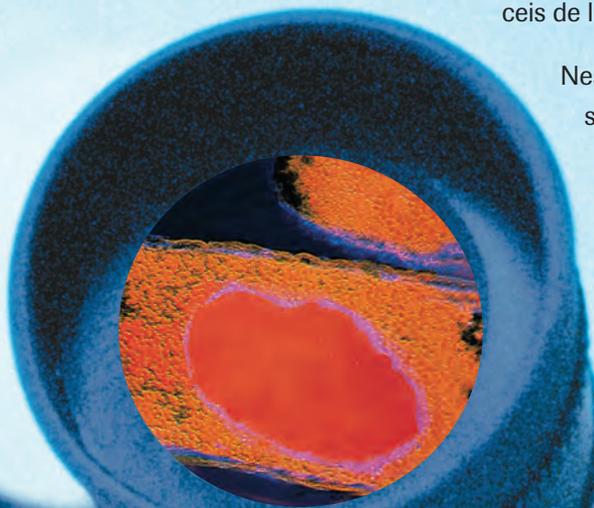


9

Biotecnologia e DNA Recombinante

Por centenas de anos, as pessoas têm consumido alimentos que são produzidos pela ação de micro-organismos. Pão, chocolate e molho de soja são alguns dos exemplos mais conhecidos. Mas foi somente há pouco mais de 100 anos que os cientistas demonstraram que os micro-organismos são responsáveis por esses produtos. Esse conhecimento abriu o caminho para o uso de micro-organismos na manufatura de outros produtos importantes. Desde a Primeira Guerra Mundial, os micróbios têm sido usados para produzir uma variedade de substâncias químicas, como o etanol, a acetona e o ácido cítrico. Desde a Segunda Guerra Mundial, os micro-organismos têm sido cultivados em larga escala para produzir antibióticos. Mais recentemente, os micróbios e suas enzimas têm substituído uma variedade de processos químicos envolvidos na fabricação de produtos, como papel, tecidos e frutose. O uso de micróbios ou de suas enzimas em vez de substâncias químicas oferece várias vantagens: os micróbios podem usar matérias primas baratas e abundantes como amido –, podem trabalhar sob temperaturas e pressões normais, evitando, portanto, a necessidade de sistemas pressurizados caros e perigosos, e não produzem resíduos tóxicos e difíceis de lidar.

Neste capítulo você aprenderá sobre as ferramentas e as técnicas que são utilizadas para pesquisar e desenvolver um produto. Você também verá como a tecnologia do DNA recombinante é usada para investigar surtos de doenças infecciosas e fornecer evidências para tribunais de justiça em microbiologia forense.



SOB O MICROSCÓPIO

Escherichia coli. Esta bactéria foi alterada geneticamente para produzir uma proteína humana, o interferon gama. Diferente das células humanas, a *E. coli* não secreta as proteínas, então as células serão submetidas à lise para que a proteína seja recuperada.

P&R

Há trinta anos, pesquisadores sabiam que os interferons são agentes antivirais eficazes. Entretanto, eles descobriram que os interferons são espécie-específicos, e desta forma, para que pudessem ser utilizados em seres humanos, deveriam ser produzidos em células humanas. Os pesquisadores temiam que os interferons tivessem que ser utilizados em quantidades limitadas sempre. Você pode pensar em uma maneira de aumentar o suprimento de interferons para que eles pudessem ser utilizados no tratamento de doenças?

Procure pela resposta neste capítulo.

Introdução à biotecnologia

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 9-1** Comparar e diferenciar biotecnologia, engenharia genética e tecnologia do DNA recombinante.
- 9-2** Identificar as funções de um clone e de um vetor na construção do DNA recombinante.

Biotecnologia é a utilização de micro-organismos, células ou componentes celulares para fazer um produto. Os micróbios têm sido utilizados na produção comercial de alimentos, vacinas, antibióticos e vitaminas há anos. As bactérias também têm sido usadas na mineração para extrair elementos valiosos do minério (veja a Figura 28.14, página 807). Além disso, as células animais têm sido utilizadas na produção de vacinas virais desde a década de 1950. Até os anos de 1980, os produtos feitos por células vivas eram produzidos pelas células naturalmente; o papel dos cientistas era encontrar a célula apropriada e desenvolver um método de cultivo em larga escala.

Agora, os micro-organismos, bem como as plantas, estão sendo usados como “fábricas” para produzir as substâncias químicas que os organismos não produzem de forma natural. Isso é possível por meio da inserção de genes nas células, um processo denominado **tecnologia do DNA recombinante (rDNA)**, também chamado de engenharia genética. O desenvolvimento da engenharia genética está expandindo, as aplicações práticas da biotecnologia.

Tecnologia do DNA recombinante

Lembre-se do Capítulo 8 que a recombinação do DNA ocorre naturalmente nos micróbios. Nas décadas de 1970 e 1980, os cientistas desenvolveram técnicas artificiais para fazer DNA recombinante.

Um gene de um animal invertebrado, inclusive do homem, pode ser inserido no DNA de uma bactéria, ou um gene de um vírus pode ser inserido em uma levedura. Em muitos casos, pode-se fazer o receptor expressar o gene, que pode codificar um produto comercialmente útil. Assim, bactérias com genes de insulina humana estão sendo agora utilizadas para produzir insulina para o tratamento do diabetes, e uma vacina contra a hepatite B está sendo produzida em uma levedura portadora do gene que codifica parte do vírus causador da doença (a levedura produz uma proteína do capsídeo viral). Os cientistas esperam que esta abordagem se torne útil para a produção de vacinas contra outros agentes infecciosos, eliminando a necessidade de usar micro-organismos completos, como nas vacinas convencionais.

As técnicas de rDNA também podem ser usadas para fazer milhares de cópias de uma mesma molécula de DNA – para *amplificar* DNA, gerando assim DNA suficiente para vários tipos de experimentos e análises. Essa técnica tem aplicação prática para a identificação de micróbios, como os vírus, que não crescem em cultura celular.

Visão geral da tecnologia do DNA recombinante

A **Figura 9.1** apresenta uma visão geral de alguns dos procedimentos tipicamente utilizados pela tecnologia do rDNA, juntamente

com algumas aplicações promissoras. O gene de interesse é inserido no DNA do vetor *in vitro*. Neste exemplo, o vetor é um plasmídeo. A molécula de DNA escolhida como vetor deve ser do tipo autor-replicativo, como um plasmídeo ou um genoma viral. A seguir, o vetor recombinante de DNA é introduzido em uma célula, como uma bactéria, por exemplo, onde ele pode multiplicar-se. A célula contendo o vetor recombinante é, então, multiplicada em cultura para formar um **clone** de muitas células geneticamente idênticas, cada um dos quais carregando uma cópia do vetor. Esse clone de células, portanto, contém muitas cópias do gene de interesse. Por isso, os vetores de DNA com frequência são chamados de *vetores de clonagem de genes*, ou simplesmente vetores de clonagem. (O verbo derivado da palavra *clone* – *clonar* – também é utilizado rotineiramente para descrever todo o processo, como em “clonar um gene”.)

A etapa final varia de acordo com os objetivos de interesse, se é o próprio gene ou o seu produto. A partir do clone de células, o pesquisador pode isolar (“selecionar”) grandes quantidades do gene de interesse, que pode então ser utilizado para vários propósitos. O gene pode até mesmo ser inserido em um outro vetor para a introdução em outro tipo de célula (como uma célula vegetal ou animal). Alternativamente, se o gene de interesse é expresso (transcrito ou traduzido) no clone de células, seu produto proteico pode ser selecionado e utilizado para vários propósitos.

As vantagens da utilização do rDNA para a obtenção dessas proteínas são ilustradas por um de seus primeiros êxitos: a produção do hormônio de crescimento humano (*hGH*, de *human growth hormone*). Alguns indivíduos não produzem quantidades adequadas de hGH, e por isso apresentam deficiência no crescimento. No passado, o hGH necessário para corrigir esta deficiência tinha que ser obtido de glândulas pituitárias humanas em autópsias. (O hGH de outros animais não funciona em seres humanos.) Essa prática, além de cara, também era perigosa, pois em várias ocasiões doenças neurológicas eram transmitidas com o hormônio. O hGH produzido por *E. coli* geneticamente modificada é puro e de custo mais acessível. Técnicas de rDNA também resultam em uma produção mais rápida de hormônio, o que não é possível com os métodos tradicionais.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Diferencie biotecnologia e tecnologia do DNA recombinante. **9-1**
- ✓ Como um vetor e um clone são usados? **9-2**

Ferramentas da biotecnologia

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

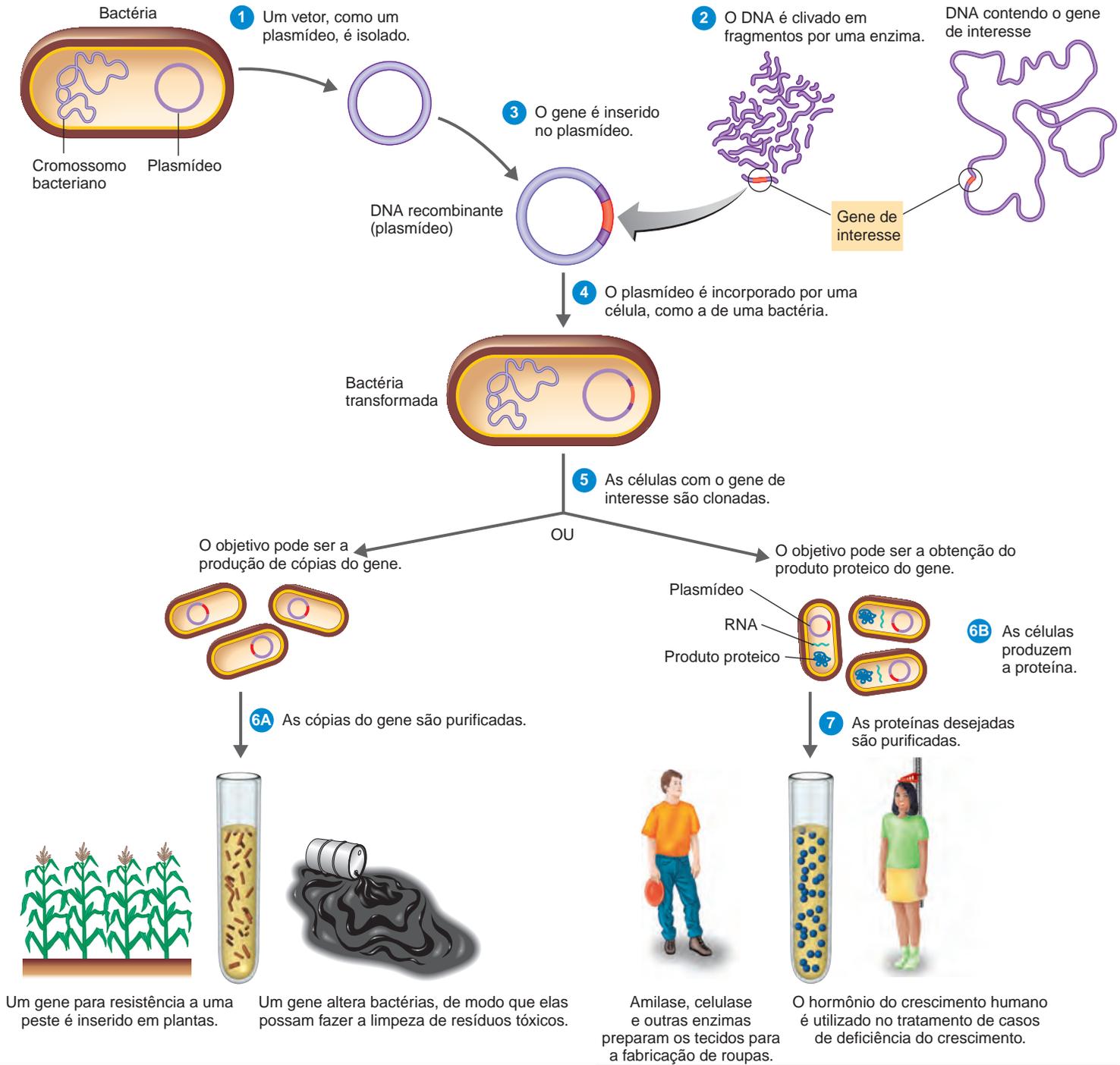
- 9-3** Comparar seleção e mutação.
- 9-4** Definir enzimas de restrição e como elas são utilizadas na engenharia genética.
- 9-5** Listar as quatro propriedades dos vetores.
- 9-6** Descrever a utilização de plasmídeos e vetores virais.
- 9-7** Definir os passos da PCR e exemplificar o seu uso.

Os cientistas e os técnicos pesquisadores isolam bactérias e fungos a partir de ambientes naturais como o solo e a água, para encontrar

Figura 9.1

FIGURA FUNDAMENTAL Um procedimento típico de engenharia genética

Esta figura mostra uma visão geral da construção de uma célula recombinante e apresenta alguns exemplos de sua aplicação.



Conceito-chave

Genes pertencentes a uma determinada célula de um organismo podem ser inseridos e expressos em células de outro organismo. Células geneticamente modificadas podem ser utilizadas para produzir uma grande variedade de produtos proteicos úteis.

ou *selecionar* os organismos que produzem um produto desejado. O organismo selecionado pode ser submetido a mutações para produzir mais do produto ou um produto melhor.

Seleção

Na natureza, organismos com características que aumentem as chances de sobrevivência têm maior probabilidade de sobreviver e de se reproduzir do que as variantes que não possuem esses traços. Isso se chama *seleção natural*. Os seres humanos usam a **seleção artificial** para escolher as raças desejadas de animais ou variedades de plantas para serem cultivadas. Quando os microbiologistas aprenderam como isolar e cultivar micro-organismos, em cultura pura, eles se tornaram capazes de selecionar somente aqueles que poderiam atingir o objetivo desejado, como produzir cerveja de forma mais eficiente, por exemplo, ou um novo antibiótico. Mais de 2 mil variedades de bactérias produtoras de antibióticos foram descobertas por meio de testes em bactérias no solo e seleção das variedades que produzem antibióticos. O quadro no Capítulo 28 descreve a seleção de uma bactéria que converte resíduos em um produto valioso.

Mutação

Como vimos no Capítulo 8, as mutações são responsáveis por grande parte da diversidade da vida. Uma bactéria com uma mutação que confere resistência a um antibiótico irá sobreviver e se reproduzir na presença deste antibiótico. Biólogos trabalhando com micróbios produtores de antibióticos descobriram que poderiam criar novas variedades se expusessem os micro-organismos a agentes mutagênicos. Após a criação de mutações aleatórias no fungo produtor de penicilina, o *Penicillium*, pela exposição de culturas do fungo à radiação, a variante com maior rendimento dentre os sobreviventes foi selecionada para uma nova exposição a um mutagênico. Usando as mutações, os biólogos aumentaram a quantidade de penicilina produzida pelo fungo em mais de mil vezes.

O exame de cada mutante para detectar a produção de penicilina é um processo tedioso. A **mutagênese sítio-dirigida** pode ser usada para fazer uma alteração específica em um gene. Suponha que você determine que a alteração de um aminoácido fará as enzimas que atuam no detergente durante a lavagem de roupa trabalharem melhor na água fria. Usando o código genético (veja a Figura 8.8, página 219), você poderia criar a sequência do DNA que codifica aquele aminoácido e o inserir no gene da enzima, usando as técnicas descritas a seguir.

A ciência da engenharia genética avançou a um nível tal que muitos procedimentos de clonagem rotineiros já são realizados utilizando materiais pré-preparados e seguindo protocolos muito similares a receitas de bolo. Os engenheiros genéticos possuem um repertório de métodos à disposição, que são utilizados de acordo com o objetivo final de cada experimento. A seguir, descreveremos algumas das mais importantes ferramentas e técnicas e, mais tarde, consideraremos algumas aplicações específicas.

Enzimas de restrição

A engenharia genética tem as suas raízes técnicas na descoberta das **enzimas de restrição**, uma classe especial de enzimas que clivam o DNA e que existem em muitas bactérias. As enzimas de restrição foram isoladas pela primeira vez em 1970, embora elas tenham sido

Tabela 9.1 Algumas enzimas de restrição usadas em engenharia genética		
Enzima	Bactéria em que a enzima é isolada	Sequência reconhecida
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G ^I GATC C GCTAG _I G
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	G ^I AATC C CTTAA _I G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG ^I CC CC _I GG
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	^I AAGCTT TT _I CGAA

observadas na natureza antes disso, quando foi descoberto que certos bacteriófagos tinham uma gama restrita de hospedeiros. Se esses fagos eram utilizados para infectar outras bactérias que não suas hospedeiras habituais, eles tinham quase todo o seu DNA destruído pelas enzimas de restrição das novas bactérias hospedeiras. As enzimas de restrição protegem uma célula bacteriana pela hidrólise do DNA do fago. O DNA bacteriano é protegido da digestão porque a célula **metila** acrescenta grupos metil a algumas das citosinas do seu DNA. As formas purificadas destas enzimas bacterianas são utilizadas atualmente pelos engenheiros genéticos.

O que é importante para a engenharia genética é que uma enzima de restrição reconhece e cliva, ou *digere*, somente uma determinada sequência de bases nucleotídicas no DNA, e ela cliva essa sequência sempre da mesma maneira. As enzimas de restrição típicas utilizadas em experimentos de clonagem reconhecem sequências de quatro, seis ou oito bases. Centenas de enzimas de restrição são conhecidas, e cada uma produz fragmentos de DNA com as extremidades clivadas de modo característico. Algumas enzimas de restrição estão listadas na **Tabela 9.1**. Você pode observar que o nome das enzimas de restrição é determinado de acordo com a espécie bacteriana na qual ela é isolada. Algumas dessas enzimas (p. ex., *Hae*III) clivam ambas as fitas do DNA em um mesmo ponto, produzindo **extremidades cegas**, e outras fazem cortes escalonados nas duas fitas – os cortes não são diretamente opostos um ao outro (**Figura 9.2**). Essas extremidades escalonadas, ou **extremidades coesivas**, são as mais utilizadas na engenharia genética, uma vez que podem unir duas peças diferentes de DNA, previamente cortadas pela mesma enzima. As extremidades coesivas do DNA se ligam uma às outras por complementaridade de bases.

Observe na Figura 9.2 que as sequências nucleotídicas em negrito são as mesmas nas duas fitas, mas elas se estendem em direções opostas. As clivagens escalonadas geram segmentos curtos de DNA de fita simples nas extremidades dos fragmentos de DNA. Se dois fragmentos de DNA de diferentes origens forem produzidos pela ação da mesma enzima de restrição, ambos terão

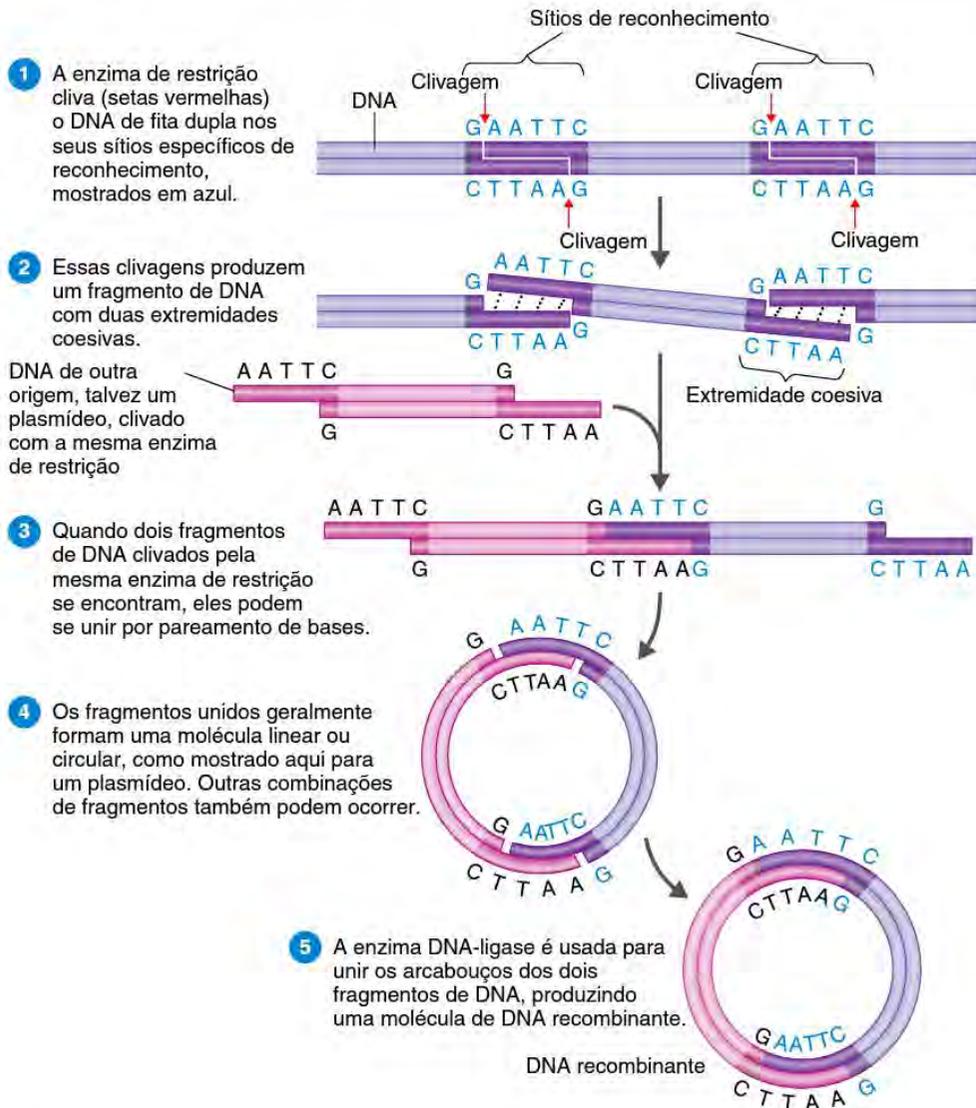


Figura 9.2 A função de uma enzima de restrição no processo de produção de uma molécula de DNA recombinante.

P Por que as enzimas de restrição são usadas em engenharia genética?

extremidades coesivas idênticas e poderão ser unidos (recombinados) *in vitro*. As extremidades coesivas se unem de modo espontâneo por ligação de hidrogênio (pareamento de bases). A enzima DNA-ligase é usada para unir covalentemente os arca-bouços de diferentes moléculas de DNA, produzindo moléculas de rDNA.

Vetores

Existe um grande número de tipos de moléculas de DNA que podem ser utilizadas como vetores, bastando para isso que elas tenham certas propriedades. A propriedade mais importante é a autorreplicação: uma vez no interior de uma célula, um vetor deve ser capaz de replicar-se. Qualquer molécula de DNA que for clonada no vetor, também será replicada nesse processo. Assim, os vetores funcionam como veículos para a replicação de sequências de DNA de interesse.

É também necessário que os vetores tenham um tamanho que permita que eles sejam manipulados fora da célula, durante o processo de construção do rDNA. Os vetores menores são

manipulados mais facilmente que moléculas de DNA maiores, que tendem a ser mais frágeis. A preservação é outra propriedade importante dos vetores. A forma circular das moléculas de DNA é um fator importante para a proteção do DNA do vetor da sua eventual destruição pela célula receptora. Observe na **Figura 9.3** que o DNA de um plasmídeo é circular. Um outro mecanismo de preservação ocorre quando o DNA de um vírus se insere rapidamente no cromossomo do hospedeiro (veja o Capítulo 13, página 380).

Quando é necessário recuperar células contendo o vetor, a presença de um gene marcador vetorial muitas vezes pode facilitar o processo de seleção. Os genes marcadores selecionáveis mais comuns são aqueles para a resistência a antibióticos ou para enzimas que realizam reações facilmente identificáveis.

Alguns dos principais vetores utilizados atualmente são plasmídeos, em especial variantes de plasmídeos com fatores R. O DNA plasmidial pode ser clivado com as mesmas enzimas de restrição que o DNA a ser clonado, ficando assim todos os fragmentos de DNA com as mesmas extremidades coesivas. Quando os fragmen-

tos são misturados, o DNA a ser clonado é inserido no plasmídeo (veja a Figura 9.2). Note que outras combinações de fragmentos são possíveis e podem ocorrer, inclusive a recirculação do plasmídeo sem nenhum fragmento de DNA inserido.

Alguns plasmídeos são capazes de subsistir em várias espécies diferentes. Eles são chamados de **vetores bifuncionais** e podem ser utilizados para mover sequências de DNA clonadas de um organismo para outro, como entre células bacterianas, de leveduras e de mamíferos ou entre células bacterianas, de fungos e de vegetais. Os vetores bifuncionais podem ser muito úteis no processo de modificação genética de organismos multicelulares – por exemplo, na tentativa de inserir genes de resistência a herbicidas em plantas.

Um tipo distinto de vetor é o DNA viral. Esse tipo de vetor pode normalmente aceitar fragmentos de DNA exógeno muito maiores que o tamanho máximo aceito por plasmídeos. Após o DNA ter sido inserido no vetor viral, ele pode ser clonado nas células hospedeiras do vírus. A escolha de um vetor adequado depende de muitos fatores, inclusive do organismo que receberá o novo gene e do tamanho do DNA a ser clonado. Retrovírus, adenovírus e herpesvírus estão sendo usados para inserir genes corretivos em células humanas que contêm genes defectivos. A terapia gênica será discutida na página 259.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Como a seleção e a mutação são utilizadas na biotecnologia? **9-3**
- ✓ Qual a importância das enzimas de restrição na engenharia genética? **9-4**
- ✓ Que critérios devem ser respeitados na escolha de um vetor? **9-5**
- ✓ Por que um vetor é utilizado em engenharia genética? **9-6**

Reação em cadeia da polimerase

A **reação em cadeia da polimerase (PCR, de Polymerase Chain Reaction)** é uma técnica em que pequenas amostras de DNA podem ser rapidamente amplificadas, isto é, aumentadas em quantidades suficientes para que a análise seja feita.

Iniciando com somente um fragmento de DNA do tamanho de um gene, a PCR pode ser utilizada para produzir literalmente bilhões de cópias em poucas horas. A **Figura 9.4** mostra o processo da PCR.

- 1 Cada fita do DNA-alvo servirá como molde para a síntese do DNA.
- 2 Acrescenta-se a este DNA uma provisão dos quatro nucleotídeos (para serem montados dentro do novo DNA) e a enzima para catalisar a síntese, a DNA-polimerase (veja o Capítulo 8, página 213). Pequenos fragmentos de ácido nucleico, denominados iniciadores (ou *primers*), são complementares às extremidades do DNA-alvo e
- 3 irão se anelar aos fragmentos a serem amplificados.
- 4 A polimerase, então, sintetiza novos fragmentos complementares.
- 5 Depois de cada ciclo, o DNA é aquecido para converter todo o novo DNA em fitas simples. Cada fita de DNA recém-sintetizada funciona, por sua vez, como molde para novos DNAs.

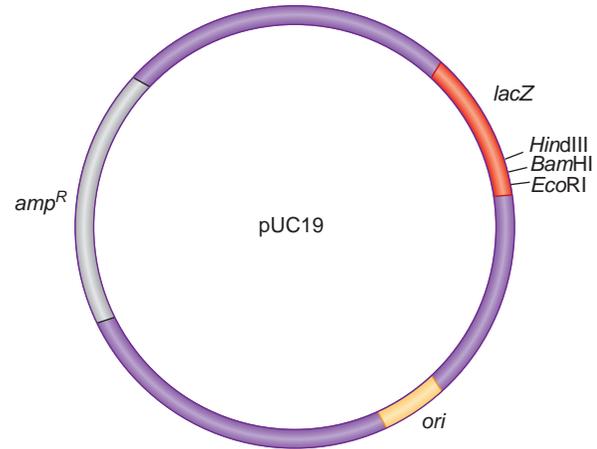


Figura 9.3 Um plasmídeo usado em clonagens. pUC19 é um vetor plasmidial utilizado para clonagem na bactéria *E. coli*. Uma origem de replicação (*ori*) permite que o plasmídeo seja autorreplicativo. Dois genes, um codificando resistência contra o antibiótico ampicilina (*amp*) e o outro codificando a enzima β -galactosidase (*lacZ*), servem de marcadores gênicos. DNA exógeno pode ser inserido nos sítios de clivagem para enzimas de restrição.

P O que é um vetor na engenharia genética?

Como resultado, o processo continua exponencialmente. Todos os reagentes necessários são adicionados em um tubo, que é então colocado em um *termociclador*. O termociclador pode ser ajustado para a temperatura, o tempo e o número de ciclos desejados. O uso de termociclador automatizado é possível devido à utilização da DNA-polimerase retirada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*; a DNA-polimerase desses organismos pode sobreviver à fase do aquecimento sem ser destruída. Trinta ciclos, completados em apenas algumas horas, irão aumentar a quantidade de DNA-alvo em mais de um bilhão de vezes.

O DNA amplificado pode ser visualizado por eletroforese em gel. Na *PCR em tempo real*, o DNA recém-formado é marcado com um corante fluorescente, e assim os níveis de fluorescência podem ser medidos após cada ciclo de PCR (por isso a designação tempo real). Outra modalidade da PCR, denominada *transcrição reversa*, utiliza RNA viral ou mRNA como molde. Nesse caso, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma molécula de DNA a partir do RNA molde, e a seguir o DNA é amplificado.

Observe que a PCR só pode ser usada para amplificar sequências de DNA relativamente pequenas, como determinado pela escolha dos *primers*; não pode ser utilizada para amplificar um genoma inteiro.

A PCR pode ser utilizada em qualquer situação que requeira a amplificação do DNA. A técnica atualmente é uma importante ferramenta para o diagnóstico de agentes infecciosos, podendo ser utilizada especialmente em situações onde tais agentes não são detectados por outras técnicas.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Qual a importância dos seguintes itens na PCR: *primer*, DNA-polimerase, 94°C? **9-7**

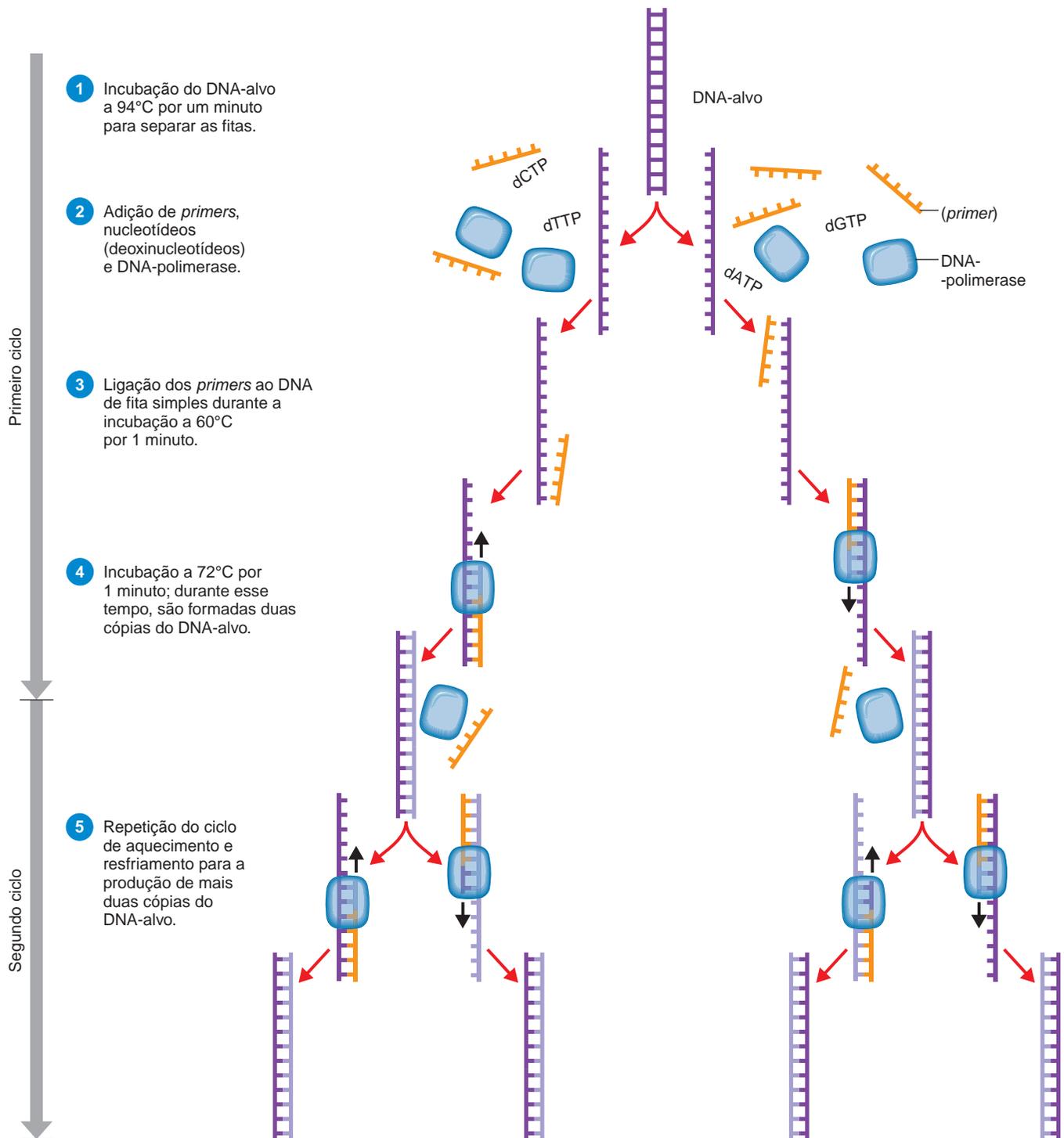


Figura 9.4 A reação em cadeia da polimerase.

P Que enzima promove a síntese de DNA na PCR?

Técnicas de engenharia genética

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 9-8** Descrever cinco maneiras de introduzir DNA em uma célula.
- 9-9** Descrever como uma biblioteca de genes é feita.
- 9-10** Diferenciar cDNA de DNA sintético.
- 9-11** Explicar como cada um dos itens a seguir é utilizado para se obter um clone: gene de resistência a antibióticos, sonda de DNA, produtos gênicos.
- 9-12** Listar uma vantagem na utilização de cada um dos seguintes sistemas na engenharia genética: *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de mamíferos, células de plantas.

Inserção de DNA exógeno nas células

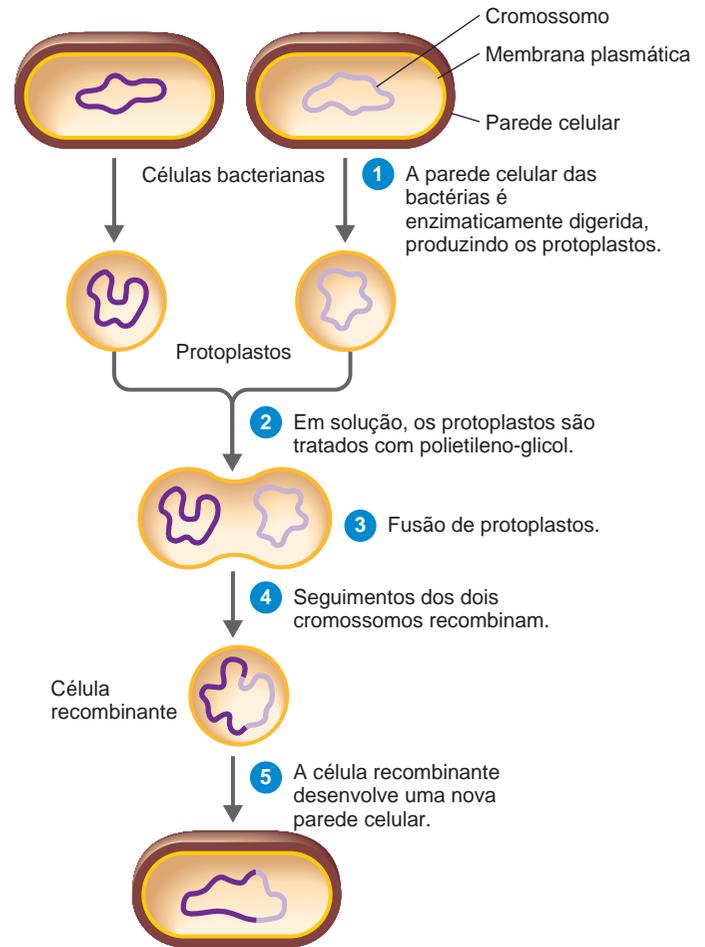
Os métodos para a produção de rDNA exigem que as moléculas de DNA sejam manipuladas fora da célula e depois reintroduzidas em células vivas. Existem várias maneiras de se introduzir DNA em células. O método de escolha geralmente é determinado pelo tipo de vetor e de célula hospedeira que está sendo utilizado.

Na natureza, os plasmídeos geralmente são transferidos entre micróbios de parentesco próximo por contato célula-célula, como na conjugação. Na engenharia genética, um plasmídeo deve ser inserido em uma célula por **transformação**, um processo durante o qual as células podem captar DNA do ambiente circundante (veja o Capítulo 8, página 234). Muitos tipos celulares, incluindo células de *E. coli*, de levedura ou de mamíferos, não são transformados naturalmente; entretanto, tratamentos químicos simples podem tornar esses tipos celulares *competentes*, ou seja, capazes de captar DNA externo. Para *E. coli*, o procedimento para produzir células competentes é a incubação celular em uma solução de cloreto de cálcio por um período breve. Após esse tratamento, as células, já competentes, são misturadas com o DNA clonado e submetidas a um choque térmico moderado. Algumas dessas células irão captar o DNA.

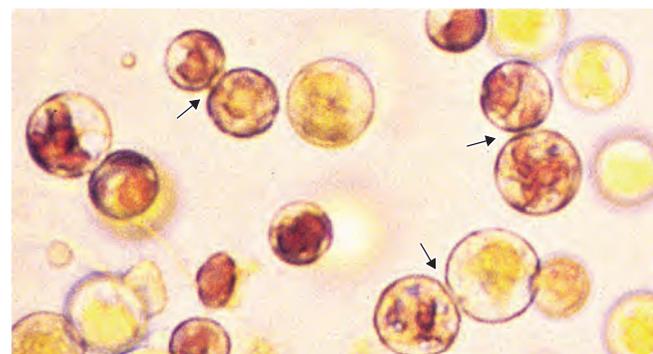
Existem outros meios para transferir DNA para o interior das células. Um processo chamado de **eletroporação** utiliza uma corrente elétrica para formar poros microscópicos nas membranas celulares; o DNA entra nas células através desses poros. A eletroporação geralmente é aplicável a todas as células; aquelas com paredes celulares muitas vezes devem ser convertidas primeiro em protoplastos (veja o Capítulo 4, página 88). Os **protoplastos** são produzidos pela remoção enzimática da parede celular, permitindo assim um acesso mais direto à membrana plasmática.

O processo de **fusão** também tira vantagem das propriedades dos protoplastos. Os protoplastos em solução se fundem com uma frequência baixa, mas significativa; a adição de polietileno-glicol aumenta a frequência de fusão (**Figura 9.5a**). Na nova célula híbrida, o DNA derivado das duas células “parentais” pode sofrer recombinação natural. Esse método é especialmente importante para a manipulação genética de células vegetais e de algas (**Figura 9.5b**).

Um método excelente para a introdução de DNA exógeno em células vegetais é, literalmente, o disparo direto do DNA por meio das espessas paredes de celulose utilizando uma pistola de genes (**Figura 9.6**). As partículas microscópicas de tungstênio ou ouro são



(a) Processo de fusão de protoplastos.



(b) Fusão de protoplastos de células de algas.

Figura 9.5 Fusão de protoplastos. (a) Um diagrama de uma fusão de protoplastos com células bacterianas. (b) Fusão de protoplastos de células de algas. A remoção da parede celular deixa apenas a delicada membrana plasmática envolvendo o conteúdo da célula, o que permite a troca de DNA.

P O que é um protoplasto?

cobertas com DNA e arremessadas pelas paredes de células vegetais por uma explosão de hélio. Algumas das células expressam o DNA introduzido como se fosse delas próprias.



Figura 9.6 Uma pistola de genes, que pode ser usada para inserir “projéteis” revestidos de DNA em uma célula.

P Cite outros quatro métodos de inserir DNA em uma célula.

O DNA pode ser introduzido diretamente em uma célula animal por **microinjeção**. Essa técnica requer o uso de uma micropipeta de vidro com o diâmetro muito menor que a célula. A micropipeta perfura a membrana plasmática e o DNA pode ser introduzido através dela (**Figura 9.7**).

Existe, portanto, uma grande variedade de enzimas de restrição, vetores e métodos para a introdução de DNA em células. Entretanto, o DNA exógeno sobreviverá somente se estiver presente em um vetor autorreplicativo ou se for incorporado em um dos cromossomos da célula por recombinação.

Obtenção do DNA

Vimos como os genes podem ser clonados em vetores com a utilização de enzimas de restrição e como eles podem ser transformados ou transferidos para vários tipos celulares. Mas como os engenheiros genéticos obtêm os genes em que estão interessados? Existem duas fontes principais: (1) bibliotecas de genes contendo cópias naturais ou cópias de cDNA dos genes produzidos a partir do mRNA e (2) DNA sintético.

Bibliotecas de genes

O isolamento de genes específicos na forma de fragmentos individuais de DNA quase nunca é um processo prático. Por isso, os pesquisadores interessados em genes de um determinado organismo começam pela extração do DNA do organismo, que pode ser obtido de células de planta, animal ou micróbio, através da lise celular e da precipitação do DNA. Esse processo resulta em uma “massa” de DNA que inclui o genoma completo do organismo.



Figura 9.7 A microinjeção de DNA exógeno em um óvulo fecundado de camundongo. Inicialmente, o óvulo é imobilizado com o auxílio de uma pipeta de extremidade rombuda, aplicando uma leve sucção (à direita). Várias centenas de cópias do gene de interesse são então injetadas no núcleo da célula, por meio de uma micropipeta de extremidade minúscula (à esquerda).

P Por que a microinjeção não é possível em células bacterianas e fúngicas?

Após o DNA ser digerido pelas enzimas de restrição, os fragmentos de restrição são ligados em vetores plasmidiais ou fágicos, e os vetores recombinantes são introduzidos na célula bacteriana. O objetivo é produzir uma coleção de clones grande o suficiente para assegurar a existência de pelo menos um clone para cada gene do organismo. Essa coleção de clones contendo diferentes fragmentos de DNA é chamada de **biblioteca de genes**; cada “livro” é uma linhagem bacteriana ou de fago que contém um fragmento do genoma (**Figura 9.8**). Essas bibliotecas são essenciais para a manutenção e a recuperação de clones; elas podem até mesmo ser adquiridas comercialmente.

A clonagem de genes de organismos eucarióticos apresenta um problema específico. Os genes de células eucarióticas geralmente contêm **éxons**, segmentos de DNA que codificam proteínas, e **íntrons**, segmentos intergênicos de DNA que não codificam proteínas. Quando o RNA transcrito de um gene como este é convertido em mRNA, os íntrons são removidos (veja a Figura 8.11, página 222). Na clonagem de genes de células eucarióticas, é desejável a utilização de versões dos genes que não possuam íntrons. Isso é necessário porque um gene que inclui íntrons pode ser grande demais para permitir que se trabalhe com ele facilmente. Além disso, se esse gene for colocado em uma célula bacteriana, a bactéria normalmente não será capaz de remover os íntrons do RNA transcrito e, por isso, não será capaz de produzir o produto proteico correto. Entretanto, um gene artificial que contenha apenas éxons pode ser produzido com a utilização de uma enzima chamada de **transcriptase reversa**, que sintetiza **DNA complementar (cDNA)** a partir de um molde de mRNA (**Figura 9.9**). Essa síntese é o inverso do processo de transcrição normal, de DNA para RNA. Uma cópia de DNA é produzida a partir do mRNA pela transcriptase reversa.

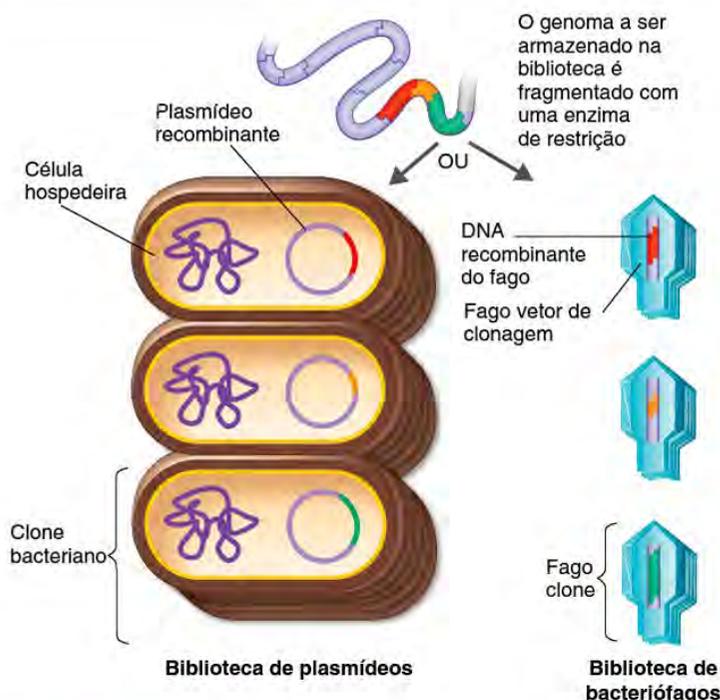


Figura 9.8 Bibliotecas de genes. Cada fragmento de DNA, contendo um gene, é carregado por um vetor, que pode ser um plasmídeo no interior de uma célula bacteriana ou um fago.

P Diferencie uma RFLP de um gene.

A seguir, o RNA é eliminado por digestão enzimática. A DNA-polimerase sintetiza, então, uma fita de DNA complementar, criando um fragmento de DNA de fita dupla que contém a informação do mRNA. As moléculas de cDNA produzidas a partir de uma mistura de todos os mRNAs de um tecido ou tipo celular podem então ser clonadas para formar uma biblioteca de cDNA.

O método do cDNA é o mais comum para a obtenção de genes eucarióticos. Uma das dificuldades deste método é que moléculas de mRNA mais longas podem não ter uma transcrição reversa em DNA completa; a transcrição reversa muitas vezes é abortada, formando apenas partes do gene desejado.

DNA sintético

Em determinadas circunstâncias, os genes podem ser produzidos *in vitro*, com o auxílio de máquinas de síntese de DNA (Figura 9.10). Um teclado da máquina é utilizado para a entrada da sequência de nucleotídeos desejada, de maneira similar à entrada de letras em um processador de textos para a composição de uma frase. Um microprocessador controla a síntese do DNA a partir do suprimento de nucleotídeos armazenados e dos demais reagentes necessários. Cadeias de mais de 120 nucleotídeos podem ser sintetizadas por este método. A não ser que o gene seja muito pequeno, várias cadeias devem ser sintetizadas separadamente e unidas para formar a sua sequência completa.

Obviamente, a dificuldade dessa abordagem é que a sequência do gene deve ser conhecida antes de ser sintetizada. Se o gene ainda não foi isolado, a única maneira de prever a sequência do DNA é a partir da sequência de aminoácidos do seu produto proteico. Se

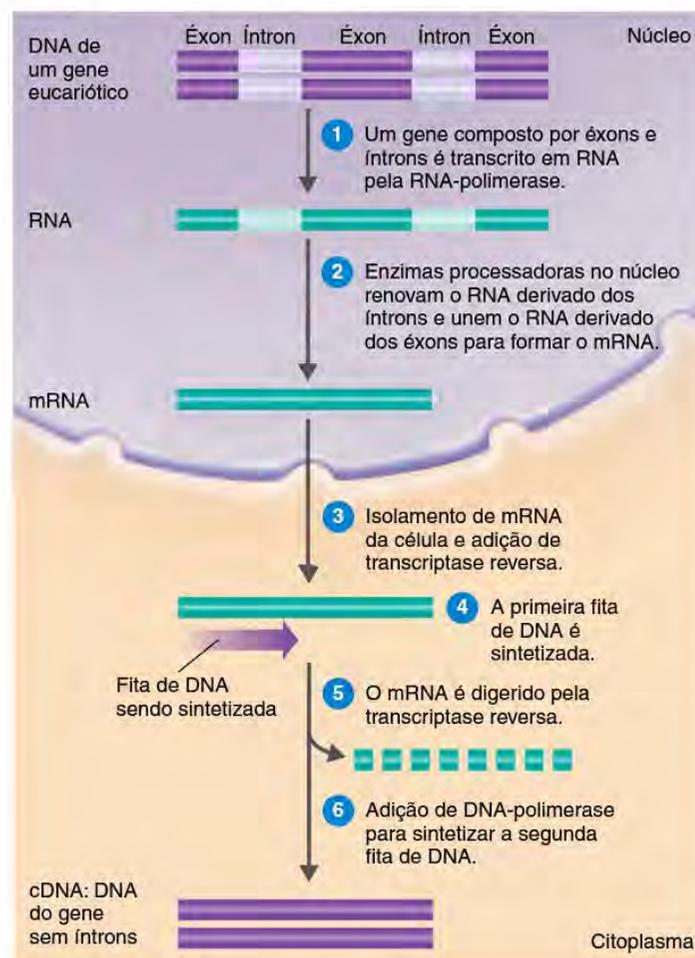


Figura 9.9 Produzindo DNA complementar (cDNA) para um gene eucariótico. A transcriptase reversa catalisa a síntese de DNA de filamento duplo a partir de um molde de RNA.

P Qual a diferença entre transcriptase reversa e DNA-polimerase?

essa sequência de aminoácidos é conhecida, pode-se, em princípio, voltar-se no código genético para se obter a sequência do DNA. Infelizmente, a degeneração do código genético impede uma determinação livre de ambiguidades; assim, se a proteína contém uma leucina, por exemplo, qual dos seis códons existentes para esse aminoácido estaria presente no gene?

Por essas razões é rara a clonagem de um gene a partir da síntese direta, embora alguns produtos comerciais, como a insulina, o interferon e a somatostatina, sejam produzidos a partir de genes sintetizados quimicamente. Sítios de restrição desejados foram acrescentados aos genes sintéticos; então, os genes poderiam ser inseridos nos vetores plasmidiais para a clonagem em *E. coli*. O DNA sintético tem um papel muito mais importante em processos de seleção, como veremos a seguir.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Contraste as cinco maneiras de introduzir DNA dentro de uma célula. **9-8**
- ✓ Qual é a proposta de uma biblioteca de genes? **9-9**
- ✓ Por que não existe cDNA sintético? **9-10**



Figura 9.10 Uma máquina de síntese de DNA. Sequências curtas de DNA podem ser sintetizadas por aparelhos como este.

P Quais são algumas desvantagens de uma máquina de síntese de DNA?

Selecionando um clone

Na clonagem, é necessário selecionar aquela célula que contenha o gene de interesse específico. Isso é difícil, pois, dentre milhões de células, apenas algumas poucas podem conter o gene desejado. Analisaremos um processo típico conhecido como *seleção branca-azul*, nome derivado da cor das colônias bacterianas formadas no final do processo de seleção.

O vetor plasmidial contém um gene (*amp^R*), que codifica resistência ao antibiótico ampicilina. A bactéria hospedeira não será capaz de multiplicar-se no meio de teste, que contém ampicilina, a não ser que o vetor tenha transferido o gene de resistência ao antibiótico. O vetor plasmidial também contém um segundo gene, que codifica a enzima β-galactosidase (*lacZ*). Observe na Figura 9.3 que existem diversos sítios de *lacZ* que podem ser clivados pelas enzimas de restrição.

O procedimento é mostrado na Figura 9.11. Os dois genes, chamados de genes marcadores, são utilizados para que a introdução do DNA plasmidial na bactéria hospedeira possa ser determinada. No processo de seleção branca-azul, uma biblioteca de bactérias é cultivada em um meio denominado X-gal. O meio X-gal contém, além daqueles elementos necessários para o crescimento bacteriano normal, outros dois elementos essenciais. Um é o antibiótico ampicilina, que impede a multiplicação de qualquer bactéria que não tenha recebido o gene de resistência à ampicilina do plasmídeo. O outro, chamado de X-gal, é um substrato para a β-galactosidase.

Somente as bactérias que tenham assimilado o plasmídeo irão se multiplicar – porque elas agora são resistentes à ampicilina. As bactérias que assimilaram o plasmídeo recombinante – no qual o novo gene foi inserido no gene *lacZ* – não irão hidrolisar a lactose e produzirão colônias brancas. Se a bactéria recebeu o plasmídeo original contendo o gene *lacZ* intacto, as células irão hidrolisar X-gal para produzir um composto azul; a colônia será azul.

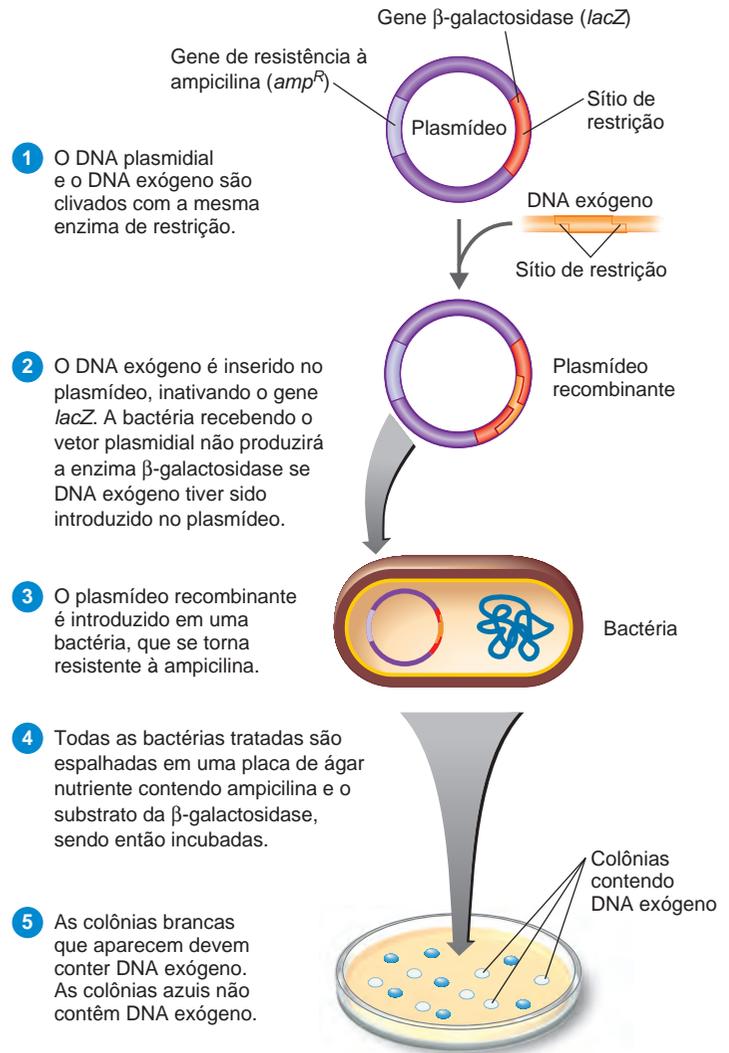


Figura 9.11 Seleção branca-azul, um método de seleção de bactérias recombinantes.

P Por que algumas colônias são azuis e outras brancas?

O que resta para ser feito pode ainda ser difícil. O processo selecionou colônias brancas que sabidamente contêm DNA exógeno, mas ainda não se sabe se o DNA exógeno é o fragmento desejado. É necessário um segundo processo para identificar essas bactérias. Se o DNA exógeno no plasmídeo codifica um produto identificável, é necessário apenas multiplicar o isolado bacteriano em cultura e testá-lo. Entretanto, em alguns casos, o próprio gene deve ser identificado na bactéria hospedeira.

A **hibridização de colônias** é o método comum para a identificação de células portadoras de um gene clonado específico. Nesse método, devem ser sintetizadas **sondas de DNA**, que são segmentos curtos de DNA de fita simples complementares ao gene desejado. Se uma sonda de DNA encontrar uma sequência complementar, ela irá aderir ao gene-alvo. A sonda de DNA é marcada com um elemento radioativo ou um corante fluorescente para que sua presença possa ser determinada. A Figura 9.12

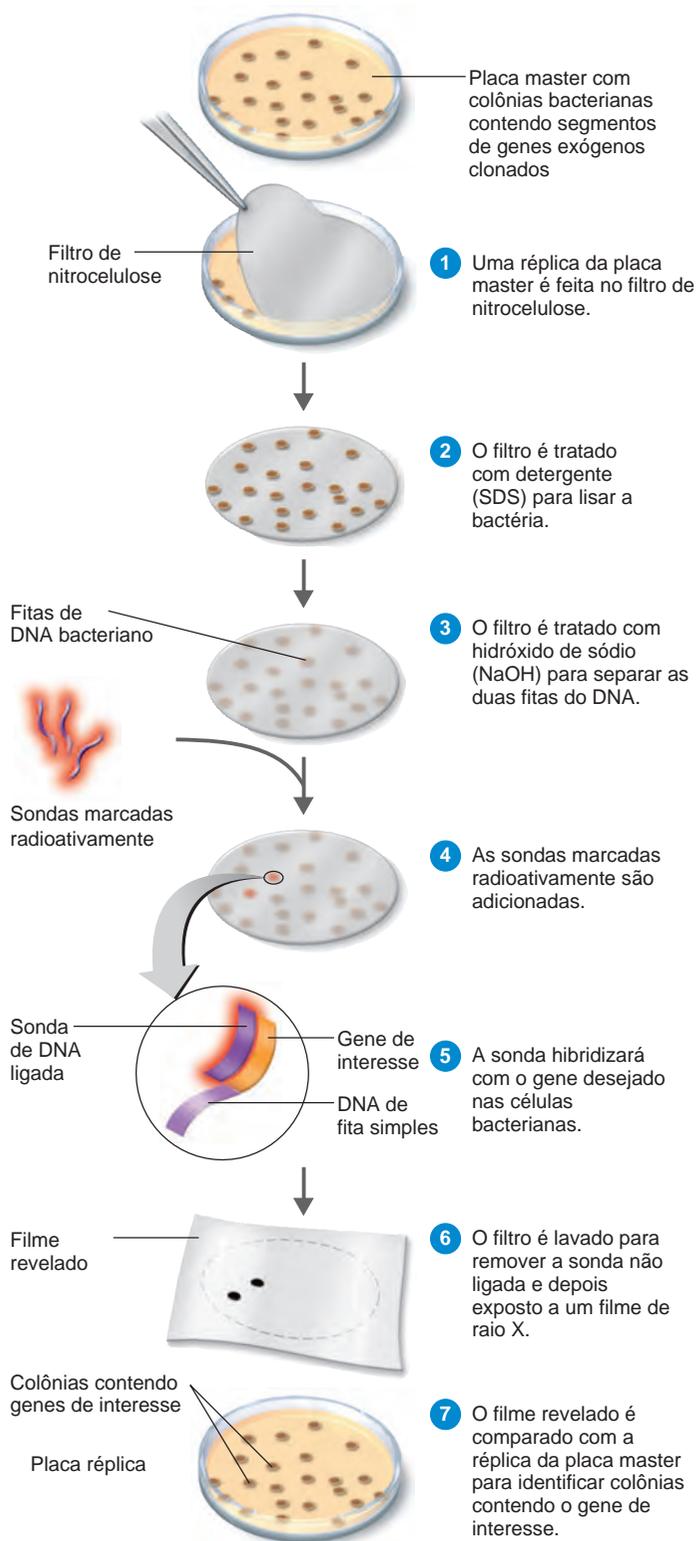


Figura 9.12 Hibridização de colônias: utilizando uma sonda de DNA para identificar uma gene de interesse clonado.

P O que é uma sonda de DNA?

esquematiza um típico experimento de hibridização de colônias. Um arranjo de sonda de DNA posicionadas em um chip pode ser usado para identificar patógenos (veja a Figura 10.17, página 293).

Fazendo um produto gênico

P&R Acabamos de ver como identificar células que carregam um determinado gene. Os produtos gênicos são, muitas vezes, o objetivo da engenharia genética. A maioria dos trabalhos iniciais com engenharia genética utilizou *E. coli* para sintetizar produtos gênicos. A *E. coli* é facilmente cultivada e a sua genética é bastante conhecida pelos pesquisadores. Por exemplo, alguns promotores passíveis de indução, como o do operon *lac*, foram clonados, o que permite que genes também clonados sejam ligados a eles. A síntese de grandes quantidades do produto do gene clonado pode então ser determinada pela adição de um indutor. Esse método foi utilizado para produzir interferon gama em *E. coli* (Figura 9.13). Entretanto, *E. coli* apresenta várias desvantagens. Como outras bactérias gram-negativas, ela produz endotoxinas como parte da camada externa da sua parede celular. Como essas endotoxinas causam febre e choque em animais, a presença acidental delas em produtos destinados ao consumo humano seria um problema grave.

Outra desvantagem da *E. coli* é que ela geralmente não secreta produtos proteicos. Para a obtenção de um produto, as células devem ser rompidas e a proteína em questão deve ser purificada da “sopa” de componentes celulares resultantes. A recuperação de um produto de uma mistura como essa é cara quando feita em escala industrial. É mais econômico utilizar um organismo que secreta o produto, de modo que ele possa ser continuamente recuperado do

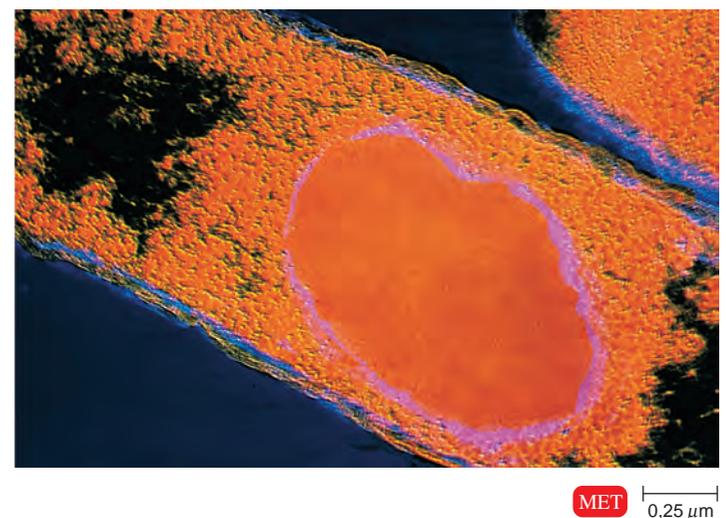


Figura 9.13 *E. coli* geneticamente modificada para produzir interferon gama, uma proteína humana que promove uma resposta imune. O produto, visível aqui como uma substância de cor alaranjada, pode ser liberado pela lise da célula.

P Cite uma vantagem e uma desvantagem da utilização de *E. coli* em engenharia genética.

meio de cultivo. Uma opção é a ligação do produto a uma proteína de *E. coli* naturalmente secretada pela bactéria. Porém, as bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, têm uma probabilidade maior de secretar seus produtos e, por isso, com frequência são preferidas para utilização industrial.

Outro micróbio que vem sendo utilizado como veículo para expressar os genes modificados por engenharia genética é o fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*. O seu genoma é cerca de quatro vezes maior que o de *E. coli* e provavelmente seja o genoma eucariótico mais bem conhecido. Os fermentos, ou leveduras, podem carregar plasmídeos, que são facilmente transferidos para células de leveduras depois que elas tiverem suas paredes celulares removidas. Como células eucarióticas, as leveduras podem ter mais sucesso na expressão de genes eucarióticos exógenos. Além disso, as leveduras têm uma probabilidade maior de secretarem continuamente o produto. Devido a todos esses fatores, as leveduras tornaram-se os organismos eucarióticos de escolha na biotecnologia.

As células de mamíferos em cultura, inclusive as humanas, podem, assim como as bactérias, ser utilizadas em engenharia genética para a produção de proteínas. Os cientistas desenvolveram métodos eficientes para a manutenção de certas células de mamíferos em cultura como hospedeiras para a multiplicação de vírus (veja o Capítulo 13, página 378). Na engenharia genética, as células de mamíferos geralmente são as mais adequadas para a produção de proteínas de uso médico; dentre essas proteínas estão os hormônios, as citocinas (que regulam as células do sistema imune) e o interferon (uma substância antiviral natural, também utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer). A utilização de células de mamíferos para a obtenção de produtos de genes exógenos em uma escala industrial frequentemente exige uma etapa preliminar, a clonagem do gene em uma bactéria. Considere o exemplo do fator estimulador de colônia (CSF, de *colony-stimulating factor*). O CSF é uma proteína produzida naturalmente em quantidades reduzidas pelos glóbulos brancos do sangue. Ele é valioso porque estimula a multiplicação de certas células que protegem contra infecções. Para a produção industrial de grandes quantidades de CSF, o gene é primeiramente inserido em um plasmídeo, que, posteriormente é multiplicado em bactérias (veja a Figura 9.1). Os plasmídeos recombinantes são inseridos em células de mamíferos, que são multiplicadas em frascos.

As células vegetais também podem ser multiplicadas em cultura, alteradas por técnicas de DNA recombinante e então produzidas para gerar plantas modificadas por engenharia genética. Essas plantas podem ser úteis como fontes de produtos valiosos, como os alcaloides vegetais (o anestésico codeína, por exemplo), os isoprenoides que são a base da borracha sintética e a melanina (o pigmento da pele animal) para a utilização em filtros solares. Plantas geneticamente modificadas apresentam muitas vantagens para a produção de agentes terapêuticos humanos, incluindo vacinas e anticorpos. As vantagens desse sistema incluem produção em larga escala e de baixo custo utilizando a agricultura, além de baixo risco de contaminação do produto de interesse por patógenos de mamíferos ou por genes causadores de câncer. O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com frequência requer o uso de uma bactéria. Retornaremos ao tópico de plantas geneticamente modificadas neste capítulo (página 264).

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Como clones recombinantes são identificados? **9-11**
- ✓ Que tipos de células são utilizados para clonagem em engenharia genética? **9-12**

Aplicações da engenharia genética

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 9-13** Listar pelo menos cinco aplicações da engenharia genética.
- 9-14** Definir RNAi.
- 9-15** Discutir o valor do Projeto Genoma Humano.
- 9-16** Definir os seguintes termos: sequenciamento aleatório por *shotgun*, bioinformática, proteômica.
- 9-17** Esquematizar a metodologia do *Southern blotting* e fornecer uma aplicação desta técnica.
- 9-18** Esquematizar a metodologia do *fingerprinting* de DNA e fornecer uma aplicação desta técnica.
- 9-19** Esquematizar a engenharia genética com *Agrobacterium*.

Descrevemos a sequência completa de eventos na clonagem de um gene. Como indicado anteriormente, esses genes clonados podem ser utilizados de diferentes maneiras. Uma delas é na produção de substâncias benéficas de modo mais eficiente e mais barato (veja o quadro no Capítulo 1, página 3). Uma outra é na obtenção de informação do DNA clonado, que é útil para pesquisa básica ou para aplicações médicas. Uma terceira é a utilização de genes clonados para a alteração de características de células ou organismos. O quadro no Capítulo 27 (página 780) descreve o uso de células recombinantes para a detecção de poluentes.

Aplicações terapêuticas

O hormônio insulina, uma pequena proteína produzida pelo pâncreas que controla a absorção de glicose do sangue, é um produto farmacêutico extremamente valioso. Por muito anos, diabéticos dependentes de insulina controlavam sua enfermidade com injeções de insulina obtida de pâncreas de animais abatidos. A obtenção deste hormônio é um processo caro e, além disso, a insulina de animais não é tão eficaz quanto a humana.

Devido ao valor da insulina humana e ao seu pequeno tamanho, a produção desta proteína por técnicas de DNA recombinante foi um dos primeiros objetivos da indústria farmacêutica. Para a produção do hormônio, foram inicialmente construídos genes sintéticos para cada uma das duas cadeias polipeptídicas que constituem a molécula de insulina. O pequeno tamanho dessas cadeias – com apenas 21 ou 30 aminoácidos de extensão – tornou possível o uso de genes sintéticos. Seguindo o procedimento descrito anteriormente, cada um dos genes sintéticos foi inserido em um vetor plasmidial e ligado à extremidade de um gene codificando a enzima β -galactosidase, de modo que o polipeptídeo da insulina era coproduzido com ela. Foram utilizadas duas culturas bacterianas de *E. coli*, cada uma produzindo uma das cadeias polipeptídicas da insulina. Os polipeptídeos eram então recuperados da bactéria, separados da β -galactosidase e unidos quimicamente para produzir a insulina humana. Esse foi um dos primeiros sucessos comerciais

da engenharia genética e ilustra vários dos princípios discutidos neste capítulo.

Outro hormônio humano que agora está sendo produzido comercialmente por meio de manipulação genética da *E. coli* é a somatostatina. Já houve uma época que eram necessários 500 mil cérebros de ovelha para a produção de 5 mg de somatostatina animal para utilização experimental. Em contraste, apenas 8 L de uma cultura de bactérias modificadas por engenharia genética são necessários agora para a obtenção de uma quantidade equivalente do hormônio humano.

As **vacinas de subunidades**, que consistem apenas de parte de uma proteína de um patógeno, estão sendo produzidas por leveduras modificadas por engenharia genética. As vacinas de subunidades têm sido produzidas contra várias doenças, inclusive a hepatite B. Uma das vantagens de uma vacina de subunidades é a inexistência de risco de infecção durante a vacinação. A proteína é obtida de células modificadas por engenharia genética e purificada para a utilização como vacina. Vírus animais, como o vírus vaccínia, podem ser modificados para carregar um gene da proteína de superfície de outro micróbio. Quando injetado, o vírus age como vacina contra esse outro micro-organismo.

Vacinas de DNA geralmente são plasmídeos circulares que possuem um gene codificador de uma proteína viral sob o controle transcricional de uma região promotora, passível de ativação em células humanas. Esses plasmídeos são clonados em bactérias. Vários testes de vacinas contra HIV, SARS, influenza e malária estão em fase de teste. Um tópico sobre vacinas é discutido no Capítulo 18 (página 501). A **Tabela 9.2** lista outros importantes produtos obtidos por engenharia genética aplicados na terapia médica.

A **terapia gênica** pode acabar determinando a cura de algumas doenças genéticas. Já é possível imaginar a remoção de algumas células de um indivíduo e a transformação delas com um gene normal, de modo a substituir um gene defeituoso ou mutado. Quando essas células fossem devolvidas ao indivíduo, elas poderiam funcionar normalmente. Por exemplo, a terapia gênica tem sido usada no tratamento da hemofilia B e de imunodeficiências severas combinadas. Os adenovírus e os retrovírus são utilizados com mais frequência para distribuir os genes. Entretanto, alguns pesquisadores estão trabalhando com vetores plasmidiais. O primeiro tratamento com terapia gênica usado para tratar hemofilia em seres humanos foi feito em 1999. Um retrovírus atenuado foi utilizado como vetor. Diversos experimentos com terapia gênica estão sendo realizados, usando adenovírus manipulado geneticamente carregando o gene humano *p53* para tratar alguns tipos de câncer. O gene *p53*, que codifica uma proteína que reprime tumores, é o gene que sofre mutações com maior frequência nas células cancerosas.

O número de experimentos com terapia gênica irá aumentar à medida que os avanços tecnológicos acontecerem e as tentativas iniciais obtiverem sucesso. No entanto, uma grande quantidade de estudos preliminares ainda precisa ser feita, sendo possível que não se encontre a cura para todas as doenças genéticas. A inserção de DNA antissenso (veja a página 267) nas células também está sendo explorada no tratamento de hepatite, de formas de câncer e de um tipo de doença de artéria coronária.

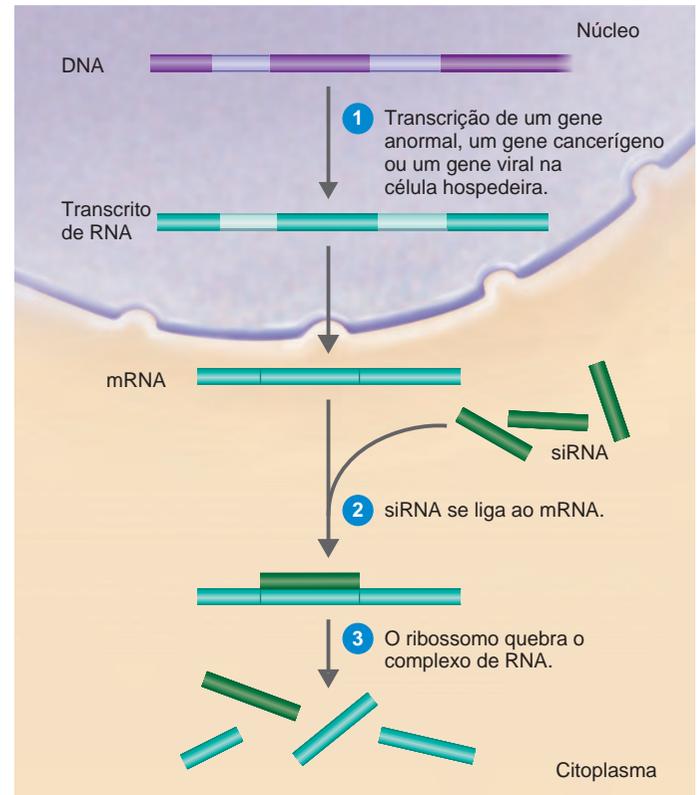


Figura 9.14 O silenciamento gênico poderia fornecer o tratamento de diversas doenças.

P O RNAi atua durante ou após a transcrição?

O **silenciamento gênico** é um processo natural que ocorre na maioria dos organismos e aparentemente representa uma defesa contra vírus e transposons. Uma nova tecnologia, chamada de **RNA interferente (RNAi)**, vem se mostrando promissora para a terapia gênica, no tratamento de cânceres e de infecções virais. RNAs de fita dupla, denominados **pequenos RNAs de interferência (siRNAs, de small interfering RNAs)**, podem ser introduzidos em uma célula (**Figura 9.14**) e direcionados a um gene em particular, como um gene viral, por exemplo. As moléculas de siRNA se ligam ao mRNA, causando sua destruição enzimática, o que *silencia* a expressão de um gene. Em camundongos, a tecnologia do RNAi tem mostrado uma inibição do vírus da hepatite B. As moléculas de siRNA podem ser injetadas diretamente dentro de uma célula ou previamente introduzidas em um vetor de DNA. No segundo caso, um pequeno inserto de DNA, codificador de um siRNA contra um gene de interesse, é clonado dentro de um plasmídeo; quando o vetor com o inserto for transferido para dentro de uma célula, acontecerá a produção do siRNA desejado.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Explique como a engenharia genética pode ser usada para o tratamento e a prevenção de doenças. **9-13**
- ✓ O que é silenciamento gênico? **9-14**

Tabela 9.2 Alguns produtos farmacêuticos da engenharia genética	
Produto	Comentários
Antitripsina	Auxilia pacientes com enfisema; produzida por ovelhas geneticamente alteradas.
Proteínas morfogenéticas ósseas	Induzem a formação de novos ossos; úteis na cura de fraturas e em cirurgias de reconstrução; produzidas em cultura de células de mamíferos.
Vacina contra o câncer cervical	Consiste em proteínas virais produzidas em <i>S. cerevisiae</i> .
Fator estimulador de colônia (CSF)	Contrapõe efeitos de quimioterapia; melhora a resistência contra doenças infecciosas como a Aids; tratamento de leucemia; produzido por <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i> .
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Cura ferimentos, queimadura e úlceras; produzido por <i>E. coli</i> .
Eritropoetina (EPO)	Tratamento de anemia; produzida em cultura de células de mamíferos.
Fator VII	Tratamento de acidentes vasculares; produzido em cultura de células de mamíferos.
Fator VIII	Tratamento de hemofilia; melhora a coagulação; produzido em cultura de células de mamíferos.
Interferon	
IFN-α	Terapia para leucemia, melanoma e hepatite; produzido por <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i> .
IFN-β	Tratamento de esclerose múltipla; produzido em cultura de células de mamíferos.
IFN-γ	Tratamento de inflamações granulomatosas crônicas; produzido por <i>E. coli</i> .
Vacina contra a hepatite B	Produzida por <i>S. cerevisiae</i> que carrega um gene do vírus da hepatite em um plasmídeo.
Hormônio do crescimento humano (hGH)	Corrige deficiências do crescimento em crianças; produzido por <i>E. coli</i> .
Insulina humana	Tratamento do diabetes; melhor tolerada que a insulina extraída de animais; produzida por <i>E. coli</i> .
Vacina contra a gripe	Vacina experimental produzida por <i>E. coli</i> ou <i>S. cerevisiae</i> carregando os genes do vírus.
Interleucinas	Regulam o sistema imune; possível tratamento para câncer; produzidas por <i>E. coli</i> .
Anticorpos monoclonais	Possível tratamento para câncer e rejeição de transplantes; utilizados em testes diagnósticos; produzidos por cultura de células de mamíferos (a partir da fusão de uma célula cancerosa com uma célula produtora de anticorpos).
Ortoclone (OKT3)	Anticorpo monoclonal utilizado em pacientes submetidos a transplante, para auxiliar na supressão do sistema imune, reduzindo a chance de rejeição do tecido transplantado; produzido por células de camundongos.
Pró-uroquinase	Anticoagulante; tratamento de ataques cardíacos; produzido por <i>E. coli</i> e levedura.
Pulmozina (rhDNAse)	Enzima utilizada na degradação de secreções mucosas em pacientes com fibrose cística; produzida em cultura de células de mamíferos.
Relaxina	Utilizada para facilitar o parto; produzida em <i>E. coli</i> .
Superóxido-dismutase (SOD)	Minimiza os danos causados por radicais de oxigênio livres quando o sangue é fornecido novamente a tecidos privados de oxigênio; produzida por <i>S. cerevisiae</i> e <i>Komagataella pastoris</i> (levedura).
Taxol	Produto vegetal utilizado no tratamento do câncer de ovário; produzido por <i>E. coli</i> .
Ativador do plasminogênio tissular (activase)	Dissolve a fibrina de coágulos sanguíneos; terapia de ataques cardíacos; produzido em cultura de células de mamíferos.
Fator de necrose tumoral (TNF)	Causa a desintegração de células tumorais; produzido por <i>E. coli</i> .

O Projeto Genoma Humano

O Projeto Genoma Humano, um projeto internacional que durou 13 anos, iniciado oficialmente em 1990 e finalizado em 2003, envolve muitas das novas tecnologias disponíveis. O objetivo desse projeto foi sequenciar o genoma humano completo, o que corresponde a aproximadamente 3 bilhões de pares de nucleotídeos, compreendendo entre 20 e 25 mil genes. Milhares de pessoas em 18 países participaram desse projeto. Os pesquisadores coletaram amostras de sangue (mulheres) ou de esperma (homens) de um grande número de doadores. Somente algumas amostras foram processadas como fontes de DNA, e os nomes dos doadores foram protegidos. Dessa forma, nem os próprios doadores nem os cientistas sabem quais amostras foram usadas. O desenvolvimento do sequenciamento *shotgun* (brevemente discutido) acelerou bastante o processo, e o genoma está quase completamente sequenciado.

Uma surpresa encontrada foi que menos de 2% do genoma humano codificam produtos funcionais – os outros 98% estão sendo chamados de “DNA lixo”, onde estão incluídos íntrons, as extremidades dos cromossomos (chamados de *telômeros*) e os transposons (sequências repetitivas que constituem mais da metade do genoma humano; veja o Capítulo 8, página 240). No momento, os cientistas estão mapeando genes específicos e determinando suas funções.

O próximo objetivo dos pesquisadores é o Projeto Proteoma Humano, no qual irão mapear todas as proteínas expressas pelas células humanas. No entanto, antes mesmo de ficar pronto, o projeto fornecerá dados de grande importância para a nossa compreensão da Biologia. Ele também será muito importante para a medicina, especialmente no diagnóstico e no tratamento de doenças genéticas.

Aplicações científicas

A tecnologia do DNA recombinante pode ser utilizada na obtenção de produtos, mas essa não é a única aplicação importante. Graças à sua capacidade de produzir muitas cópias de DNA, ela pode funcionar como uma espécie de “gráfica para imprimir DNA”. Após uma grande quantidade de um determinado segmento de DNA estar disponível, várias técnicas analíticas, discutidas nesta seção, podem ser utilizadas na “leitura” da informação contida no DNA.

Que tipo de informação pode ser obtido a partir do DNA clonado? Um tipo de informação é obtido através do processo de **sequenciamento de DNA** – a determinação da sequência exata de bases nucleotídicas no DNA.

Uma técnica de sequenciamento do genoma é o **sequenciamento aleatório por *shotgun***. Pequenos fragmentos de um genoma são sequenciados, e as sequências são então montadas com o uso de um computador. Quaisquer lacunas entre os fragmentos precisam ser encontradas e sequenciadas (Figura 9.15). As sequências para os genomas virais completos agora são relativamente fáceis de obter. Os genomas da levedura *S. cerevisiae*, da *E. coli* e de mais outros 70 micróbios foram mapeados; outros 100 estão em progresso. O Projeto Genoma Humano foi um empreendimento massivo resultando no sequenciamento do genoma humano. Os mapas divulgados estão entre 70 e 99% completos, com algumas lacunas ainda a serem preenchidas. A maioria das lacunas são sequências repetidas que não codificam nenhum gene. Por exemplo, para completar o genoma de *S. cerevisiae* faltam somente 7%, mas as regiões codificadoras de genes estão 100% completas. Programas computacionais podem ser usados para procurar regiões codificadoras de proteínas, que podem então ser “traduzidas” por outros programas.

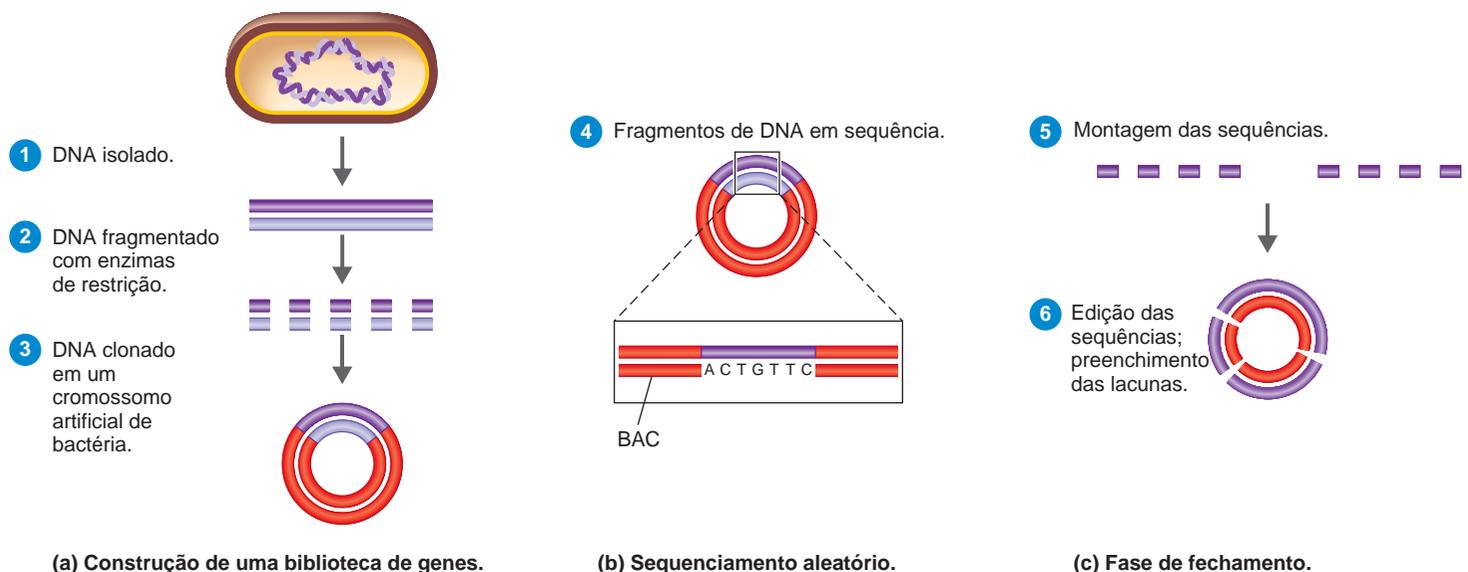


Figura 9.15 Sequenciamento aleatório por *shotgun*. Nessa técnica, um genoma é partido em fragmentos, e cada fragmento é sequenciado; depois, os fragmentos são encaixados. Pode haver algumas lacunas se um fragmento específico de DNA não tiver sido sequenciado.

P Esta técnica identifica genes e suas localizações?

O sequenciamento de DNA produziu uma quantidade enorme de informações que acabou gerando o novo campo da **bioinformática**, a ciência que busca entender o funcionamento dos genes por meio de análises computadorizadas. As sequências de DNA são armazenadas em um banco de dados em rede, chamado de *GenBank*. Informações genômicas podem ser pesquisadas em busca de padrões semelhantes nos genomas de organismos diferentes. Genes microbianos estão sendo pesquisados agora para identificar moléculas que sejam os fatores de virulência dos patógenos. Ao comparar os genomas de *Chlamidia trachomatis* e de *Clostridium difficile*, os pesquisadores descobriram que ambos produzem uma toxina semelhante.

O próximo objetivo é identificar as proteínas codificadas por esses genes. A **proteômica** é a ciência que determina todas as proteínas expressas em uma célula.

A **genética reversa** é uma abordagem utilizada para descobrir a função de um gene com base em sua sequência. A genética reversa tenta estabelecer uma conexão entre uma determinada sequência gênica e os efeitos específicos em um organismo. Por exemplo, se você mutar ou bloquear um gene de um organismo (veja a discussão sobre silenciamento gênico na página 259), você deve procurar por uma característica perdida por este organismo.

Um exemplo de aplicação do sequenciamento do DNA humano foi a identificação e a clonagem do gene mutante que causa a fibrose cística (FC). A FC é caracterizada pela supersecreção de muco, que leva ao bloqueio das vias respiratórias. A sequência do gene mutado pode ser utilizada como um instrumento de diagnóstico em uma técnica de hibridização denominada **Southern blotting** (Figura 9.16), chamada assim por causa de Ed Southern, que desenvolveu a técnica em 1975.

Nessa técnica,

- 1 O DNA humano é inicialmente digerido com um enzima de restrição, gerando milhares de fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos diferentes são separados por **eletroforese em gel**.
- 2 Os fragmentos são colocados em uma canaleta, na extremidade de uma camada de gel de agarose. Uma corrente elétrica é então passada através do gel. Enquanto a carga é aplicada, os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos migram através do gel com diferentes velocidades. Os fragmentos são chamados de **polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs, de restriction fragment length polymorphisms)**.
- 3 – 4 Os fragmentos separados são transferidos para um filtro por absorção (*blotting*).
- 5 Os fragmentos no filtro são então expostos a uma sonda radioativa produzida a partir do gene de interesse clonado, nesse caso, o gene da FC. A sonda se hibridizará com esse gene mutante, mas não com o gene normal.
- 6 Os fragmentos aos quais a sonda se liga são identificados por meio da exposição do filtro a um filme de raios X. Com esse método, o DNA de qualquer pessoa pode ser testado para a verificação da presença ou não do gene mutado.

Esse processo, chamado de **triagem genética**, pode agora ser utilizado para diagnosticar várias centenas de doenças genéticas. Esses procedimentos de triagem podem ser realizados em futuros pais e também em tecido fetal. Dentre os genes mais comumente testa-

dos dessa maneira estão aqueles associados à forma hereditária do câncer de mama e o gene responsável pela doença de Huntington.

Microbiologia forense

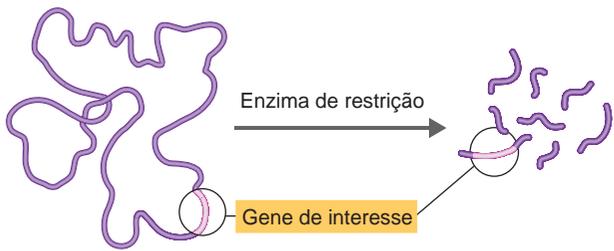
Várias ferramentas de diagnóstico hoje disponíveis são resultado da engenharia genética e muitas delas são baseadas na técnica de hibridização. Lembre-se de que esse processo possibilita a identificação de uma determinada sequência de DNA em meio a muitas outras. Isso é exatamente o que é necessário na maioria das situações diagnósticas – a identificação de um determinado patógeno em meio a muitos outros.

As sondas de DNA como as utilizadas na seleção de clones em bibliotecas de genes são instrumentos promissores para a rápida identificação de micro-organismos. Para a utilização em diagnóstico médico, essas sondas são produzidas a partir do DNA de um micróbio patogênico e marcadas (com um marcador radioativo, por exemplo). A sonda pode então ser utilizada para diagnóstico, combinando-se com o DNA do patógeno para revelar a sua localização em tecido corporal (ou talvez a sua presença em alimentos). As sondas também estão sendo utilizadas em algumas aplicações não relacionadas com a medicina – por exemplo, na localização e na identificação de micróbios no solo. PCR e sonda de DNA serão objeto de uma discussão mais aprofundada no Capítulo 10.

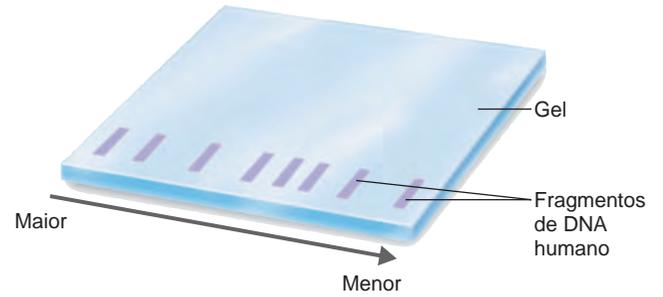
Por muitos anos, os microbiologistas vêm utilizando os RFLPs em um método de identificação conhecido como **DNA fingerprinting** (“impressão digital de DNA”) para identificar patógenos virais e bacterianos (Figura 9.17). A técnica do *DNA fingerprinting* também é usada em medicina forense para determinar paternidade ou provar se o sangue nas roupas de uma pessoa suspeita de cometer assassinato veio da vítima. O *Southern blotting* exige uma quantidade substancial de DNA. Como mencionado anteriormente, pequenas amostras de DNA podem ser rapidamente amplificadas por PCR, até que haja o suficiente para que a análise seja feita.

Chips de DNA (veja a Figura 10.17, página 293) e *microarrays de PCR* estão sendo desenvolvidos e poderão ser utilizados na detecção de vários patógenos simultaneamente em uma amostra. Em um microarray de PCR, mais de 22 *primers* específicos para diferentes micro-organismos podem ser usados na reação. O micro-organismo é identificado se um fragmento de seu DNA for amplificado por algum dos *primers*.

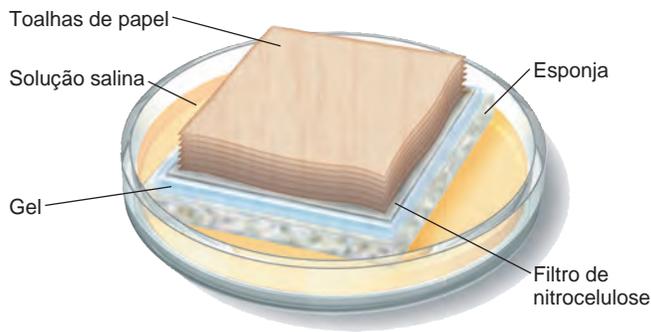
A genômica de patógenos vem se tornando a principal forma de monitoramento, prevenção e controle de doenças infecciosas. O uso da genômica na investigação de um surto de uma doença está descrito na página 266. O novo campo da **microbiologia forense** se desenvolveu porque hospitais e fabricantes de alimentos podem ser acionados judicialmente e porque micro-organismos podem ser utilizados como armas biológicas. A responsabilidade de provar judicialmente a origem de um micro-organismo é da comunidade médica. Por exemplo, para provar que um indivíduo teve a intenção de cometer uma infração, é necessário que haja a coleta e a proteção de evidências, e no contexto da microbiologia forense, a comunidade médica é que exerce tal função. Propriedades microbiológicas que apresentam pouca importância em saúde pública podem ser essenciais para as investigações forenses. A Academia Americana de Microbiologia propôs recentemente o reconhecimento legal do profissional especialista em microbiologia forense.



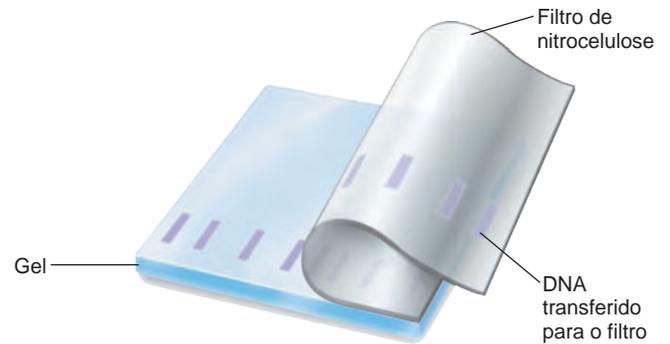
1 O DNA contendo o gene de interesse é extraído de células humanas e clivado em fragmentos por enzimas de restrição.



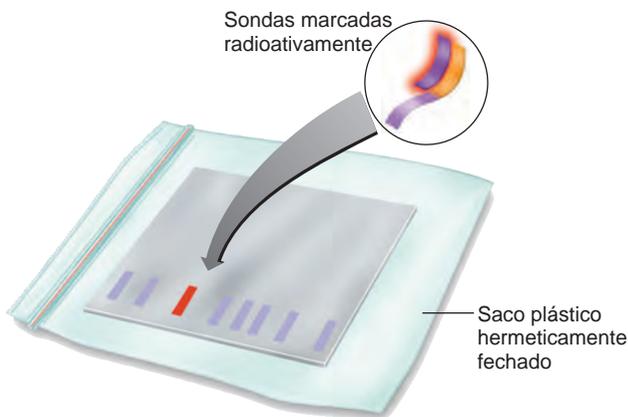
2 Os fragmentos são separados de acordo com o tamanho por eletroforese em gel. Cada banda consiste de muitas cópias de um determinado fragmento de DNA. As bandas são invisíveis, mas podem se tornar visíveis por coloração.



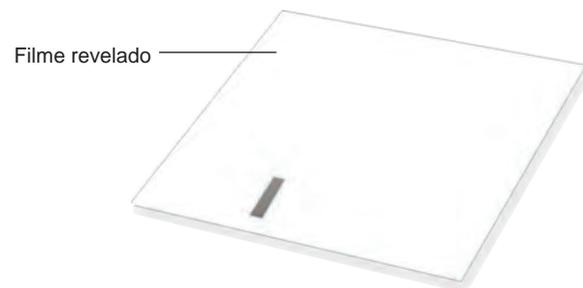
3 As bandas de DNA são transferidas para um filtro de nitrocelulose por absorção. A solução passa através do gel e do filtro para toalhas de papel.



4 Isso produz um filtro de nitrocelulose com fragmentos de DNA posicionados exatamente como no gel.



5 O filtro é exposto a uma sonda radioativamente marcada específica para um gene. A sonda irá parear suas bases (hibridizar) com uma sequência curta presente no gene.



6 O filtro é exposto a um filme de raios X. O fragmento contendo o gene de interesse é identificado por uma banda no filme revelado.

Figura 9.16 Southern blotting.

P Qual o objetivo do Southern blotting?

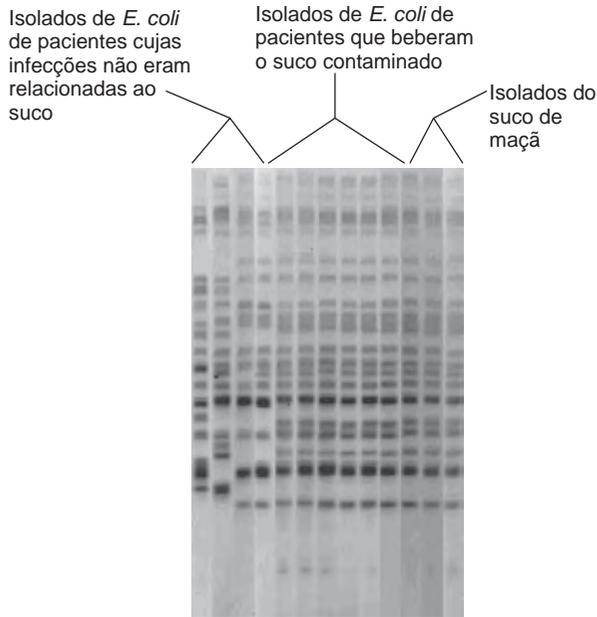


Figura 9.17 *DNA fingerprinting* usado para rastrear uma doença infecciosa. Esta figura mostra a relação entre padrões de DNA de isolados bacterianos de uma epidemia de *Escherichia coli* O157:H7. Os isolados do suco de maçã são idênticos aos padrões dos isolados dos pacientes que beberam o suco contaminado, mas diferentes daqueles dos pacientes cujas infecções não eram relacionadas ao suco. (CDC)

P O que é microbiologia forense?

O DNA com frequência pode ser extraído de fósseis preservados, incluindo múmias e plantas e animais extintos. Embora esse material seja raro muitas vezes esteja parcialmente degradado, a PCR permite que os pesquisadores estudem esse material genético que há muitos anos já não existe em sua forma natural.

Nanotecnologia

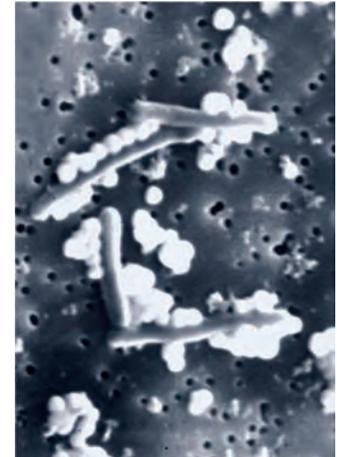
A **nanotecnologia** é a ciência relacionada com o design e o desenvolvimento de circuitos eletrônicos extremamente pequenos e aparatos mecânicos construídos ao nível molecular da matéria. Computadores e robôs do tamanho de moléculas podem ser usados na detecção de contaminação alimentar, doenças em plantas ou armas biológicas. Entretanto, essas pequenas máquinas (1 nanômetro equivale a 10^{-9} metros; 1.000 nm cabem em 1 μm) necessitam de peças e fios extremamente pequenos. As bactérias podem fornecer os pequenos pedaços de metal necessários. Pesquisadores da Associação Norte-Americana de Investigações Geológicas têm cultivado várias bactérias anaeróbicas capazes de reduzir o selênio tóxico, Se^{4+} , em selênio elementar (Se^0) não tóxico, estruturado em nanosferas (**Figura 9.18**).

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Como os seguintes itens estão relacionados com o Projeto Genoma Humano: sequenciamento por *shotgun*, bioinformática e proteômica? **9-16**

Figura 9.18 Células de *Bacillus* crescendo e formando cadeias de selênio elementar.

P O que a bactéria pode fornecer para a biotecnologia?



MEV | 1 μm

- ✓ O que é *Southern blotting*? **9-17**

- ✓ Por que os RFLPS resultam em um *DNA Fingerprinting*? **9-18**

Aplicações na agricultura

O processo de seleção de plantas geneticamente desejáveis sempre foi muito demorado. A realização de cruzamentos convencionais entre vegetais é trabalhosa e envolve a espera pela germinação da semente plantada e pela maturação da planta. O cruzamento e a produção de plantas foram revolucionados pelo uso de células vegetais multiplicadas em cultura. Clones de células vegetais, incluindo células que foram geneticamente alteradas por técnicas de DNA recombinante, podem ser multiplicados em grande número. Essas células podem então ser induzidas a regenerarem plantas completas, a partir das quais podem ser produzidas sementes.

O DNA recombinante pode ser introduzido em células de vegetais de diversas maneiras. Anteriormente, mencionamos a fusão de protoplastos e o uso de “projéteis” revestidos com DNA. O método mais elegante, contudo, faz uso de um plasmídeo, denominado **plasmídeo Ti** (*Ti* é a abreviatura de *tumor-inducing*, ou indutor de tumor), que ocorre naturalmente na bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria infecta certas plantas, nas quais o plasmídeo causa a formação de um crescimento tumoral chamado de galha da coroa (**Figura 9.19**). Uma parte do plasmídeo Ti, chamada de T-DNA, estimula a multiplicação celular local (a galha da coroa) e, simultaneamente, leva à produção de certos compostos utilizados pela bactéria como uma fonte nutricional de carbono e nitrogênio.

Para os cientistas que trabalham com vegetais, o plasmídeo Ti é interessante por servir como veículo para a introdução de DNA modificado geneticamente em uma planta (**Figura 9.20**). Um cientista pode inserir genes exógenos no T-DNA, reintroduzir o plasmídeo recombinante em uma célula de *Agrobacterium* e utilizar a bactéria para inserir o plasmídeo Ti recombinante em uma célula vegetal. A célula vegetal com o gene exógeno pode então ser utiliza-

da para gerar uma nova planta. Com sorte, a nova planta expressará o gene exógeno. Infelizmente, *Agrobacterium* não infecta gramíneas naturalmente, de modo que não pode ser utilizado no melhoramento de cereais como trigo, arroz e milho.

Realizações importantes obtidas com essa abordagem foram a introdução em plantas da resistência ao herbicida glifosato e a toxina (Bt) derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis* que funciona como inseticida. Normalmente, o herbicida mata tanto ervas daninhas como plantas úteis, inibindo uma enzima necessária para a produção de certos aminoácidos essenciais. A bactéria *Salmonella* possui enzimas, e algumas salmonelas possuem uma enzima mutante que é resistente ao herbicida. Quando o DNA para a enzima é introduzido em uma planta cultivada, ela se torna resistente ao herbicida, que então mata apenas as ervas daninhas. Existem agora várias plantas em que a resistência a diferentes herbicidas e pesticidas foi introduzida por engenharia genética. A resistência à seca, a infecções virais e a vários outros estresses ambientais também pode ser introduzida em plantas modificadas por engenharia genética. As bactérias *Bacillus thuringiensis* são patogênicas para alguns insetos, pois produzem uma proteína chamada de toxina Bt que interfere com o trato digestório do inseto. O gene da Bt foi inserido em diversas variedades de plantas, inclusive algodão e batata, e consequentemente o inseto que comer essas plantas irá morrer.



Figura 9.19 Galha da coroa em uma roseira. O crescimento tumoral é estimulado por um gene do plasmídeo Ti que está presente na bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, que infectou a planta.

P Quais são algumas das aplicações agrícolas da engenharia genética?

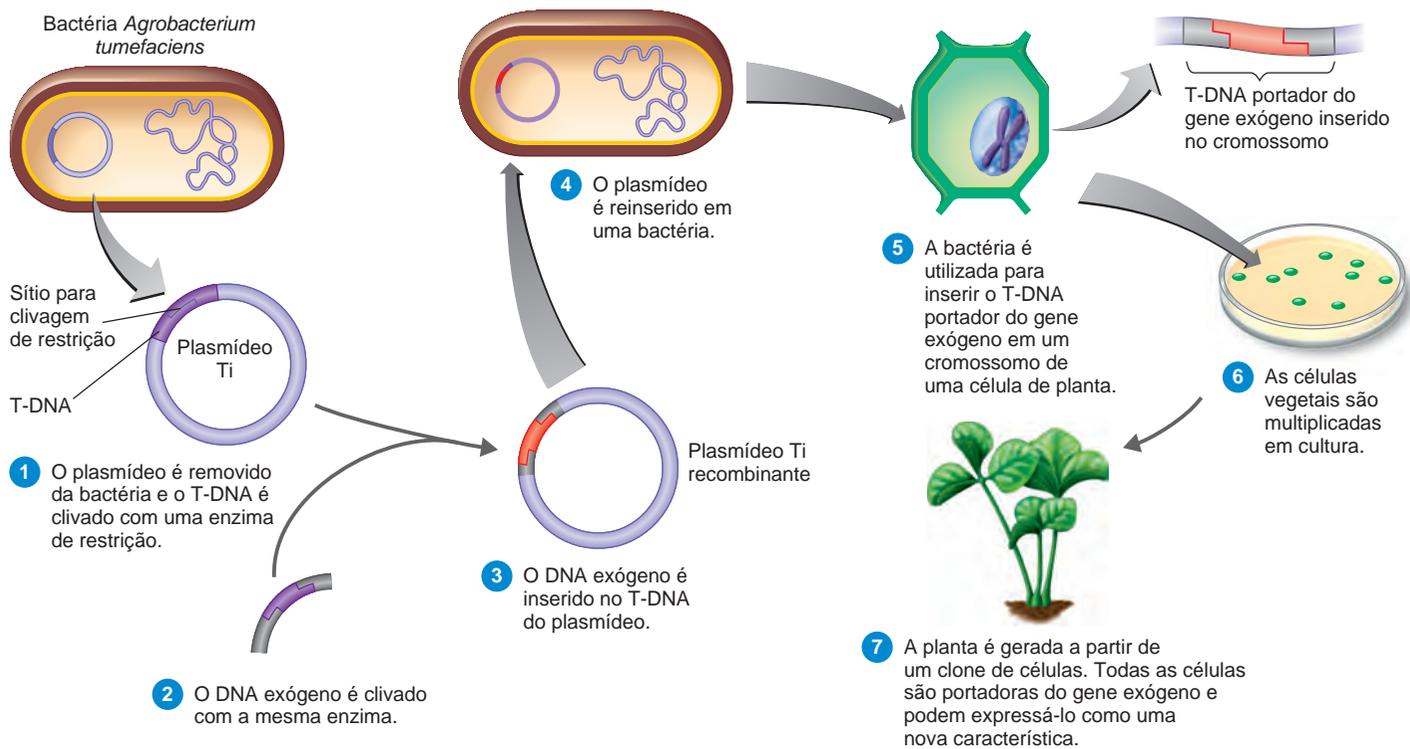


Figura 9.20 Utilizando o plasmídeo Ti como um vetor para a modificação genética de plantas.

P Por que o plasmídeo Ti é importante para a biotecnologia?



Norovírus – quem é o responsável pelo surto?

Neste quadro você encontrará uma série de questões que os microbiologistas se perguntam quando investigam o surto de uma doença. A convocação de microbiologistas como experts em cortes de justiça dependerá do modo que a investigação será conduzida. Tente responder cada questão antes de passar à próxima.

1. No dia 7 de maio, o Departamento de Saúde da cidade de Kent (Michigan) foi notificado a respeito de um surto de gastroenterite que acometeu 115 pessoas. Foram relatados vômito, diarreia e febre, cólicas ou náuseas.

O que você precisa saber?

2. Dentre os doentes estão 23 funcionários de uma escola, 55 funcionários de uma empresa de publicidade, 9 funcionários de uma organização que presta serviços sociais, além de outras 28 pessoas (veja a **Figura A**).

Qual é o próximo passo?

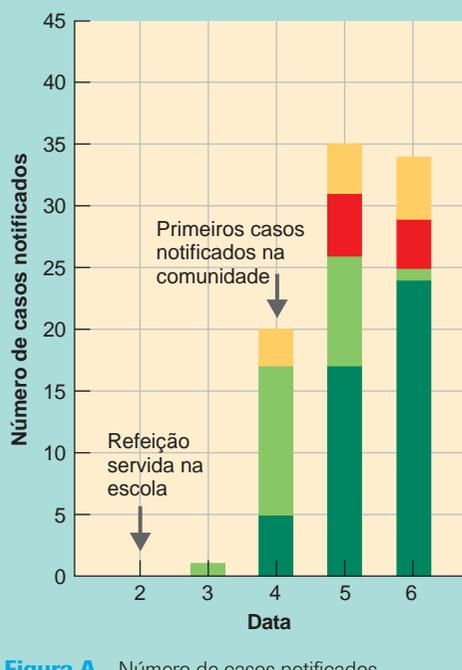


Figura A Número de casos notificados.

3. No dia 2 de maio, foram servidos aos funcionários da escola sanduíches fornecidos por uma rede nacional de restaurantes. No dia 3 de maio, os funcionários da empresa publicitária e da companhia de serviço social foram servidos pelo mesmo restaurante. As demais 28 pessoas também comeram sanduíches no mesmo restaurante.

O que você precisa saber?

4. Ao todo, 16 ingredientes utilizados pelo restaurante foram analisados. Os resultados indicaram que o consumo de alface foi significativamente associado à doença.

O que você deveria saber?

5. Transcrição reversa-PCR (RT-PCR), utilizando *primers* específicos para norovírus, foi feita a partir das fezes dos pacientes.

O que você pode concluir?

6. A RT-PCR confirmou a infecção por norovírus. Análises das sequências nucleotídicas de 21 amostras demonstraram 100% de identidade entre essas amostras.

O que você precisa saber?

7. Os investigadores descobriram que um dos funcionários do restaurante, que manipula diretamente os alimentos, apresentou vômito e diarreia no dia 1º de maio. Esse funcionário acredita que contraiu a doença de seu filho. As investigações apontaram que a criança adquiriu a doença de um primo, que foi exposto ao norovírus em uma creche. O sintoma de vômito do funcionário do restaurante terminou no início da manhã do

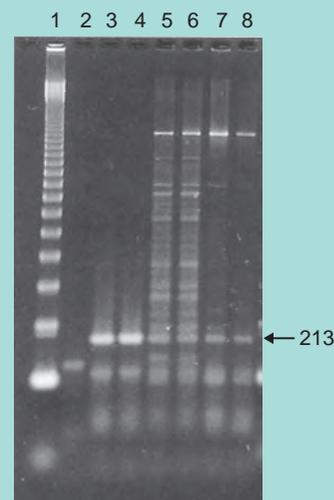


Figura B Resultados da RT-PCR de amostras dos pacientes. Canaleta 1, marcador de tamanho molecular. Canaleta 2, controle negativo da RT-PCR. Canaletas de 3 a 8, amostras dos pacientes. O norovírus é identificado pela banda de DNA de 213 pb.

dia 2 de maio, e ele retornou ao trabalho no final daquela manhã.

O que você deve observar agora?

8. As sequências nucleotídicas da amostra de norovírus detectada no funcionário foram idênticas às obtidas de oito fregueses do restaurante.

O que você observa agora?

9. A alface era picada toda manhã pelo funcionário que apresentou os sintomas. As investigações revelaram que a pia utilizada para o processamento de alimentos estava sendo usada para a higienização das mãos. A pia não foi desinfetada antes e depois que a alface foi lavada. O restaurante foi fechado por cerca de uma semana pelo departamento de saúde, pois não estava sendo apropriadamente higienizado.

Fonte: Adaptado de *MMWR* 55(14): 395-397; 14 de abril de 2006.

Tabela 9.3 Alguns produtos de engenharia genética importantes para a agricultura e para a pecuária

Produto	Comentários
Produtos para a agricultura	
Algodão Bt e milho Bt	Plantas que possuem o gene produtor de toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> ; a toxina mata os insetos que se alimentam das plantas
Tomates MacGregor	O gene antissenso bloqueia a degradação da pectina, dando uma maior duração para as frutas nas prateleiras dos supermercados
Bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Possui o gene produtor da toxina <i>B. thuringiensis</i> , patógeno de insetos; a toxina mata os insetos que se alimentam de raízes quando eles ingerem a bactéria
<i>Pseudomonas syringae</i> , bactéria gelo-menos	Não produz uma proteína que normalmente inicia a formação indesejável de gelo em plantas
Bactéria <i>Rhizobium meliloti</i>	Modificada para aumentar a sua capacidade de fixar nitrogênio
Lavouras resistentes a <i>Round-up</i> (glifosato)	Plantas que possuem o gene bacteriano; permite o uso do herbicida em ervas daninhas sem dano para as plantas cultivadas
Produtos para a pecuária	
Hormônio do crescimento bovino (bGH)	Aumenta o ganho de peso e a produção de leite em bovinos; produzido em <i>E. coli</i>
Hormônio do crescimento suíno (pGH)	Aumenta o ganho de peso em suínos; produzido em <i>E. coli</i>
Animais transgênicos	Animais alterados geneticamente para produzirem proteínas com propriedades médicas no leite
Outras proteínas para a produção de alimentos	
Celulase	Enzimas que degradam celulose para a produção de estoques de alimentos para animais; produzida em <i>E. coli</i>
Renina	Causa a formação de coalhos em laticínios; produzida por <i>Aspergillus niger</i>

Outro exemplo envolve uma marca norte-americana de tomates alterados geneticamente (MacGregor), que permanece firme após a colheita, porque o gene para a poligalacturonase (PG), a enzima que degrada pectina, é suprimido. A supressão foi obtida pela **tecnologia do DNA antissenso**. Primeiro, um pedaço do DNA complementar do mRNA da PG é sintetizado. Esse DNA antissenso é absorvido pela célula e se liga ao mRNA para inibir a tradução. O híbrido DNA-RNA é degradado pelas enzimas celulares, liberando o DNA antissenso para incapacitar outros mRNAs.

Talvez a utilidade potencial mais promissora da engenharia genética de vegetais diga respeito à fixação de nitrogênio, a capacidade de converter o nitrogênio gasoso do ar em compostos que podem ser utilizados por células vivas (veja a página 771). A disponibilidade desses nutrientes que contêm nitrogênio geralmente é o principal fator limitante do crescimento de uma planta cultivada. Entretanto, na natureza, somente algumas bactérias possuem genes que realizam esse processo. Algumas plantas, como a alfafa, são beneficiadas por uma relação simbiótica com esses micróbios. Espécies da bactéria simbiótica *Rhizobium* já foram modificadas geneticamente para aumentar a sua capacidade de fixação de nitrogênio. No futuro, poderão ser desenvolvidas linhagens de *Rhizobium* capazes de colonizar plantas cultivadas como milho e trigo, possivelmente eliminando a exigência da utilização de fertilizantes nitrogenados. O objetivo final seria a introdução de genes de fixação de nitrogênio funcionais diretamente nas plantas. Embora esse objetivo ainda não possa ser atingido com o nosso conhecimento atual, o trabalho nesse sentido continuará, devido ao seu potencial

para aumentar consideravelmente o suprimento de alimentos em nível mundial.

Um exemplo de uma bactéria modificada por engenharia genética que agora está sendo utilizada na agricultura é *Pseudomonas fluorescens*, que foi alterada de modo a produzir uma toxina normalmente produzida por *Bacillus thuringiensis*. Essa toxina mata certos patógenos de vegetais, como a broca do milho europeia. A *Pseudomonas* alterada geneticamente, que produz muito mais toxina que *B. thuringiensis*, pode ser adicionada a sementes de plantas que posteriormente terão a bactéria em seus sistemas vasculares. A toxina bacteriana mata a larva da broca que se alimenta das plantas inoculadas (mas é inócua para seres humanos e outros animais homeotérmicos).

A criação de animais também se beneficiou da engenharia genética. Vimos que um dos primeiros produtos comerciais da engenharia genética foi o hormônio do crescimento humano. Por métodos similares, é possível a produção do hormônio do crescimento bovino (bGH). Quando o bGH é injetado em gado de corte, ele aumenta o ganho de peso dos animais; em vaca leiteiras ele também causa o aumento de 10% na produção de leite. Esses procedimentos causam resistência por parte dos consumidores, em especial na Europa, principalmente devido a temores, até agora não confirmados, de que o bGH estaria presente no leite ou na carne desses animais e poderia ser prejudicial para seres humanos.

A **Tabela 9.3** lista esses e vários outros produtos da engenharia genética utilizados na agricultura e na pecuária.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Qual a importância do patógeno de plantas *Agrobacterium*? 9-19

Questões de segurança e ética na engenharia genética

OBJETIVO DO APRENDIZADO

- 9-20 Listar as vantagens do uso das técnicas de engenharia genética e os problemas associados a elas.

Sempre existirão dúvidas a respeito da segurança de qualquer tecnologia nova, e a engenharia genética e a biotecnologia certamente não são exceções. Uma das razões para esse tipo de preocupação reside no fato de que é quase impossível provar que alguma coisa é inteiramente segura sob todas as condições imagináveis. As pessoas temem que as mesmas técnicas capazes de alterar um micróbio ou uma planta para torná-los úteis para seres humanos também possam inadvertidamente torná-los patogênicos para o homem, ou perigosos para outros organismos vivos, ou causar um desastre ecológico. Por isso, laboratórios que empregam técnicas de DNA recombinante devem atender a rigorosos padrões de controle, de modo a evitarem a liberação acidental de organismos geneticamente modificados para o meio ambiente ou a exposição de seres humanos a qualquer risco de infecção. Para uma maior redução dos riscos, os microbiologistas que utilizam técnicas de engenharia genética geralmente removem dos genomas microbianos alguns genes que são essenciais para a multiplicação desses organismos em ambientes externos ao laboratório. Organismos alterados geneticamente destinados à utilização no meio ambiente (na agricultura, por exemplo) podem ser modificados para conterem “genes de suicídio” – genes que acabam sendo ativados e produzem uma toxina que mata os micróbios, assegurando assim que eles não sobreviverão no ambiente por muito tempo depois de terem cumprido seu propósito.

Os problemas de segurança na biotecnologia agrícola são semelhantes àqueles dos pesticidas químicos: toxicidade para humanos e espécies não nocivas. Embora não tenha sido provado que são prejudiciais, os alimentos alterados geneticamente não têm sido populares com os consumidores. Em 1999, pesquisadores em Ohio, nos Estados Unidos, perceberam que as pessoas podem desenvolver alergias à toxina (Bt) de *Bacillus thuringiensis* depois de trabalharem em lavouras que tenham recebido o inseticida. Um estudo no Iowa, também nos Estados Unidos, demonstrou que borboletas monarca no estágio de lagarta poderiam ser mortas ao ingerir oficiais-de-sala, a planta da qual normalmente se alimentam, coberta por pólen carregando Bt. As plantas podem ser alteradas geneticamente para resistir aos herbicidas, para que ele possa ser espalhado nas lavouras, eliminando as ervas daninhas, mas sem matar a cultura desejada. No entanto, se as plantas alteradas geneticamente polinizarem espécies de ervas daninhas semelhantes, essas ervas poderiam se tornar resistentes aos herbicidas, tornando o controle das plantas indesejadas mais difícil.

Uma questão ainda sem resposta é se os organismos modificados geneticamente irão alterar a evolução à medida que os genes avançam para espécies silvestres.

Essas tecnologias em constante avanço também levantam uma série de questões morais e éticas. Se a triagem genética para doenças tornar-se rotina, quem deverá ter acesso a essa informação? Empregadores e companhia de seguros deverão ter o direito de conhecer os resultados de tais testes? A restrição do acesso a essa informação será bastante difícil, o que levanta questões referentes ao direito à privacidade. Como poderá nos ser assegurado que essa informação não será utilizada na discriminação contra certos grupos?

As aplicações das técnicas de triagem não estão limitadas a adultos. A capacidade de diagnosticar uma doença genética em um feto traz ainda mais controvérsia para o debate sobre o aborto. O aconselhamento genético, que fornece pareceres e conselhos a pais potenciais com histórias familiares de doença genética, está se tornando mais importante em considerações sobre ter ou não filhos. As decisões reprodutivas podem se tornar mais difíceis para certas famílias à medida que se aprende mais sobre as causas genéticas de várias doenças, como o câncer ou a doença de Huntington.

Quais serão os encargos adicionais que a engenharia genética colocará sobre o nosso já sobrecarregado sistema de saúde? Os procedimentos de triagem genética e de terapia gênica são caros, sendo necessário considerar como eles serão oferecidos para o público à medida que a tecnologia se desenvolve. Haverá um número suficiente de conselheiros genéticos para trabalhar com as pessoas? As curas e os tratamentos médicos caros estarão disponíveis apenas para aqueles que puderem pagar?

É provável que o número de aplicações prejudiciais de uma nova tecnologia seja tão grande quanto aplicações de cunho positivo. É particularmente fácil imaginar a engenharia genética sendo utilizada para desenvolver novas e poderosas armas biológicas. Além disso, como alguns esforços de pesquisas são realizados secretamente, é quase impossível que o público em geral tome conhecimento deles.

A engenharia genética, talvez mais que a maioria das tecnologias de ponta, tem o potencial de afetar a vida humana de maneira inimaginável. É importante que sejam dadas à sociedade e aos indivíduos todas as oportunidades necessárias para a compreensão do impacto do desenvolvimento dessa nova tecnologia.

Assim como a invenção do microscópio, o desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante está causando mudanças profundas na ciência, na agricultura e na saúde humana. Com essa tecnologia de pouco mais de 30 anos de idade, é difícil prever exatamente quais serão as mudanças que ocorrerão. Entretanto, é provável que, dentro de mais 30 anos, muitos dos tratamentos e dos métodos diagnósticos discutidos neste livro tenham sido substituídos por técnicas muito mais poderosas, com base na capacidade sem precedentes de manipular o DNA com precisão.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Identifique duas vantagens e dois problemas associados a organismos geneticamente modificados. 9-20