da duplicação de trechos de moléculas de DNA *in vitro*. As enzimas utilizadas na polimerização (formação de moléculas de cadeias longas, resultante da união de inúmeros monômeros, ou seja, os nucleotídeos) são conhecidas como polimerases. A DNA polimerase participa da duplicação da molécula de DNA.

O processo se inicia quando a solução contendo o DNA a ser replicado é inicialmente aquecida, o que provoca a desnaturação da molécula, cujas cadeias duplas se separam. Em seguida, os nucleotídeos livres, adicionados à reação, emparelham-se com as fitas de DNA recém-separadas, formando cadeias complementares. Então, em baixas temperaturas, a enzima DNA-polimerase ou a Taq-polimerase une os nucleotídeos, formando moléculas de fita dupla contendo uma fita antiga e uma complementar. Assim, de cada molécula de DNA formam-se duas. É dessa forma que surgem duas moléculas de DNA idênticas.

TERAPIAS GÊNICAS

Na terapia gênica realiza-se a transferência de material genético com o propósito de prevenir ou curar uma enfermidade qualquer. No caso de enfermidades genéticas, nas quais um gene está defeituoso ou ausente, a terapia gênica consiste em transferir a versão funcional do gene para o organismo portador da doença, de modo a reparar o defeito. Por enquanto, por apresentarem alguns efeitos indesejados no organismo receptor, a terapia gênica só é feita em células somáticas e em doenças causadas por apenas um gene.

O procedimento consiste em inserir *in vitro* ou *in vivo* um fragmento de DNA, um gene, na célula/tecido em questão, com a finalidade de que esse gene inserido passe a expressar a proteína em quantidades suficientes para o organismo receptor. O gene pode ser clonado em laboratório e injetado intramuscularmente ou na veia do indivíduo (técnica *in vivo*). Também é possível, em laboratório, usar um vírus modificado (conhecido como vetor) que contenha o alelo de interesse para infectar células do paciente que apresentam a deficiência. Essas células incorporam o DNA recombinante e permanecem no indivíduo pela ação da multiplicação celular.

VACINAS GÊNICAS

As vacinas convencionais atuam por meio de um agente patogênico inativado ou com capacidade de infecção atenuada, o que pode causar problemas em produção de vacinas em grande escala, nos quais podem ocorrer lotes com o agente patogênico ativo. A vacina gênica se constitui por um processo em que os genes causadores de doenças que codificam proteínas responsáveis por estimular o sistema imunológico humano são isolados, inseridos em bactérias e clonados. As técnicas mais estudadas de terapia gênica são a partir de plasmídeos, que são pequenas moléculas circulares de DNA encontradas no citoplasma bacteriano, mas são incapazes de produzir uma infecção. Então, o produto da ativação dos genes específicos (as proteínas geradas destes genes constituem os antígenos) é purificado e pode atuar como vacina que, aplicada em humanos, estimula a produção de anticorpos específicos. Por ser utilizado apenas o produto do gene (proteína), e não o agente patogênico, a vacina gênica é considerada mais segura.

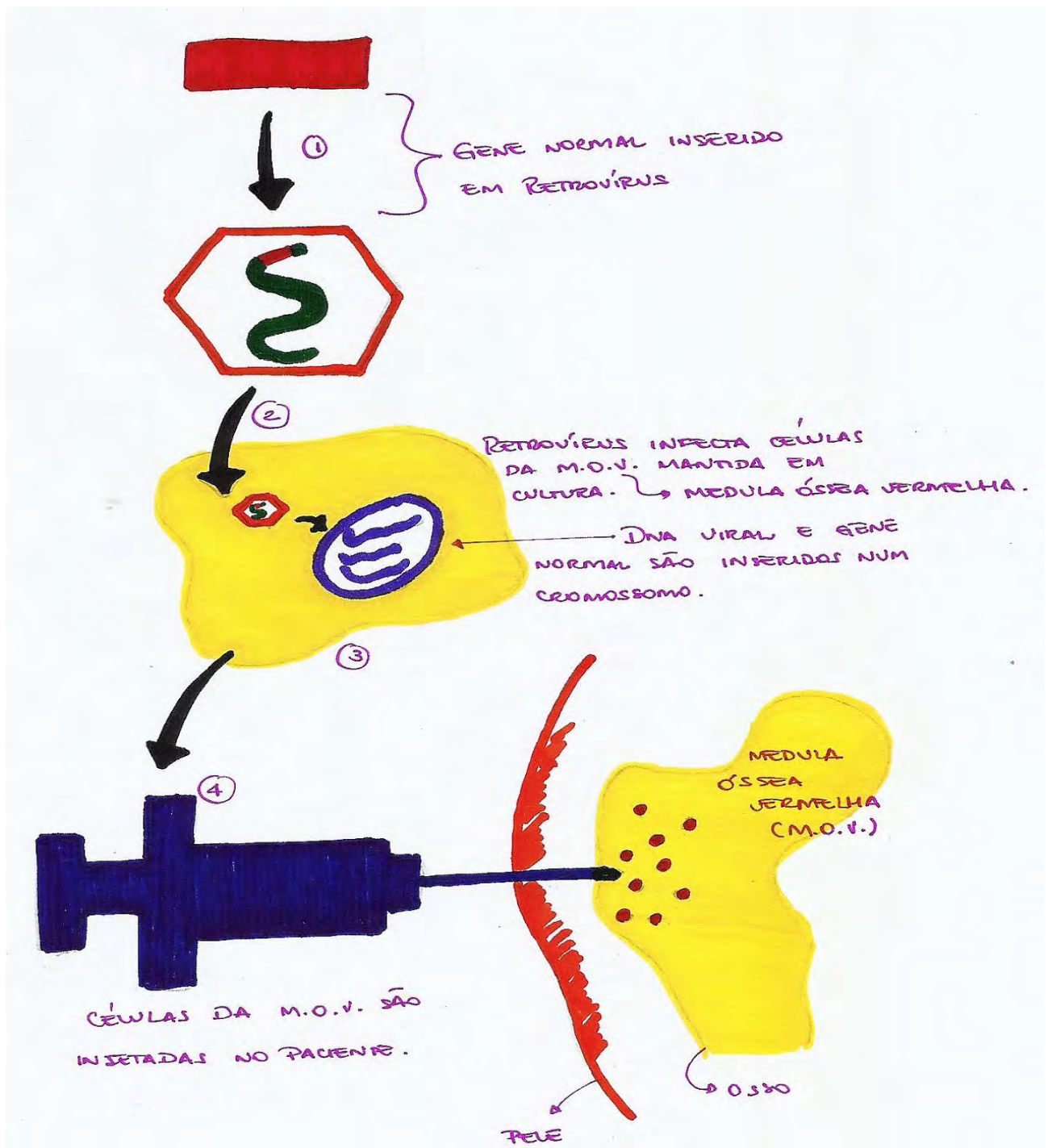


FIGURA 6: TERAPIA GÊNICA EM CÉLULAS DA M.O.V. (MEDULA ÓSSEA VERMELHA).

PROTEOMA

O genoma é o conjunto de todos os genes apresentados por uma espécie, já o proteoma, como o próprio nome revela, é o conjunto de proteínas expressas pelo genoma. Diferentemente de qualquer genoma que é fixo ou muito dificilmente se modifica, o proteoma é variável. Ou seja, a expressão proteica, a regulação pós-traducional, a quantidade gerada, etc, varia de célula para célula dependendo da especialização do tecido celular em questão.

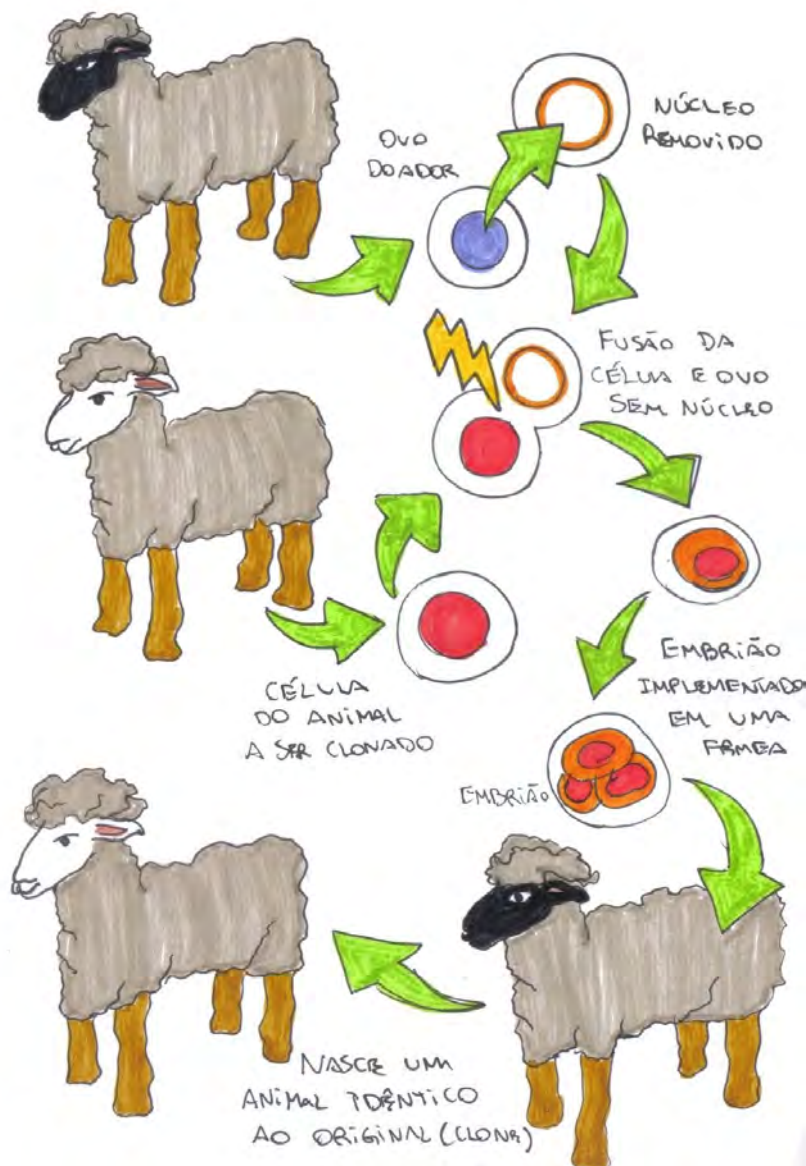
As proteínas são essenciais para a vida, pois realizam inúmeras funções, como regulação, catálise, sustentação, transporte, movimentação, defesa, entre outras. Em inúmeras doenças, como os vários tipos de cânceres, os pesquisadores procuram detectar os chamados biomarcadores, que são proteínas específicas que indicam o estado fisiológico em que a célula afetada se encontra e também as alterações sofridas durante o processo neoplásico.

CLONAGEM DE ORGANISMOS MULTICELULARES

Existem três técnicas para se obter um clone:

- ◆ Reprodução vegetativa (natural): plantas ou gêmeos monozigóticos – podem ser estimulados em laboratório;
- ◆ A partir de células somáticas: a ovelha Dolly, por exemplo. Uma célula receptora (ovócito) de uma ovelha da espécie A com material genético retirado recebe uma célula somática atenuada de uma ovelha B; elas se fundem. Há um estímulo para desencadear desenvolvimento embrionário – descarga elétrica. O zigoto é implantado em uma “mãe de aluguel”. 277 embriões morreram até que Dolly nascesse. Ela sofreu envelhecimento precoce e artrite e morreu com apenas 7 anos de idade. O maior feito dos cientistas foi fazer com que uma célula adulta se tornasse totipotente (célula-tronco) de novo. As células-tronco (ou totipotentes) possuem a capacidade de se diferenciarem em diversos tipos de células, em um processo antes considerado irreversível. Os animais utilizados apresentavam características fenotípicas bem diferentes para os pesquisadores perceberem com clareza o andamento do evento de clonagem.

- ◆ A partir de células embrionárias: é o caso da bezerra Vitória, primeiro animal clonado no Brasil. Na experiência brasileira, houve transferência do núcleo de uma célula de embrião de cinco



dias, da espécie Simental, para um ovócito enucleado tirado de uma vaca de raça diferente. O embrião foi implantado em uma “vaca de aluguel” de espécie diferente. O filhote é a vaquinha Vitória, da Simental. Os animais utilizados eram bem diferentes fenotipicamente entre si.

FIGURA 7: COMO NASCEU DOLLY.

DNA MITOCONDRIAL (DNAM)

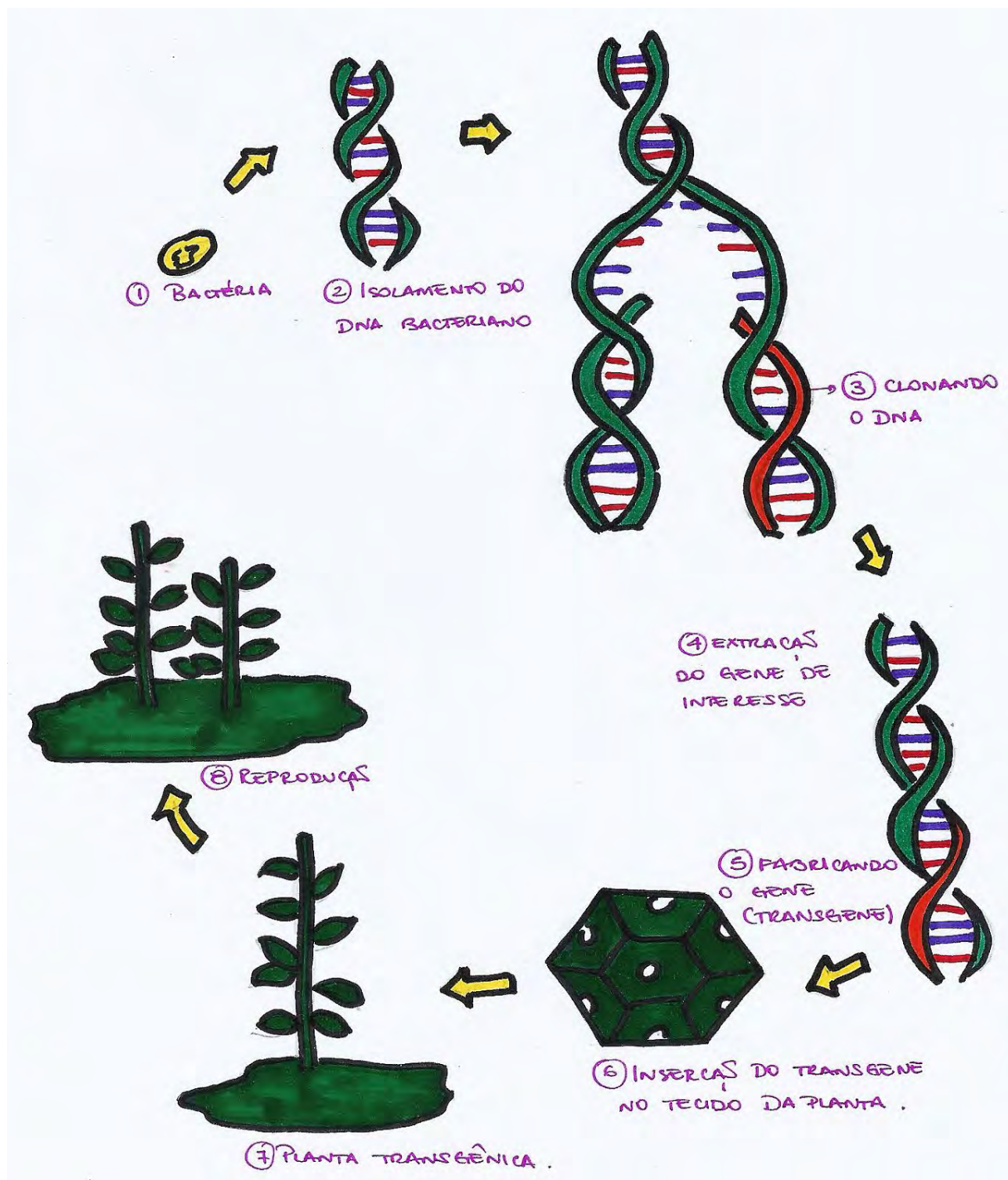
A organela mitocôndria é herdada da mãe. O pai contribui com o material genético para a formação do zigoto. O DNAm pode conter algumas doenças (como a atrofia óptica de Leber, um tipo de cegueira) e influenciar em algumas características específicas do organismo. Dessa forma, o processo de clonagem pode não ser 100% fidedigno, ou seja, totalmente idêntico ao organismo que se quer clonar: quando é estimulada a fusão, em laboratório, de um ovócito desprovido de material nuclear e de um núcleo somático, o clone será imperfeito, pois conterá material genético das mitocôndrias do óvulo. Da mesma maneira, se a fusão ocorrer entre a célula $2n$ atenuada e o ovócito desprovido de núcleo, o clone terá mitocôndrias tanto do ovócito quanto da célula que se fundiu a ele.

TRANSGÊNICOS

São aqueles organismos que recebem genes de outras espécies. A transgenia permite a obtenção de indivíduos com características vantajosas e que produzam substâncias de interesse ao ser humano.

Existem diferentes técnicas de inserção de genes, como as seguintes:

- ◆ Transformação pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*: ocorre através da introdução de plasmídeos no interior de células de plantas, um vetor natural. Método eficiente para grande parte de dicotiledôneas e até mesmo para alguns fungos;
- ◆ Biobalística: ocorre com microprojéteis de ouro ou tungstênio cobertos com o material de interesse, acelerados a velocidades superiores a 1.500km/h que são introduzidos nas células. Método universal (células vegetais, animais e procarióticas);
- ◆ Eletroporação de protoplastos: método para inserção de macromoléculas em células vegetais. Os protoplastos (células vegetais desprovidas de parede celular) são mantidos em seleção junto com plasmídeos que contêm os genes de interesse. A entrada dos genes no protoplasto ocorre por eletroporação, através da descarga de alta voltagem que promove abertura temporária de poros na membrana plasmática. Método preferencial para monocotiledôneas.

FIGURA 8: TRANSFORMAÇÃO PELA BACTÉRIA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células que apresentam características diferenciadas como o fato de se autorreplicar, gerando mais células-tronco, capazes de se diferenciar em vários tipos celulares e apresentar a especificidade ou função do tecido de interesse. Atualmente, existem três tipos de células-tronco: as embrionárias, encontradas no embrião em formação; as adultas, encontradas principalmente na medula óssea e no cordão umbilical; e as pluripotentes induzidas, obtidas em laboratório. Aqui, trataremos somente das células-tronco induzidas; os detalhes dos outros dois tipos encontraremos na apostila de Embriologia.

As células-tronco de pluripotência induzidas, também conhecidas pela sigla iPS, foram descobertas em 2006, pelo pesquisador Shinya Yamanaka e colaboradores, no Japão. Eles testaram e comprovaram a veracidade de fibroblastos da pele poderem aumentar a sua capacidade de renovação e, também, de serem capazes de se transformar em qualquer tipo celular. Isso se deu através da introdução de alguns poucos genes que induziram a realização da reprogramação da célula.

Com essa descoberta, as áreas afins da Biotecnologia poderão isolar células de interesse de determinado tecido, mantê-las em meio de cultura e, após, com o auxílio de vetores virais (por exemplo), introduzir os genes responsáveis pela reprogramação celular, gerando uma resposta da célula receptora frente à inserção gênica. Desta forma, pode-se obter células indiferenciadas que poderão se transformar em células de vários tecidos, como conjuntivo e nervoso, por exemplo, a partir de uma célula madura/diferenciada. Com o incremento desta técnica de células-tronco é possível o avanço nas áreas do estudo de inúmeras doenças, uma vez que não é necessário utilizar-se de células-tronco embrionárias ou de células-tronco adultas de difícil acesso, como as encontradas na medula óssea.

IMPACTOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E AGRÍCOLA

Ocorre uma certa aflição por parte de alguns grupos de pesquisadores/cidadãos com o avanço das técnicas empregadas no ramo de Biotecnologia. O principal motivo de preocupação pública é pela aplicação da engenharia genética, na qual existiria a chance de comercializar uma grande variedade de organismos modificados geneticamente. Com isso, haveria a possibilidade de permitir a liberação de tais organismos no meio externo, o que aumenta os riscos numa escala micro e macroscópica, sobretudo quando comparada à investigação confinada em laboratório.

As novas biotecnologias têm participação na agricultura, na pecuária e em diferentes áreas da saúde humana. Os trabalhos de bioprospecção (aqueles que tem por finalidade um retorno econômico) em áreas de alta diversidade biológica têm aumentado em número e em

intensidade em áreas com interesses diversificados, como: empresas do setor agrícola e farmacêutico; instituições de ensino, pesquisa e desenvolvimento; etc.

Inúmeras aplicações da Biotecnologia podem ser vantajosas para a sociedade, mas, ainda assim, geram controvérsias a respeito das consequências sobre humanos e animais, impactos sobre o ambiente e a sociedade como um todo. Infelizmente, não temos as respostas definitivas quanto aos efeitos a longo prazo e também em escala global. Embora possamos obter vantagens, como o aumento da produção de alimentos e a obtenção de alimentos mais nutritivos e com propriedades medicinais; técnicas terapêuticas para doenças que ainda não possuem cura; produção de medicamentos, hormônios, anticorpos, etc.; produção de produtos biodegradáveis para reduzir a poluição ambiental, entre outros, veremos alguns impactos negativos que podem ocorrer a partir do uso da Biotecnologia.

Num contexto abrangente, poderíamos começar citando o efeito negativo sobre as discussões geradas a partir de questões éticas relacionadas à clonagem de seres vivos, terapias gênicas, transgênicos, etc.; células-tronco geradoras de um estresse celular que pode ter como consequência o envelhecimento precoce, entre outros efeitos. Analisando o caso da indústria farmacêutica e agrícola, podemos ter como efeitos negativos a utilização intensiva de agrotóxicos e fertilizantes; sementes geneticamente modificadas inférteis; contaminação do lote “normal” com o lote transgênico; transgênicos causadores de complicações na saúde, como reações alérgicas; além de impactos mais globais envolvendo a “poluição genética”, ou seja, não ser possível controlar os efeitos da disseminação desses organismos no ambiente; interferência no equilíbrio da natureza como um todo, entre outros efeitos que poderiam ser citados. Por isso cada caso deve ser cuidadosamente verificado, pois as consequências podem ser irreparáveis.

CRISPR-CAS9

Recentemente, estudando bactérias, descobriu-se sequências repetitivas de DNA, no meio das quais existiriam fragmentos de genes estranhos ao genoma bacteriano. O mecanismo recebeu o nome de CRISPR. No ano de 2012, pesquisadoras demonstraram que CRISPR é capaz de localizar e delimitar o corte de alvos específicos de qualquer gene.

Outra descoberta importante foi que as bactérias conseguem “lembrar” dos vírus que as infectaram no passado, devido à permanência no seu genoma de restos de DNA viral incorporados no meio das sequências CRISPR do genoma bacteriano. Em caso de ataque do mesmo agente patógeno, a bactéria sintetiza rapidamente moléculas-guia de RNA, que localizam com precisão sequências específicas do DNA invasor, para que uma enzima, geralmente a nuclease Cas9, corte e inative os genes do patógeno, por exemplo de um vírus, inativando-o. CRISPR com Cas9, ativa ou inativada, é agora o método mais empregado para “desligar” ou “ativar” a expressão de qualquer gene de interesse científico ou comercial, como os genes que causam o câncer, por exemplo.