Governo do Estado do Ceará
Secretaria da Educação

Escola Estadual de Educação Profissional - EEEP

Ensino Médio Integrado à Educação Profissional

Curso Técnico em Biotecnologia

Fundamentos de Biotecnologia

GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Educação

Governador
Cid Ferreira Gomes

Vice Governador
Domingos Gomes de Aguiar Filho

Secretária da Educação
Maria Izolda Cela de Arruda Coelho

Secretário Adjunto
Maurício Holanda Maia

Secretário Executivo
Antônio Idilvan de Lima Alencar

Assessora Institucional do Gabinete da Seduc
Cristiane Carvalho Holanda

Coordenadora da Educação Profissional – SEDUC
Andréa Araújo Rocha

Sumário

Capítulo 1 – Introdução à Biotecnologia: conceito e perspectiva histórica 2
Capítulo 2 - Células e os cromossomos 17
Capítulo 3 - Biotecnologia e diagnósticos moleculares 30
Capítulo 4 - Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações 40
Capítulo 5 - Melhoramento genético de plantas e biotecnologia 57
Capítulo 6 - A tecnologia do DNA 66
Capítulo 7 - A engenharia genética 71
Capítulo 8 – Bioinformática 84
Capítulo 9 - Biossegurança ambiental e alimentar de OGMs 92
Glossário de termos em Biotecnologia 99

Capítulo 1 – Introdução à Biotecnologia: conceito e perspectiva histórica

A Biotecnologia – conceitualmente, a união de biologia com tecnologia – é um conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos, ou parte desses, no desenvolvimento de processos e produtos que tenham uma função econômica e (ou) social. A biotecnologia envolve várias áreas do conhecimento e, em consequência, vários profissionais, sendo uma ciência de natureza multidisciplinar. Na figura 1A, ilustram-se algumas áreas do conhecimento com interface com a biotecnologia.

As várias técnicas relacionadas à biotecnologia (Figura 2B) têm trazido benefícios para a sociedade (Figura 3C). Podemos citar como exemplos as fermentações industriais na produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres; a produção de fármacos, vacinas, antibióticos e vitaminas; a utilização de biofungicidas no controle biológico de pragas e doenças; o uso de microrganismos visando à biodegradação de lixo e esgoto; o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos para a melhoria da produtividade das plantas; o desenvolvimento de plantas e animas melhorados utilizando técnicas convencionais de melhoramento genético e também a transformação genética.

Neste capítulo, é apresentada uma visão geral da biotecnologia, abordando aspectos conceituais e históricos da biotecnologia clássica e moderna e fazendo um breve relato das principais técnicas e produtos biotecnológicos e seus benefícios econômicos, sociais e ambientais.

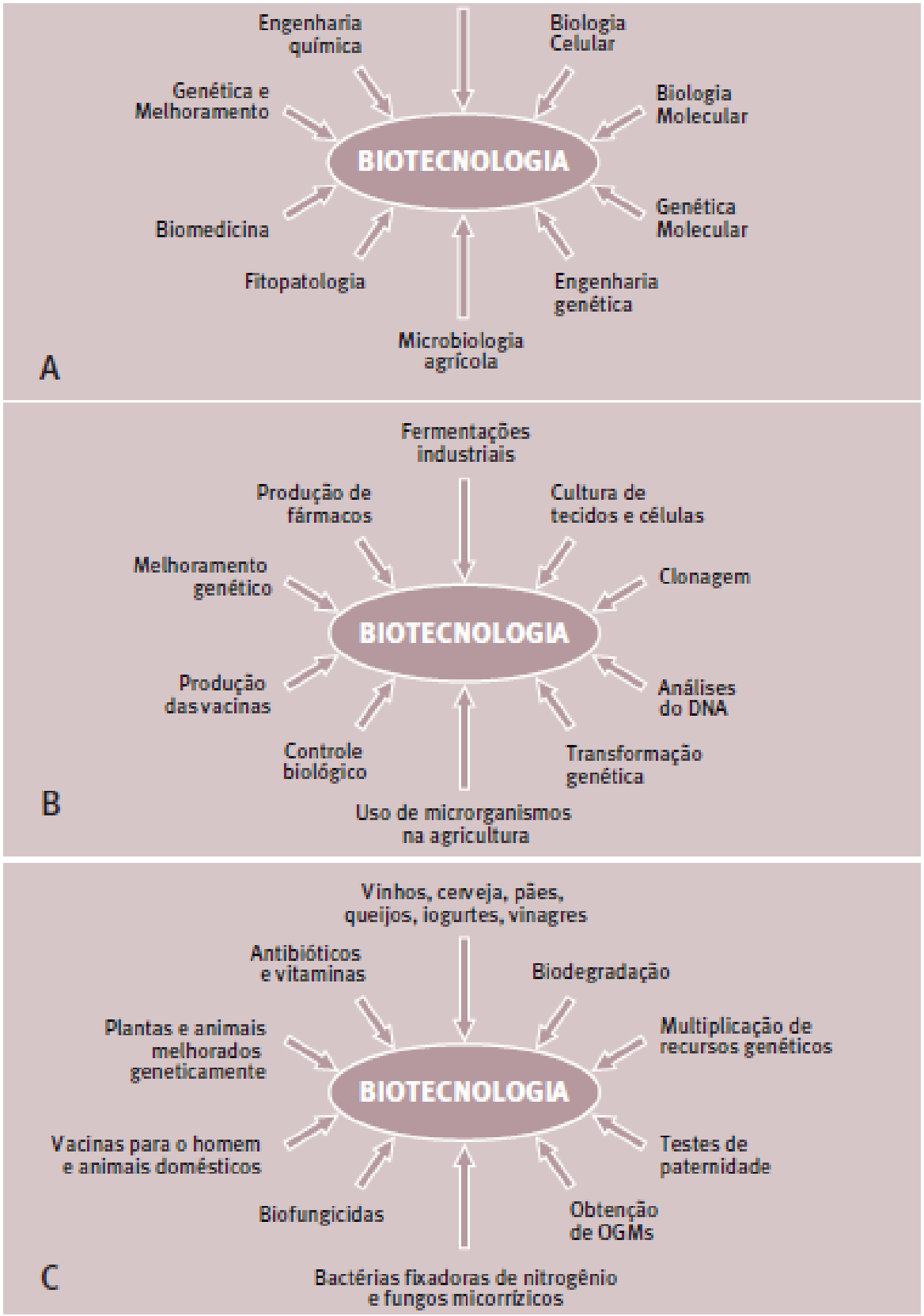


Figura 1. Principais disciplinas (A), técnicas (B) e produtos (C) relacionados à biotecnologia.

O que é Biotecnologia?

Podemos encontrar, nos mais variados meios de comunicação, várias definições para o termo biotecnologia. Uma definição ampla de biotecnologia é o uso de organismos vivos ou parte deles para a produção de bens e serviços. Podemos dizer que, nessa definição, enquadram-se a biotecnologia clássica e moderna. A biotecnologia clássica envolve um conjunto de atividades que o homem vem desenvolvendo há milhares de anos, como a produção de alimentos fermentados, como o pão e o vinho. A chamada biotecnologia moderna envolve tecnologias de engenharia genética, DNA recombinante, cultura de células e embriões para o desenvolvimento de produtos e processos. Entre as várias definições de biotecnologia, encontramos aquelas em sentido amplo.

"É o uso de conhecimentos sobre processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade" (CONVECTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992).

Algumas definições se enquadram mais dentro da biotecnologia clássica:

"É o uso industrial de processos de fermentação... tecnologia que permite a utilização de material biológico para fins industriais" (BORÉM et al., 2007)

"É um conjunto de técnicas que utiliza seres vivos, ou parte desses, para produzir ou modificar produtos, aumentar a produtividade de plantas e animais de maneira eficiente ou, ainda, produzir microrganismos para usos específicos." (TORRES et al., 2000).

Outras definições estão mais relacionadas à biotecnologia moderna:

"É o uso de células e biomoléculas para a resolução de problemas ou transformação em produtos. É um conjunto de técnicas que potencializa as melhores características das células, como as capacidades produtivas, e disponibiliza moléculas biológicas, como DNA e proteínas, para serem utilizadas." (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2009).

"É o desenvolvimento de produtos por processos biológicos, utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante." (BORÉM; SANTOS, 2004).

História da Biotecnologia

O termo biotecnologia foi utilizado, pela primeira vez, no início do século passado. Apesar de o termo ser novo, o principio é muito antigo. Considerando o seu conceito amplo, podemos dizer que a biotecnologia iniciou-se com a agricultura ou agropecuária, ou seja, com a capacidade do homem de domesticar plantas e animais para o seu benefício. Estima-se que há 800 anos a.C., na Mesopotâmia, berço da civilização, os povos selecionavam as melhores sementes das melhores plantas para aumentar a colheita. Outro exemplo histórico da biotecnologia é a utilização de levedura na fermentação da uva e do trigo para produção de vinho e pão, o que já acontecia por volta de 7000 anos a. C. Estima-se que a utilização de bactérias para a fermentação do leite para produção de queijos já acontecia há 3000 anos a. C. Logicamente, os povos dessa época não faziam ideia que a s leveduras e bactérias fossem utilizadas nesses processos de fermentação. Os microrganismos somente foram descobertos em 1675 por Anton Van Leeuwenhoek e, somente em 1862, Louis Pasteur descobriu a associação desses microrganismos com o processo de fermentação. O início da biotecnologia é listrado na Figura 2 e, na figura 3.

Figura 2. Inicio da biotecnologia com a agricultura e a produção do pão e do vinho.

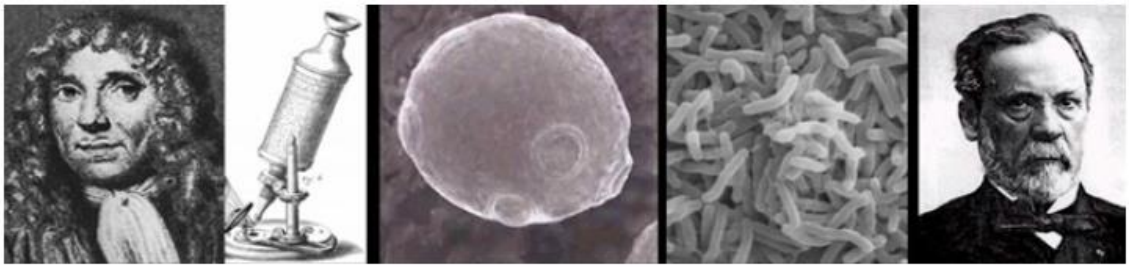


Figura 3. Anton Van Leeuwenhoek e Louis Pasteur e a descoberta dos microrganismos

Com a evolução da ciência em seus diversos setores, inúmeras metodologias biotecnológicas têm sido sistematizadas, aumentando seus benefícios econômicos, sociais e ambientais. A descoberta da utilidade dos microrganismos trouxe a primeira

revolução biotecnológica, a qual ocorreu na medicina com a produção das vacinas. Louis Pasteur foi o pioneiro e, no Brasil, Oswaldo Cruz foi um importante seguidor.

Oswaldo Cruz foi o pioneiro no estudo das moléstias tropicais e da medicina experimental no Brasil (Figura 4). Fundou o Instituto Oswaldo Cruz, respeitado internacionalmente. Quase 90 anos após sua morte, Oswaldo Cruz é lembrado em cada canto do território nacional, embora tenha tido na época a incompreensão de seus contemporâneos por causa de suas campanhas sanitárias, as quais permitiram que a vacinação se tornasse uma prática corriqueira e de extrema importância no Brasil (FALEIRO; ANDRADE, 2009). Hoje, seria praticamente impossível a vida sem as vacinas dos seres humanos e animais domésticos.

Figura 4. Oswaldo Cruz e seu pioneirismo na produção de vacinas no Brasil.

Entre outros cientistas importantes para o desenvolvimento da biotecnologia, merecem destaque Gregor Mendel, considerado o ‘pai da genética’, com a descoberta da hereditariedade (como as características passam de geração para geração) em 1865 e Alexander Fleming, descobridor do antibiótico penicilina obtido a partir do fungo *Penicillium* (Figura 5).

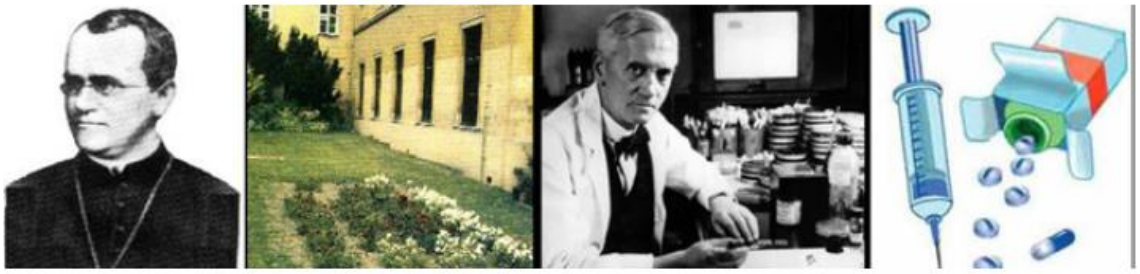


Figura 5. Gregor Mendel e Alexander Fleming.

E a biotecnologia moderna? Podemos dizer que a biotecnologia moderna nasceu com a descoberta da estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico, molécula

responsável pela informação genética de cada ser vivo) por James Watson e Francis Crick em 1953. Essa descoberta foi fundamental para entender como o DNA era capaz de codificar as proteínas responsáveis por todos os processos e pelo fenótipo de todos os seres vivos. Esse entendimento foi concluído com a decifração do código genético por Har Gobing Khorana e Marshall Niremberg em 1967 (Figura 6). Esses pesquisadores explicaram como apenas quatro nucleotídeos codificavam os 20 diferentes aminoácidos que constituem as milhares de proteínas existentes (BORÉM;SANTOS, 2004).

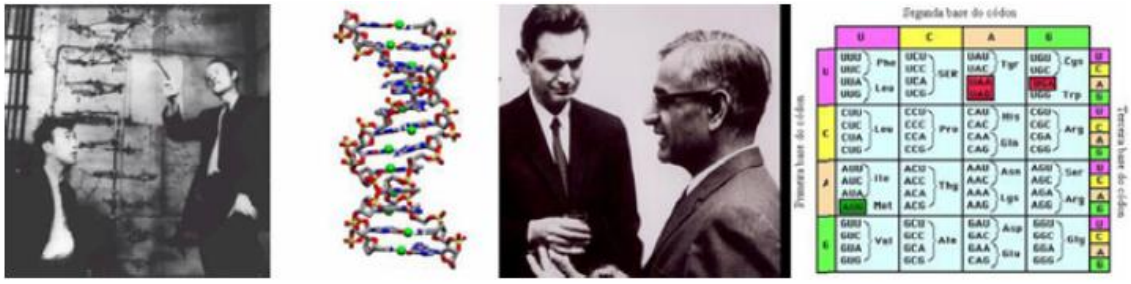


Figura 6. Watson e Crick e a estrutura do DNA; Niremberg e Khorana e o código genético.

A partir da descoberta do DNA e do código genético, houve uma revolução incrível na área da genética e biologia molecular, surgindo a manipulação controlada e intencional do DNA por meio das técnicas de engenharia genética. Segundo Aragão (2009), a engenharia genética surgiu em 1972, quando cientistas americanos conseguiram ligar sequências de DNA de *Escherichia coli* a do *Simian papiloma vírus*. Como consequência dessas pesquisas, o primeiro organismo transgênico – *E. coli* contendo sequências de DNA de *Xenopus laevis* – foi produzido em 1973. Esse resultado levou o líder do projeto, Dr. Paul Berg, a ganhar o Prêmio Nobel em 1980. Por meio dessas técnicas, foi possível a produção de insulina humana em bactérias e o desenvolvimento de inúmeras plantas transgênicas a partir da década de 1980, sendo a primeira uma planta de fumo transformada com a capa proteica do vírus do mosaico do tabaco (*Tobacco mosaic virus* – TMV) (POWELL et al., 1986). Em 1994, a U.S. Food and Drug Administration (FDA) liberou para o consumo humano o primeiro alimento geneticamente modificado, o tomate Flavr Savr, produzido pela empresa americana Calgene.

Na história recente da biotecnologia moderna, merece destaque a clonagem da ovelha Dolly (Figura 7), em 1996, que foi o primeiro mamífero a ser clonado com sucesso a partir de uma célula adulta.

Dolly foi gerada a partir de células mamárias de uma ovelha adulta com cerca de seis anos, por meio de uma técnica conhecida como transferência somática de núcleo. Outro acontecimento marcante foi o anúncio do projeto genoma humano, em 1990, que tinha como objetivo conhecer a sequência completa dos nucleotídeos que o compõem. O prazo previsto para a conclusão do projeto era de 15 anos. Em virtude da grande cooperação da comunidade científica internacional, associada aos avanços no campo da biologia molecular relacionado às técnicas de sequenciamento, de bioinformática e das tecnologias de informação, um primeiro esboço do genoma foi anunciado em 26 de Junho de 2000.

Figura 7. História recente da biotecnologia moderna com a clonagem da ovelha

Dolly e o sequenciamento do genoma humano. Além dos produtos tecnológicos, a biotecnologia moderna tem possibilitado o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores moleculares e técnicas de análises genômicas e proteômicas, as quais têm permitido várias aplicações práticas na pesquisa e desenvolvimento da agropecuária. Algumas das principais técnicas e produtos biotecnológicos ligados à agropecuária são comentadas resumidamente a seguir e apresentados com maior profundidade nos próximos capítulos.

Principais técnicas e produtos biotecnológicos

As técnicas e produtos biotecnológicos possuem aplicações em diferentes áreas, sendo as principais aquelas ligadas à indústria, ambiente, saúde, agropecuária, além da área científica. Abaixo são relatados algumas técnicas e produtos em cada uma das cinco áreas principais de aplicação. Na Figura 8, ilustra-se essa diversidade de aplicações.

Figura 8. Diversidade de aplicações da biotecnologia na área industrial, ambiental, saúde, agropecuária e científica.

Área industrial

Essas aplicações estão relacionadas à obtenção e conservação de alimentos, principalmente utilizando-se de processos fermentativos. Esses processos foram utilizados, de forma inconsciente, há milhares de anos a.C.. Com a descoberta dos microrganismos, os processos de fermentação têm sido otimizados e utilizados em escala comercial.

Vários são os alimentos obtidos ou modificados por processos fermentativos. Vinhos, vinagres, cervejas, pães, queijos e leite fermentado são os exemplos com relatos de uso mais antigos. Outras bebidas alcoólicas obtidas a partir de frutas, cereais e até de folhas e raízes são exemplos de alimentos utilizados por índios de forma tradicional.

Vários microrganismos são utilizados em processos fermentativos como as bactérias (*Bacillus*, *Zymomonas*, *Acetobacter* etc.) e fungos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, etc.), incluindo a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), exemplo mais comum e importante do ponto de vista econômico. Os principais processos fermentativos são a fermentação alcoólica, láctica e biossíntese acética. Os principais produtos da fermentação alcoólica são as bebidas alcoólicas e o etanol carburante, os da fermentação láctica são os leites fermentados, queijos, chucrutes, picles e azeitonas e os da biossíntese acética os vinagres e ácido acético.

Com o avanço da biotecnologia, espera-se que novos produtos industriais e processos de obtenção sejam produzidos e aperfeiçoados, tornando o sistema mais eficiente, com benefícios sociais, ambientais e econômicos.

Área ambiental

A aplicação mais direta da biotecnologia na área ambiental está relacionada à biodegradação, ou seja, à decomposição de materiais ou substâncias químicas pela ação

dos seres vivos, sobretudo, pela ação dos microrganismos. A biodegradação é vantajosa ao meio ambiente porque elimina certos contaminantes de origem orgânica como fezes, detergentes, papéis, etc.

A tecnologia baseada na biodegradação é chamada de biorremediação, que é a utilização de seres vivos ou seus componentes (geralmente microrganismos ou enzimas) na recuperação de áreas contaminadas, degradando compostos poluentes. Esse processo de degradação pode não ser efetivo se o contaminante apresentar outras substâncias, tais como, metais pesados (chumbo e mercúrio), ou se o meio apresentar um pH extremo ou outras condições que dificultam a ação microbiana.

No caso dos metais pesados, a fitorremediação (utilização das plantas no processo de recuperação de áreas contaminadas) é útil, pois muitas plantas são capazes de acumular essas toxinas em suas raízes ou partes aéreas, as quais são colhidas e eliminadas da área contaminada. No caso das condições desfavoráveis à ação microbiana, um exemplo mais geral é o tratamento de derramamentos de óleo com nitratos ou sulfatos, criando condições favoráveis à decomposição do óleo pelas bactérias.

As experiências com a biodiversidade dos microrganismos mostram que inúmeros compostos poluentes podem ser degradados. Pensando-se na transformação genética, microrganismos transgênicos podem ser desenvolvidos para degradar determinado poluente.

Logicamente, o uso de tais microrganismos deve ser precedido de pesquisas relacionadas à biossegurança, evitando que tal microrganismo se torne um invasor do ecossistema.

Além da biorremediação, a biotecnologia apresenta aplicações indiretas relacionadas aos benefícios ambientais, como o uso de plantas transgênicas. Andrade e Faleiro (2009) relataram diversos trabalhos que estudaram o efeito ambiental positivo dos OGMs. Segundo Brookes e Barfoot (2005), as lavouras com plantas transgênicas contribuíram para uma significativa redução no impacto ambiental global da produção agrícola, relacionada a uma diminuição do uso de pesticidas.

Outro benefício de algumas plantas transgênicas está relacionado à viabilização de sistemas de produção que utilizam o cultivo mínimo ou plantio direto. As vantagens desse sistema são: conservação do solo evitando-se a erosão, diminuição da emissão de gases de efeito estufa, redução do assoreamento dos rios e mananciais e conservação da fertilidade e da micro e macro fauna e flora do solo.

Acredita-se que muito ainda deve ser pesquisado e desenvolvido considerando os benefícios ambientais da biotecnologia. Segundo Fontes e Sampaio (1997), entre as novas ferramentas da ciência mencionadas como chave para a agricultura ambientalmente sustentável, a biotecnologia ocupa lugar de destaque.

Área da saúde

Os benefícios da biotecnologia na área da saúde são impressionantes. Villen (2009) relata de forma objetiva os principais impactos positivos da biotecnologia na área da saúde, citando como exemplo histórico o uso de antibióticos. Os antibióticos são empregados no combate a infecções causadas por microrganismos, notadamente bactérias, tanto no organismo humano como no animal e vegetal.

Os antibióticos possuem destacada importância econômica, entre os produtos obtidos pela biotecnologia. Atualmente, existem mais de 5 mil tipos diferentes de antibióticos. Essa diversidade foi possível e impactada pelo melhoramento genético dos microrganismos utilizados na produção.

As vacinas também representam um importante instrumento no controle de doenças infecciosas. Muitas doenças podem ser evitadas pela imunidade induzida como a poliomielite, a varíola, o sarampo, entre outras. As vacinas podem ser de origem viral, bacteriana, protozoária e mesozoária. A biotecnologia, pela técnica do DNA recombinante, tem permitido o desenvolvimento de novos agentes imunizantes para influenza, herpes, polio e hepatite A e B. Vacinas de origem bacteriana, para diversos tipos de meningite, têm sido produzidas por meio de fermentação.

A produção de macromoléculas úteis na medicina humana e animal pela biotecnologia também apresenta grande importância. A produção dessas macromoléculas por microrganismos teve grande impulso com a tecnologia do DNA recombinante. Entre os principais produtos, estão a insulina humana, interferon,

hormônio de crescimento humano, peptídeos neuroativos, hidrocortisona, testosterona, vitaminas etc. Podemos dizer que a produção da insulina humana por bactérias, na década de 1970, foi a primeira utilização comercial da engenharia genética. Segundo Aragão (2009), atualmente, mais de 400 genes de proteínas com potencial para o uso terapêutico na medicina humana e veterinária já foram obtidos. Mais de 30 desses genes foram introduzidos em organismos transgênicos que geraram medicamentos aprovados e utilizados em várias partes do mundo.

Agropecuária

A atividade agropecuária, conforme documentada pela história e por registros arqueológicos, tem sido inseparável da evolução e da atividade da sociedade humana. A sociedade como é vista hoje não poderia ter desenvolvido ou mesmo sobrevivido sem uma adequada fonte de alimentos. A invenção da agricultura, contudo, não resolveu por definitivo o problema do suprimento de alimentos. Quando a seca ou a explosão de doenças e pragas caíam sobre as culturas, o resultado era fome e crise. Esses fatos já ocorriam há muitos anos, como citado em numerosas referências bíblicas.

Alternativas biotecnológicas para aumentar a produtividade das plantas e dos animais e torná-los mais resistentes a fatores ambientais foram sendo desenvolvidas ao longo dos anos. Um destaque especial deve ser dado ao melhoramento genético que, desde o início da agricultura, vem sendo utilizado pelos povos, mesmo que de forma empírica. Após a redescoberta das leis de Mendel, o melhoramento genético começou a ser realizado de forma mais eficiente e precisa.

Inúmeros são os exemplos dos benefícios do melhoramento genético vegetal e animal na agricultura. Com o advento da biotecnologia moderna, novas perspectivas são esperadas. Segundo Borém e Milach (1998), a biotecnologia moderna será gradativamente incorporada na rotina do melhoramento genético, como instrumento para desenvolver novas variedades, tornando a ciência ainda mais precisa.

Marcadores moleculares e da engenharia genética estão permitindo diminuir o tempo para obtenção de novas variedades e expandir o conjunto gênico disponível para cada programa de melhoramento genético, entretanto muito ainda deve ser pesquisado considerando toda potencialidade das tecnologias. Segundo Ferreira e Faleiro (2008), do ponto de vista comercial, a indústria transgênica vegetal tem sido marcada até agora

pelo emprego de apenas dois tipos de genes: resistência à herbicida e resistência a insetos. Vários outros produtos têm sido testados, como aumento de vitamina A em grãos de arroz (“Golden Rice”, YE et al., 2000) ou vitamina E (SHINTANI; DELLAPENNA, 1998); qualidade de fruto; resistência a fungos; resistência à bactéria; composição de amido nos grãos (JOBLING et al., 2002); tolerância à estresse biótico, principalmente seca e salinidade (BARTELS; NELSON, 1994).

Outra alternativa biotecnológica utilizada na agropecuária é o controle biológico, o qual baseia-se na utilização de recursos genéticos microbianos, insetos predadores e parasitoides para o controle de doenças e pragas, especialmente os insetos e ácaros fitófagos, nos sistemas de produção agrícola. Segundo Menezes (2006), o início da história do uso do controle biológico de pragas agrícolas ocorreu no século III, quando os chineses se valeram da predação de formigas (*Oecophylla smaragdina*) para o controle de pragas de citros. Todavia, somente no século XX é que o controle biológico passou a ser objeto de pesquisas constantes para sua implantação de forma mais presente e intensiva nos ecossistemas agrícolas.

O uso de microrganismos na agricultura também merece destaque. Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos são dois exemplos clássicos. A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual esse elemento químico é captado da atmosfera, onde se caracteriza pela sua forma molecular relativamente inerte (N2) e é convertido em compostos nitrogenados, como amônio ou nitrato, usados em diversos processos químico-biológicos do solo, especialmente importantes para a nutrição de plantas. A associação de bactérias diazotróficas, principalmente do gênero *Rhizobium*, com raízes de plantas é um tipo de simbiose em as bactérias utilizam parte dos fotoassimilados da planta hospedeira, a qual beneficia-se do nitrogênio fixado pela bactéria.

A inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de leguminosas é uma tecnologia capaz de reduzir consideravelmente a adubação mineral nitrogenada e em alguns casos substituí-la. A micorriza também é uma associação simbiótica entre fungos micorrízicos e as raízes de algumas plantas. Nesse caso, os fungos utilizam parte dos fotoassimilados das plantas para o desenvolvimento de hifas que vão auxiliar as raízes da planta na função de absorção de água e minerais do solo, já que aumentam a superfície de absorção ou rizosfera.

A cultura de tecidos, como biotecnologia, também apresenta vários benefícios para a agricultura e mais especificamente para os programas de melhoramento genético de plantas. Ferreira et al. (1998) citam algumas dessas aplicações como a conservação e avaliação de germoplasma; aumento da variabilidade genética para fins de seleção; introgressão de genes de interesse (polinização *in vitro*, cultura de embriões, fusão de protoplastos, haploidização por cultura de anteras); aceleração do programa de melhoramento (germinação de sementes *in vitro*, clonagem de genótipos) e produção comercial de mudas de alta qualidade (multiplicação e limpeza clonal). Além disso, para a obtenção de uma planta transgênica, é indispensável um método eficiente de regeneração *in vitro* (ANDRADE, 2003).

Na agropecuária, é importante considerar os avanços da biotecnologia na produção e no melhoramento genético animal. Tecnologias como a inseminação artificial, transferência de embriões, a clonagem animal e a transformação genética podem ser destacadas pelos avanços obtidos nos últimos anos. Além do aumento da produtividade, essas técnicas têm sido importantes na seleção e reprodução de animais com características genéticas de interesse, além da diminuição do intervalo entre gerações. Pensando-se na conservação de recursos genéticos animais, essas tecnologias têm permitido a reprodução de animais ameaçados de extinção.

As aplicações da biotecnologia na agropecuária são inúmeras, embora a perspectiva seja de que novas aplicações sejam pesquisadas e desenvolvidas a cada ano. Além do aumento da produtividade dos sistemas agropecuários, essas aplicações são importantes para a busca da sustentabilidade, fazendo com que tais sistemas causem menor impacto ambiental.

Área científica

As aplicações da biotecnologia na pesquisa científica e tecnológica são fantásticas. O desenvolvimento de processos e metodologias de estudo dos microrganismos e mais recentemente as análises do DNA, das proteínas e das rotas metabólicas abriram novas portas para a atuação dos cientistas. Palavras como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica são cada vez mais comuns nos artigos científicos. Essas metodologias têm permitido os estudos de função e regulação da expressão gênica, análise de processos de transcrição e tradução. Esses estudos têm permitido a prospecção de genes de interesse em diferentes seres vivos, o estudo de

mecanismos envolvidos na resistência de plantas e animais a estresses bióticos e abióticos, o desenvolvimento de técnicas de diagnostico molecular de doenças e agentes patogênicos, entre outras inúmeras atividades científicas e pré-tecnológicas.

O impacto da biotecnologia

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

Tabela 1: Produtos e serviços de origem biotecnológica, em diferentes setores.

SETORES	TIPOS DE PRODUTOS OU SERVIÇOS
ENERGIA	Etanol, biogás e outros combustíveis (a partir de biomassa).
INDÚSTRIA	Butanol, acetona, glicerol, ácidos, vitaminas etc. Numerosas enzimas para outras indústrias (têxtil, de detergentes etc.).
MEIO AMBIENTE	Recuperação de petróleo, biorremediação (tratamento de águas servidas e de lixo, eliminação de poluentes).
AGRICULTURA	Adubo, silagem, biopesticidas, biofertilizantes, mudas de plantas livres de doenças, mudas de árvores para reflorestamento. Plantas com características novas incorporadas (transgênicas): maior valor nutritivo, resistência a pragas e condições de cultivo adversas (seca, salinidade, etc.).

PECUÁRIA	Embriões, animais com características novas (transgênicos), vacinas e medicamentos para uso veterinário e humano.
ALIMENTAÇÃO	Panificação (pães e biscoitos), laticínios (queijos, iogurtes e outras bebidas lácteas), bebidas (cervejas, vinhos e bebidas destiladas) e aditivos diversos (shoyu, monoglutamato de sódio, adoçantes etc.); proteína de célula única (PUC) para rações, alimentos de origem transgênica com propriedades novas.
SAÚDE	Antibióticos e medicamentos para diversas doenças, hormônios, vacinas, reagentes e testes para diagnóstico, tratamentos novos etc.

Considerações finais

É inquestionável que a biotecnologia, incluindo as tecnologias da biotecnologia moderna, é hoje uma das ferramentas de grande importância para propiciar benefícios a diferentes setores da sociedade. No caso da agropecuária, ações de pesquisa e desenvolvimento na área biotecnológica são fundamentais para o desenvolvimento de sistemas mais produtivos e sustentáveis. A evolução da ciência biotecnológica está caminhando a passos largos e pode-se dizer que a biotecnologia moderna ainda é uma criança, considerando todas as potencialidades e o que ainda vai ser descoberto.

Capítulo 2 - Células e os cromossomos

A célula como unidade dos seres vivos

Unidade estrutural

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

As células procarióticas se encontram exclusivamente no Reino Monera. Pequenas (0,001 a 0,005 mm) e com requerimentos nutricionais simples, estas células se multiplicam rapidamente. A informação genética se encontra em um cromossomo circular formado por uma molécula de DNA e associado a uma invaginação da membrana plasmática (mesossomo); pequenas moléculas circulares adicionais (plasmídeos) podem também estar presentes. Numerosos ribossomos asseguram a síntese proteica (Figura 1).

Bem mais complexa é a estrutura das células eucarióticas, presentes nos quatro Reinos restantes (Protista, Fungo, Planta e Animal). Com um tamanho variando entre 0,01 e 0,10 mm, estas células são dez vezes maiores que as procarióticas. A presença de compartimentos diferenciados, ou organelas, que cumprem atividades específicas, resulta em uma subdivisão do trabalho que garante a eficiência do funcionamento celular (Figura 2).

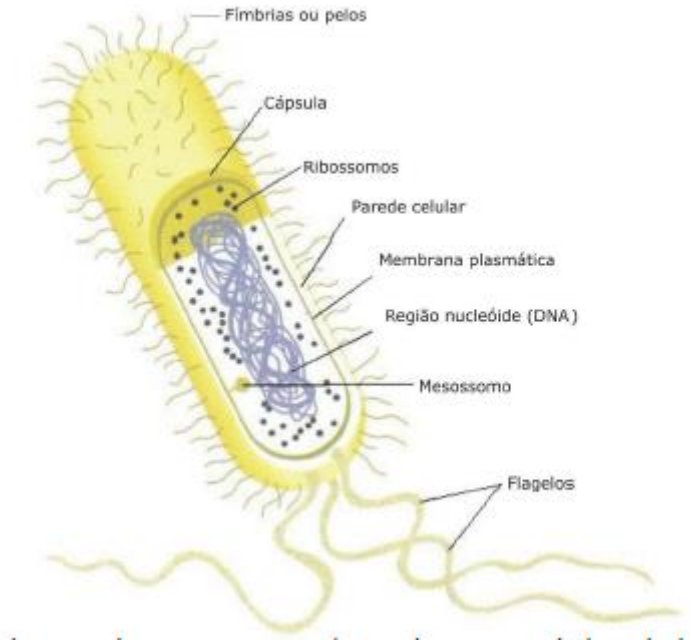


Figura 1. Representação esquemática de uma célula procariótica.

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

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

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

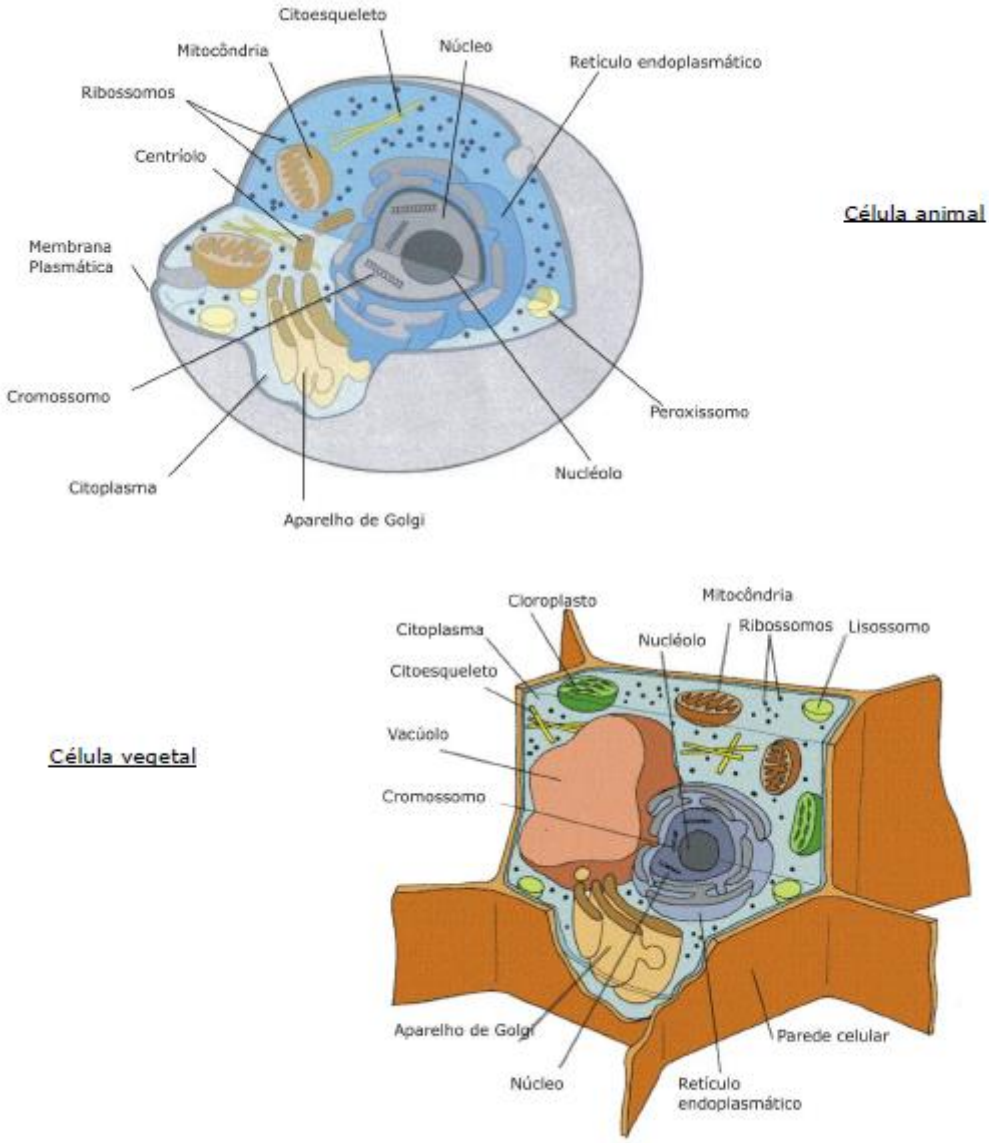


Figura 2. Representações esquemáticas da estrutura celular eucariótica, animal e vegetal.

Unidade funcional

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

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

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

Relação entre as estruturas celulares e sua função

Tabela 1. A função e a distribuição das estruturas celulares

Estrutura	Função	Célula bacteriana	Célula animal	Célula vegetal
Parede celular	Manutenção da forma e proteção da célula	Presente ou ausente	Ausente	Presente
Membrana plasmática	Manutenção da estabilidade do meio intracelular; controle das trocas entre a célula e o meio extracelular.	Presente		
Carioteca ou membrana nuclear	Controle do fluxo de substâncias entre o núcleo e o citoplasma	Ausente	Presente	
Cromossomo(s)	Controle da estrutura e do	Único e circular; apenas DNA.	Múltiplos e lineares; ADN e proteínas.	

<table>
<tr><td></td><td>funcionamento celular</td><td></td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td>Nucléolo(s)</td><td>Formação de ribossomos</td><td>Ausente</td><td colspan="2">Presente</td></tr>
<tr><td>Centríolos</td><td>Formação de cílios e flagelos; participação na divisão celular.</td><td>Ausente</td><td>Presente</td><td>Ausente</td></tr>
<tr><td>Ribossomos</td><td>Síntese de proteínas</td><td colspan="3">Presente</td></tr>
<tr><td>Retículo endoplasmático rugoso</td><td>Síntese de proteínas</td><td rowspan="4">Ausente</td><td colspan="2" rowspan="4">Presente</td></tr>
<tr><td>Retículo endoplasmático liso</td><td>Síntese de lipídios; armazenamento e inativação de substâncias.</td></tr>
<tr><td>Complexo de golgi</td><td>Secreção celular</td></tr>
<tr><td>Lisossomos</td><td>Digestão intracelular</td></tr>
<tr><td>Vacúolo central</td><td>Equilíbrio osmótico e armazenamento</td><td colspan="2">Ausente</td><td>Presente</td></tr>
<tr><td>Mitocôndrias</td><td>Respiração celular aeróbia</td><td rowspan="2">Ausente</td><td>Presente</td><td>Presente</td></tr>
<tr><td>Cloroplastos</td><td>Fotossíntese</td><td>Ausente</td><td>Presente</td></tr>
<tr><td>Citoesqueleto</td><td>Manutenção da forma celular; contração; ancoragem de organelas.</td><td>Ausente</td><td colspan="2">Presente</td></tr>
</table>

Técnicas laboratoriais

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

- Técnicas microscópicas que permitem uma visualização detalhada da célula:

- Microscopia óptica, que se utiliza para observar os cortes de tecidos. Geralmente, estes são fixados (álcool, ácido acético, formaldeído) e tingidos com corantes que reagem com as proteínas ou com os ácidos nucleicos, aumentando o contraste da imagem.

- Microscopia de contraste de fase, que transforma as diferenças de espessura ou de densidade do fragmento observado em diferenças de contraste.

- Microscopia fluorescente, que associa anticorpos específicos a um reagente como o PVF (proteína verde fluorescente de medusa), de forma a marcar as moléculas e visualizar sua distribuição nas células.

- Microscopia confocal, que combina a microscopia fluorescente com a análise eletrônica da imagem, fornecendo uma imagem tridimensional.

- Microscopia eletrônica, que permite a observação em um plano de cortes tingidos com sais de metais pesados (microscopia de transmissão) e a observação tridimensional de células (microscopia de varredura).

- Técnicas físicas como a centrifugação diferencial (ultracentrifugação, centrifugação em gradiente) para separar os componentes celulares para estudos bioquímicos posteriores.
- Técnicas instrumentais que possibilitam a contagem de células e a separação de populações celulares (*cell sorter*) ou de cromossomos (*flow sorter*).
- Técnicas de cultura de células com objetivos diversos.

Toda célula deriva de outra preexistente

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

Todo organismo multicelular se forma a partir da multiplicação de uma única célula-ovo ou zigoto. As contribuições dos genes maternos e paternos para o

desenvolvimento do embrião não são idênticas (*imprinting*). As células embrionárias se diferenciam, formando mais de 200 tipos de células em animais, e um pouco menos nos vegetais. Os diferentes tipos celulares cumprem funções específicas que, integradas, asseguram a unidade do organismo.

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

Nos animais superiores, a totipotência se restringe às células do embrião com menos de quatro dias, que são as únicas capazes de regenerar um organismo inteiro. No entanto, no embrião de mais de quatro dias, algumas células internas do blastócito (células-tronco embrionárias) podem originar todos os tecidos do organismo, sendo consideradas pluripotentes (Figura 3).

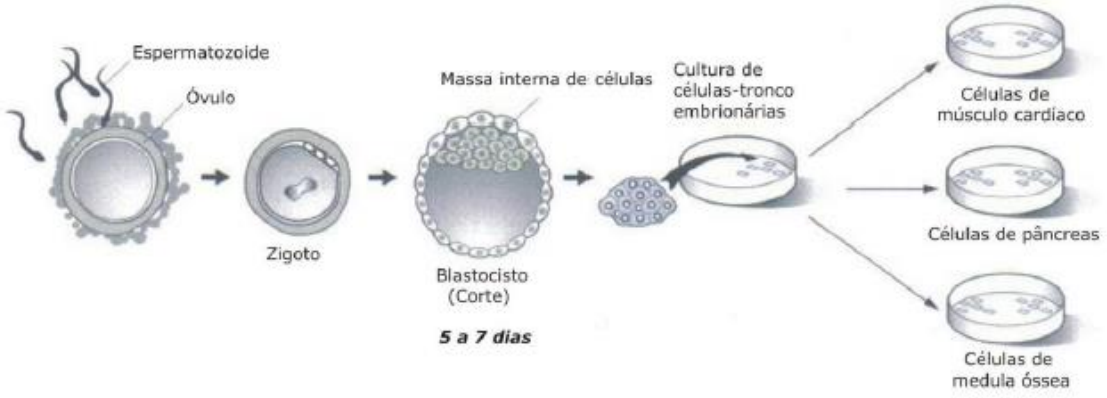


Figura 3. As células-tronco embrionárias: As células-tronco podem ser extraídas do blastócito com 5 a 7 dias e cultivadas *in vitro*; colocadas em condições experimentais adequadas, diferenciam-se nos distintos tipos celulares.

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

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

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

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

Os cromossomos

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

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

Um pouco antes da divisão de uma célula, os cromossomos se duplicam, de maneira que cada uma das células filhas recebe $2n$ cromossomos. A mitose mantém constante o número de cromossomos nas células somáticas dos indivíduos de uma

mesma espécie. Já nas células reprodutivas, a meiose reduz a *n* o número de cromossomos; na fecundação, a fusão dos gametas irá restaurar o número *n* característico da espécie. Durante a meiose, o entrecruzamento dos cromossomos permite a permuta e recombinação dos genes (Figura 4).

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

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

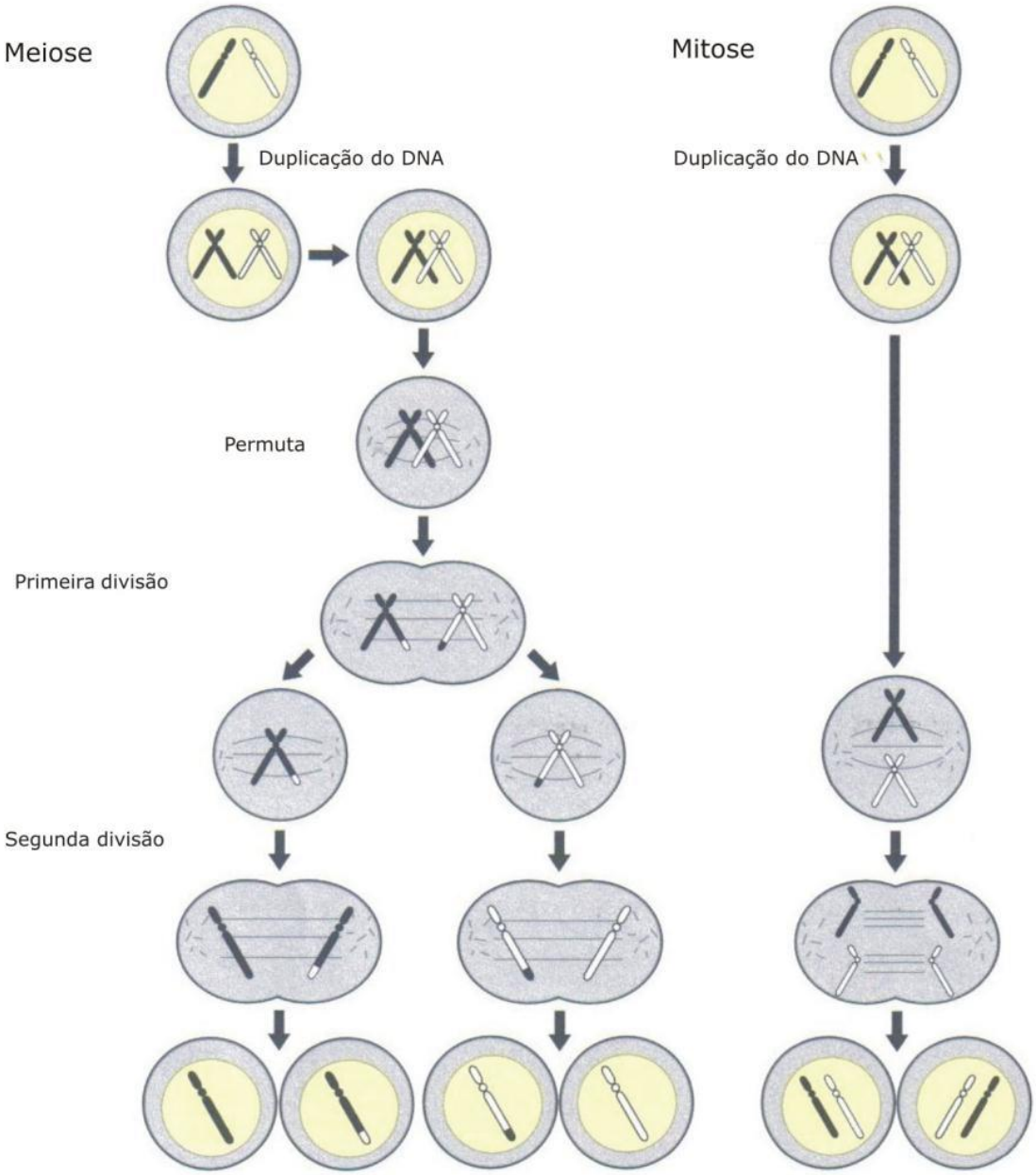


Figura 4. Mitose e meiose: Durante a meiose, a permuta de fragmentos cromossômicos homólogos possibilita a recombinação dos genes.

Células e cromossomos como agentes biológicos

Um dos testes pioneiros de diagnóstico genético está baseado na observação microscópica dos cromossomos de células somáticas durante a divisão celular (mitose). A identificação se vê facilitada pela presença de regiões ou bandas reveladas mediante algumas técnicas de coloração. O número e a estrutura dos cromossomos são analisados e apresentados em um arranjo (cariótipo) que segue uma classificação convencional (Figura 5).

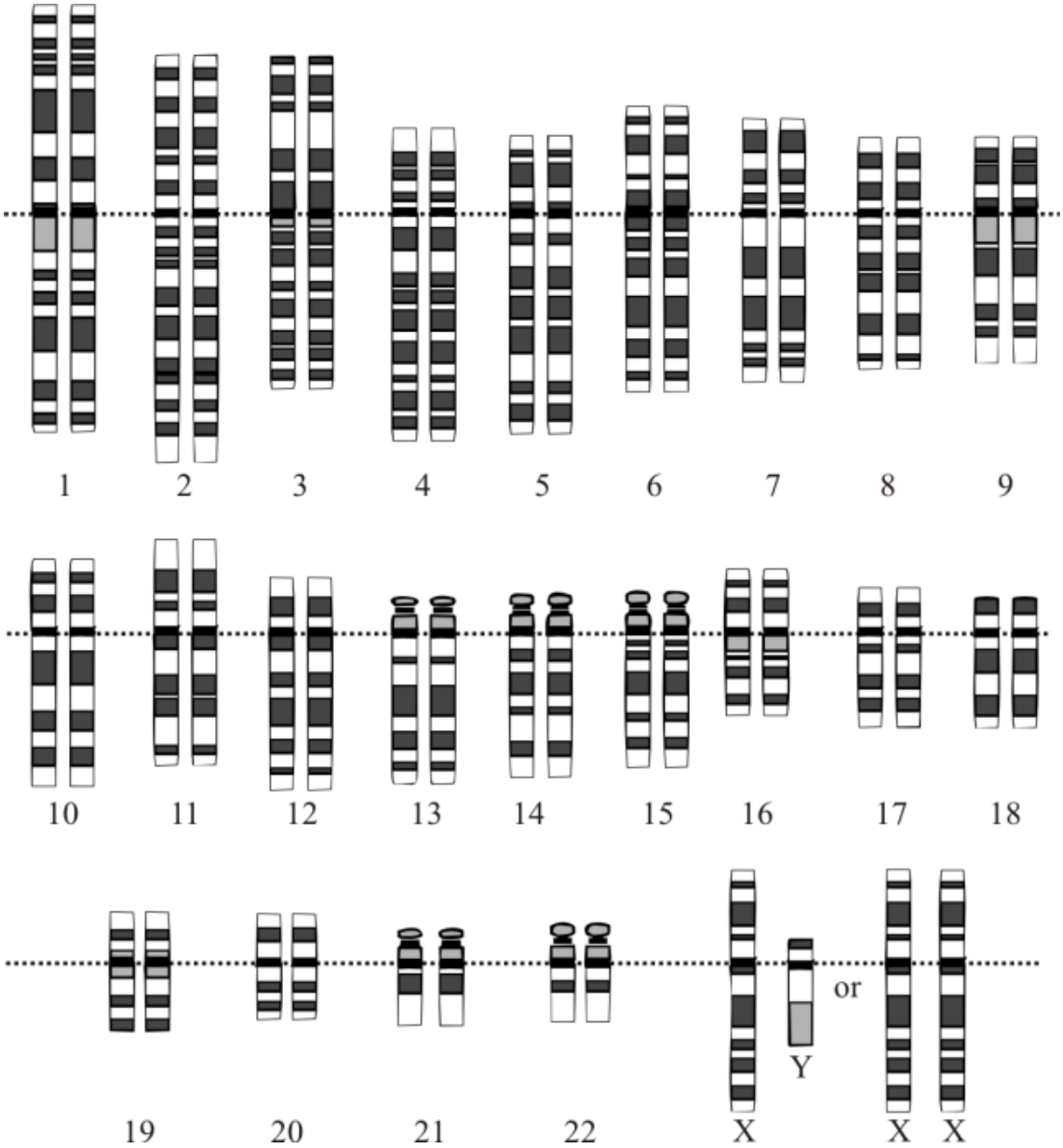


Figura 5: Representação dos cromossomos humanos: O arranjo segue uma classificação convencional que leva em conta o tamanho, a posição do centrômero (tracejado no esquema) e o padrão das bandas de cada cromossomo.

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

Como agentes biológicos, as células encontram outras aplicações (Tabela 2). Células vegetais cultivadas *in vitro* produzem substâncias de alto valor agregado, importantes para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Também se utilizam para regenerar plantas. A multiplicação de vírus em cultivos de células de insetos permite a comercialização de práticas de controle biológico.

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

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

Tabela 2: As células como agentes biológicos.

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

Considerações finais

As células são as unidades fundamentais da vida. Acredita-se que todas as células dos dias atuais tenham evoluído a partir de uma célula ancestral. Todas as células, e, portanto, todos os seres vivos, crescem, convertem energia a partir de uma forma para outra, percebem e respondem ao seu meio e se reproduzem.

Todas as células são envolvidas por uma membrana plasmática que separa o interior da célula do meio e contêm DNA como um depósito de informação genética e o utilizam para guiar a síntese de proteínas. As células em um organismo multicelular, mesmo que elas contenham o mesmo DNA, podem ser muito diferentes. Elas utilizam a sua informação genética para direcionar as suas atividades biológicas de acordo com os estímulos que recebem a partir do seu meio.

As células de tecidos animais e vegetais têm tipicamente 5-20 μm de diâmetro e podem ser visualizadas com um microscópio óptico, que também revela alguns dos seus componentes internos ou organelas.

Bactérias, as células vivas atuais mais simples, são procariotos: embora elas contenham DNA, não têm um núcleo e outras organelas e provavelmente se parecem mais com a célula ancestral.

As células eucarióticas possuem um núcleo. Elas provavelmente evoluíram em uma série de estágios a partir de células mais similares às bactérias. Uma etapa importante parece ter sido a aquisição de mitocôndrias, originadas como bactérias englobadas que vivem em simbiose com células anaeróbicas maiores. O núcleo é a organela mais saliente na maioria das células vegetais e animais. Ele contém a informação genética do organismo armazenada em moléculas de DNA. O resto do conteúdo celular, fora o núcleo, constitui o citoplasma. Dentro do citoplasma, as células vegetais e animais contêm uma variedade de organelas internas envolvidas por membranas com funções químicas especializadas.

Capítulo 3 - Biotecnologia e diagnósticos moleculares

Introdução

Diagnóstico molecular pode ser conceituado como sendo o uso de ferramentas moleculares que indique, ou demonstre a solução de uma dada questão. Por exemplo, no campo da saúde, o termo diagnóstico é utilizado como um meio de esclarecer os sintomas de uma doença. Diagnóstico molecular é quando esse esclarecimento é realizado em nível molecular. No campo da biologia, o diagnóstico molecular pode ser utilizado, por exemplo, quando se quer identificar especificamente uma planta ou um animal. Na agropecuária, o diagnóstico molecular pode estar relacionado com a identificação de uma dada cultivar mais produtiva, mais resistente a uma dada doença, a identificação de um dado patógeno etc. O diagnóstico molecular pode ser considerado como um caminho que leva à biotecnologia e esta, como geradora de um processo, uma tecnologia nova com valor agregado. Como exemplo dessa relação estão os processos de identificação em nível molecular de, por exemplo, plantas e animais transgênicos e (ou) kits de identificação de patógenos que podem resultar em processos patenteáveis (com valor agregado).

Para que um diagnóstico molecular seja efetivo, para qualquer situação, ele deve ser considerado dentro de quatro quesitos importantes como: a reprodutibilidade, a especificidade, a distinguibilidade e a sensibilidade. Reprodutibilidade significa que o diagnóstico deve ser sempre repetido exatamente da mesma maneira dentro da situação específica. Especificidade significa que deve ser específico para a questão estudada (ex.: planta, patógeno etc.); distinguibilidade significa que o diagnóstico ou a identificação é distinta e não assume múltiplas formas (não há falsos positivos ou negativos), é única; e sensibilidade significa que o diagnóstico ou a identificação é capaz de ser realizado com quantidade muito reduzidas de matéria-prima (ex. sangue, tecido vegetal, animal, DNA, RNA, proteína etc). Esses quesitos estão diretamente relacionados com o "objeto" que conduz à identificação, que é chamado de biomarcador.

Biomarcador é a molécula que identifica, reconhece, diagnostica um determinado sistema como uma cultivar, um patógeno, uma enfermidade, etc. Essa molécula deve ser selecionada e relacionada com o ser que se quer identificar, o agente causal da enfermidade ou um sistema biológico específico. Pode ser de origem protéica ou outra como o ácido desoxiribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), compostos fenólicos etc.

Outra relação entre biotecnologia e diagnósticos moleculares diz respeito às ferramentas moleculares da biotecnologia moderna que são utilizadas para selecionar e relacionar uma molécula como biomarcadora de um determinado ser vivo, processo ou sistema. Essas ferramentas moleculares assim utilizadas podem ter origem na genômica, na transcriptômica, na proteômica ou no metaboloma.

Genômica é a parte da biotecnologia que estuda os genomas em sentido macro, sua estrutura básica. São, por exemplo, os grandes trabalhos de sequenciamento de genomas que têm, por principal objetivo, revelar o tamanho preciso dos diversos genomas animais ou vegetais; inferir no número provável de genes que se encontra nesse genoma; bem como conhecer a sequência desses diversos genes. As principais ferramentas utilizadas pela genômica são o sequenciamento automatizado de DNA e as ferramentas de bioinformática de anotação e análise das sequências gênicas. Porém, o sequenciamento completo dos genomas não informa sobre a funcionalidade de muitas das sequências gênicas conhecidas nos estudos da genômica e esta somente pode ser revelada por meio das ferramentas da transcriptômica e da proteômica.

A transcriptômica representa todos os estudos que visam à identificação e análise de genes expressos especificamente em um determinado sistema como, por exemplo, os genes expressos em tecidos vegetais infectados por diversos patógenos, em tecidos de plantas tolerantes a condições desfavoráveis como a seca ou a presença de metais pesados no solo e outras. Diversas metodologias moleculares são utilizadas nos estudos da transcriptômica como a síntese de bibliotecas de cDNA (DNA complementar), o PCR (Polymerase Chain Reaction), o RT-PCR (Reverse transcrition PCR), o PCR quantitativo (RTqPCR) etc. Esses estudos inferem, em última análise, situações fisiológicas específicas e contribuem para respostas e identificação dos principais genes (biomarcadores potenciais), que são ativados em diversas dessas situações fisiológicas diferentes.

A proteômica representa os estudos de todas as proteínas que são expressas em células específicas (tecidos específicos, situações fisiológicas específicas). As principais ferramentas metodológicas utilizadas, hoje, nesses estudos são a eletroforese em duas dimensões, o sequenciamento de proteínas, a espectroscopia de massa e as análises de bioinformática.

E, por fim, a metabolômica é o conjunto de ferramentas utilizadas para estudar moléculas relacionadas à identificação de compostos não proteicos ou DNA/RNA como os alcaloides, flavonoides, etc. e sua relação com seus ciclos de síntese. Algumas dessas

metodologias são a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), a cromatografia em camada fina (TLC) e a ressonância nuclear magnética (NMR).

Outros estudos no campo da genômica são aqueles relacionados com a genética. Nesse tipo de abordagem, utilizam-se como ferramentas experimentais as tecnologias dos marcadores moleculares que auxiliam no mapeamento de genomas.

Metodologias e seleção de biomarcadores para o diagnóstico molecular

Uma vez introduzido o assunto, agora podemos discorrer mais sobre como que algumas metodologias utilizadas pela biotecnologia auxiliam a seleção e distinção de moléculas biomarcadoras capazes de serem o "objeto" de diagnósticos moleculares.

- **Construção de biblioteca de cDNA**

Uma biblioteca de cDNA é um conjunto de cDNAs (DNA complementar) obtido de todos os RNAs mensageiros (RNAs-m) presentes e que se expressam em um determinado sistema biológico em um tempo específico. Os fundamentos teóricos para a sua construção estão relacionados com a associação de diversas ideias e ferramentas da engenharia genética, tais como, a construção de bibliotecas de DNA; polimerização e cadeia de DNA em sentido reverso pela enzima transcriptase reversa; clonagem molecular; transformação bacteriana e outros.

A construção de bibliotecas de cDNA objetiva facilitar a seleção de um gene específico que se expresse em uma situação fisiológica específica. Para que uma biblioteca de cDNA seja construída, é necessário obter como primeira etapa os RNAs-m presentes no sistema desejado (ex.: tecido de planta infectada com um patógeno, tecido de cultivar tolerante à seca, entre outros).

As diversas bibliotecas de cDNA possíveis assumem importância para o diagnóstico molecular no sentido em que elas permitem a seleção de uma sequência gênica específica que está relacionada como uma molécula biomarcadora de um sistema fisiológico.

Uma variação dessa metodologia é a construção de bibliotecas subtraídas de cDNA. Essas bibliotecas subtraídas são o produto da subtração de dois diferentes pools de cDNAs, por exemplo, biblioteca de cDNA dos genes expressos em um planta tolerante a estresse hídrico de onde foram subtraídos a maior parte dos genes constitutivos, ou seja, que existiam na planta independentemente da expressão de genes diretamente relacionados com o processo de tolerância antes da etapa de clonagem

molecular. Bibliotecas de cDNA subtraídas minimizam muito o trabalho para a seleção de um biomarcador para a situação estudada.

Outra variação, que na verdade é anterior e, a partir dela, foi idealizada a biblioteca de cDNA, é a construção de bibliotecas genômicas, que é nada mais do que o conjunto completo de fragmentos gênicos que, juntos, representam todo um genoma. Porém, nesse caso, é utilizado o DNA genômico. São utilizadas para selecionar sequências gênicas completas (regiões não transcritas para o RNA-m como regiões de íntrons, sequências gênicas regulatórias, sequências gênicas promotoras etc).

- **Microarranjos de DNA**

Microarranjos de DNA é a metodologia mais avançada para a seleção de uma ou mais sequências biomarcadoras ao mesmo tempo para diversas situações. Ela é realizada por meio da construção prévia de uma biblioteca de DNA genômico (biblioteca genômica).

- **Eletroforese em 2D**

A eletroforese em 2D foi descrita pela primeira vez por O'Farrel em 1975. Ela consiste na separação de proteínas em duas dimensões em um gel de eletroforese de poliacrilamida. O fundamento teórico dessa metodologia consiste na química de proteínas que, por meio desses estudos, sabe-se quais proteínas têm cargas elétricas positivas e negativas em meio aquoso, por causa dos grupos amino e carboxila dos aminoácidos. Porque possuem cargas elétricas, podem migrar em um campo elétrico (princípio da eletroforese), seja para o pólo positivo (se a predominância de carga for negativa) ou negativo (se a predominância de carga for positiva). No entanto, se a proteína tem uma proporção de cargas positivas e negativas iguais, esta não migra no campo elétrico, então esse ponto é chamado de ponto isoelétrico.

É por esse motivo que se consegue a separação de uma amostra heterogênea de proteínas na primeira dimensão da eletroforese em 2D. O outro princípio é que moléculas protéicas grandes migram em um campo elétrico com uma velocidade menor do que moléculas pequenas, podendo ser separadas por seu peso molecular. E essa é a separação obtida na segunda dimensão da eletroforese em 2D. A vantagem para um diagnóstico molecular é que essa metodologia, associada ao sequenciamento de proteínas, tem o potencial de identificar todas as proteínas componentes de um determinado tecido, como também as proteínas diferenciais expressas entre dois

diferentes tecidos (biomarcadores protéicos em potencial). Atualmente, essa identificação é realizada por meio de softwares especializados que escaneiam os géis em análise e subtraem *in silico* as marcas de proteínas de um em relação ao outro.

Recapitulando, as duas dimensões em que são separadas as proteínas em gel de eletroforese consistem na separação por pontos isoelétricos (pH em que a proteína tem carga nula e, portanto, estaciona no gel) em uma primeira etapa, e, em seguida, a separação em gel por peso molecular. Essa técnica parte da premissa de que as diversas proteínas que existem não têm, ao mesmo tempo, o mesmo ponto isoelétrico e o mesmo peso molecular.

- **Sequenciamento de DNA**

A metodologia do sequenciamento de DNA foi descrita por Frederick Sanger na década de 1970. O procedimento original é realizado por meio da amplificação em PCR da sequência alvo com oligonucleotídeos (*primers*) específicos localizados no vetor (DNA plasmidial) onde está clonada a sequência de interesse alvo (gene) e a utilização de dideoxnucleotídeos (ddNTPs). ddNTPs são nucleotídeos que contêm duas oxidrilas ao invés de apenas uma, normalmente encontrada nos dNTPs.

O sequenciamento de DNA auxilia um diagnóstico molecular, uma vez que permite o conhecimento de sequências gênicas espécie-específicas que podem ser comparadas por programas de bioinformática e, a partir dessa comparação, *primers* específicos podem ser sintetizados de forma a permitirem a amplificação específica de fragmentos espécie-específicos que funcionem para identificar especificamente patógenos, plantas, animais, plantas transgênicas (geram biomarcadores). Esses diagnósticos têm sido alvo de muitos trabalhos (FERRI, 2009).

- **Tecnologias principais utilizadas em diagnóstico molecular PCR e variações**

A reação do Polymerase Chain Reaction (PCR) é uma metodologia que mimetiza a duplicação do DNA em um tubo de ensaio e esse é o seu fundamento teórico. Ela foi descrita pela primeira vez por Mullins em 1983 (SAIKI et al., 1988), provavelmente após a identificação de uma enzima DNA polimerase (enzima que polimeriza cadeias novas de DNA) chamada Taq polimerase, que tem esse nome por ter sido purificada pela primeira vez de uma bactéria chamada *Thermophilus aquaticus*. A Taq polimerase é capaz de resistir a ciclos de alta temperatura periódicos, por ser

termoresistente. E essa alta temperatura (92° a 94°C) é necessária na reação de PCR na etapa de desnaturação do DNA.

O PCR é constituído de três etapas fundamentais (Figura 1): desnaturação do DNA; o anelamento de oligonucleotídeos (*primers*); e a polimerização de novas cadeias. A etapa de desnaturação é necessária para que a dupla cadeia do DNA seja aberta, permitindo assim o anelamento dos *primers;* a etapa de polimerização é aquela que polimeriza novas cadeias de DNA a partir de uma cadeia que serve como molde (a duplicação do DNA é semiconservativa). Esse ciclo se repete sucessivas vezes de forma a aumentar a quantidade do fragmento amplificado de maneira que obedeça uma progressão geométrica.

Assim, a partir de quantidades ínfimas de DNA, podem-se detectar fragmentos específicos e analisá-los. A grande vantagem do PCR é que é uma metodologia muito sensível, rápida e de relativo pouco custo, dessa forma um diagnóstico molecular que utiliza essa reação tem um grande impacto.

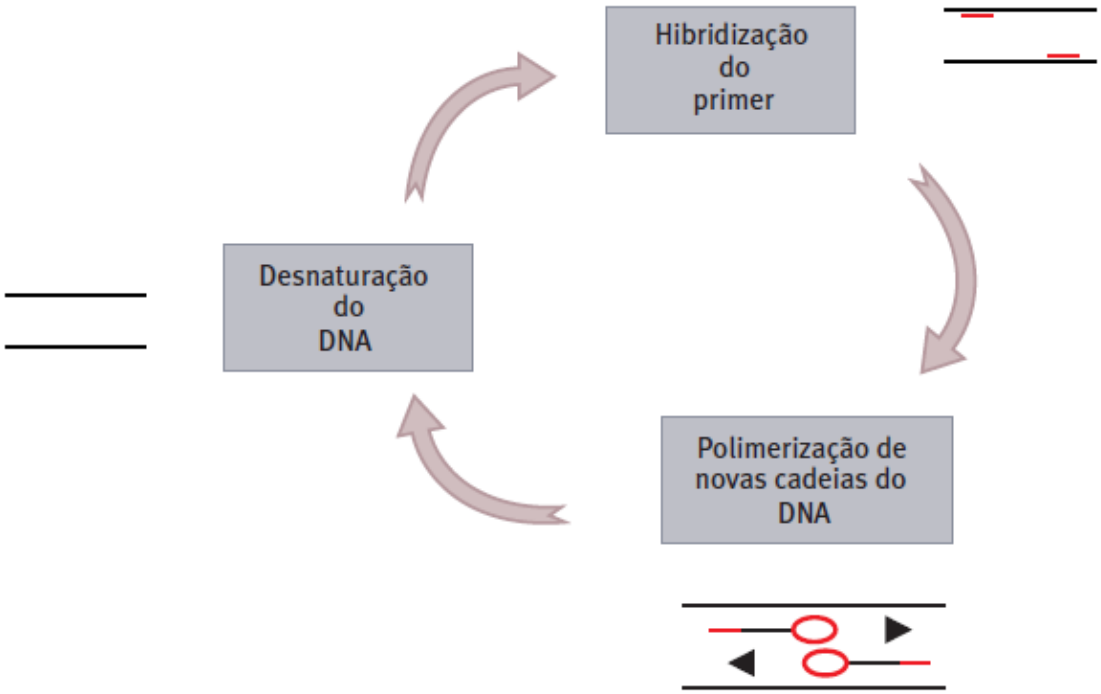


Figura 1. Esquema geral da reação de PCR

Com o passar do tempo, foram aparecendo variações permitindo assim diversas aplicações, como as análises genéticas com marcadores moleculares do tipo Rapid Amplified Polymorphic DNA (RAPD); Inter Sequence Simple Repeats (ISSR); Sequence Simple Repeats (SSR); Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Todas essas metodologias genéticas são muito úteis como ferramentas que auxiliam

programas de melhoramento genético. Um dos atributos do uso de marcadores moleculares visando um diagnóstico molecular é seu implemento para a geração de *fingerprintings* (impressãos digitais) que servem para identificar cultivares, animais etc, além de permitir análise de divergência genética entre elas. Outra aplicação do RAPD que gera diferentes *fingerprintings* de cultivares é o estudo de variações somaclonais gerado na cultura de tecidos vegetais *in vitro.*

Outras variações do PCR são o RT-PCR (Reverse transcription *PCR*), o RTqPCR (Real time quantitative *PCR*). O primeiro ocorre basicamente da mesma maneira que o PCR convencional, porém, após uma reação inicial de síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar), pois o RT-PCR amplifica transcritos gênicos (a partir do RNA mensageiro). Essa metodologia é importante quando se tem o objetivo de estudar a expressão de um determinado gene em um sistema biológico específico. A vantagem do RT-PCR para o diagnóstico molecular é que, além de selecionar um biomarcador com ela, também se pode inferir sobre a expressão de um dado transcrito gênico relacionando-o ao sistema como um biomarcador.

O RTqPCR é um processo semelhante, que pode ser realizado com DNA ou RNA inicial, porém a sua vantagem é que ele permite a quantificação do gene ou transcrito específico gerado em tempo real de forma bastante sensível e precisa, porque utiliza um corante que intercala nas cadeias dos fragmentos gerados no PCR (geralmente o Syber green) e que pode ser detectado por sensores do equipamento utilizado no PCR, permitindo a quantificação do aumento da concentração do fragmento gerado em tempo real. Essa metodologia pode relacionar genes como muito ou pouco expressos em um sistema ou quantidade do DNA presente na amostra analisada. É uma metodologia muito sensível e os trabalhos com ela hoje têm um grande impacto. É a metodologia por excelência para validar os estudos realizados em bibliotecas de cDNA ou microarranjos de DNA.

- **Southern e Northern blot**

A metodologia do Southern blot foi inventada pelo biólogo britânico Edwin Southern. Ela consiste na identificação da presença de um gene em um dado genoma. Também pode ser utilizada para estimar o número de cópias gênicas, para um gene específico, nesse genoma.

O embasamento teórico dessa metodologia reside na associação de várias metodologias e descobertas como: o tipo de corte de restrição gerado em DNA

genômico por diversas enzimas; a eletroforese; a transferência de fragmentos, utilizando-se o processo da capilaridade ou campo elétrico; a desnaturação da dupla cadeia de DNA com álcalis fortes; a complementariedade de sequências e preferência para hibridização específica; a marcação de nucleotídeos com átomos radioativos; a impressão de elétrons em filmes radiográficos (autorradiografia).

A metodologia do Northern blot foi batizada por Southern, pois consiste em uma análise similar ao Southern blot, porém realizada com RNA. As diferenças representam o gel de eletroforese que, nesse caso, é de glioxal ou formaldeído, e a etapa de desnaturação é omitida pelo fato dos RNA-m serem cadeia simples. Essa metodologia também tende a ser substituída pelos microarranjos de DNA em que se utiliza como sondas *pools* de cDNA diferentes marcados com diferentes fluoróforos e pela RTqPCR, já que essas técnicas também são capazes de detectar a expressão de um dado gene em um dado sistema, porém de maneira muito mais sensível. A detecção da expressão de um dado gene em um dado sistema é o principal resultado que a metodologia do Northern blot pode trazer para um diagnóstico molecular.

- **Western blot**

A metodologia do Western blot foi batizada por Southern, assim como o Southern e o Northern blot, é realizada para identificar especificamente genes. Nesse caso, o reconhecimento específico é de proteínas e, por isso, pode identificar apenas uma proteína que está presente em uma amostra heterogênea. Dessa maneira, a identificação específica protéica não é realizada no Western blot por meio de sondas e, sim, pelo reconhecimento específico com anticorpos monoclonais ou policlonais. O fundamento teórico dessa metodologia está na imunologia e o reconhecimento específico antígeno-anticorpo.

O Western blot é utilizado como ferramenta do diagnóstico molecular todas as vezes que permite o reconhecimento específico de uma dada proteína. Essa proteína, por exemplo, pode ser expressa em uma planta transgênica e assim confirma a expressão de um dado gene utilizado para transformá-la. Também pode ser uma proteína relacionada com alguma enfermidade seja vegetal, animal ou humana expressa no tecido, sangue, entre outros.

- **Elisa**

A metodologia do Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (Elisa), assim como o Western blot e a eletroforese em 2D constitui mais uma técnica utilizada para gerar um diagnóstico molecular tendo como base biomoléculas de proteínas. O fundamento teórico dessa metodologia é o mesmo do Western blot. Nela também se identifica uma proteína específica com anticorpos específicos desenvolvidos a ela.

Considerações finais

Como uma recaptulação geral, podemos dizer que as metodologias de preparação de bibliotecas genômicas, de cDNA (subtrativas ou não), os micorarranjos de DNA e a eletroforese em duas dimensões fornecem informações valiosas sobre biomarcadores em potencial para diversos sistemas biológicos sejam de origem DNA ou proteína. O sequenciamento de DNA ou proteína complementa a primeira informação e permite o desenho de primers específicos ao biomarcador.

E, finalmente, o PCR em suas várias modalidades bem como as metodologias do Southern blot, Northern blot, Western blot e Elisa oferecem a possibilidade de um diagnóstico molecular específico, seja para sequências gênicas ou protéicas. Todas essas metodologias são muito sensíveis. Praticamente a eleição de uma ou outra depende do custo, do conhecimento e da velocidade para a obtenção de resultados.

O ideal para o diagnóstico molecular é ter 100% de sensibilidade (detecção do biomarcador em quantidades ínfimas de matéria prima), 100% de reprodutibilidade, 100% de especificidade (que evita falsos positivos e negativos), 100% de distinguibilidade em um custo baixo, um tempo rápido e necessitando de pouca expertise para o operador. Porém, essa situação é utópica. Portanto, deve ser avaliado o que seja melhor caso a caso. Alguns problemas como reprodutibilidade podem ser resolvidos com análises em duplicata, triplicata e análises estatísticas, e a especificidade, que pode gerar falsos positivos ou negativos, pode ser resolvida com o uso de controles positivos e negativos no diagnóstico. Com relação ao custo, em geral, avalia-se e relaciona-se ao custo/benefício do diagnóstico, e o tempo e a conhecimento são aspectos em que há sempre novos estudos na tentativa de superá-los o máximo possível de modo a ter um diagnóstico mais barato e de fácil manipulação.

Na Tabela 1, apresentam-se as vantagens e desvantagens de algumas metodologias utilizadas no diagnóstico molecular para servir de tomada de decisão para cada caso.

Tabela 1. Resumo das principais características, vantagens e desvantagens das metodologias utilizadas no diagnóstico molecular.

Metodologia	Sensibilidade	Distinguibilidade	Reproducibilidade	Especificidade	Custo	Tempo para obtenção de resultados	Expertise
PCR RT-PCR	++++	++++	++++	++++	+	+	+
RAPD	++++	+++	+++	++	+	+	+
ISSR	++++	+++	+++	+++	++	+	+
SSR	++++	++++	++++	++++	++++	+	++
Southern blot Northern blot	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Elisa	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Wessern blot	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Microarranjos de DNA	+++++++	++++	++++	+++++	+++++	++	++++
RTqPCR	+++++++	++++	++++	++++	+++++	+	+++

Capítulo 4 - Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações

Introdução

O termo cultura de tecidos vegetais é utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas. A cultura de tecidos constitui uma importante ferramenta para estudos básicos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais, bem como para estudos aplicados, como micropropagação, produção de compostos secundários, transformação genética, manutenção de germoplasma *in vitro* e limpeza clonal (SMITH, 2000). O desenvolvimento da técnica tem uma longa historia. Os esforços iniciais se concentraram na compreensão dos vários aspectos do crescimento, desenvolvimento e diferenciação vegetal, do papel dos reguladores de crescimento, dos tipos de nutrientes necessários, entre outros fatores. Tão logo os princípios e métodos básicos foram estabelecidos (primeiro quarto do século XX), verificou-se o valor prático para a agricultura e para a indústria da propagação de plantas, bem como na conservação de germoplasma (RAZDAN, 2003). Atualmente, a cultura de tecidos desempenha papel importante nos métodos moleculares utilizados em biotecnologia. A base fundamental da cultura de tecidos é a capacidade de células, tecidos ou órgãos se desenvolverem e regenerarem plantas completas, idênticas a planta-mãe. A disponibilidade de métodos adequados de cultura de tecidos para um crescente número de espécies vegetais permite ampliar o leque de aplicações da biotecnologia vegetal.

Princípios da cultura de tecidos

O termo "*in vitro*" é um termo latino que significa "dentro do vidro". Dessa forma, em condições de assepsia, dentro de recipientes de vidro, sob o efeito de fatores químicos (meio de cultura) e físicos (luz e temperatura), um ambiente artificial e criado, visando proporcionar condições adequadas para o processo de desenvolvimento de células, tecidos e órgãos de plantas, previamente extraídos de uma planta completa (matriz). O efeito dessas intervenções pode induzir a diferenciação e a multiplicação de órgãos a partir de meristemas ou a desdiferenciação de tecidos determinados e a indução de formação de pré-meristemas (GAHAN; GEORGE, 2008).

O cultivo *in vitro* baseia-se nos seguintes princípios: totipotência e competência celular. A totipotência se refere ao potencial das células vegetais de reproduzirem um organismo inteiro uma vez submetidas a estímulo apropriado (HARBERLANDT,

1902). No entanto, para as células vegetais reagirem a esse estímulo, precisam apresentar competência celular, que se refere a capacidade das células em reagir a sinais específicos de desenvolvimento, ou seja, expressar o potencial inerente a sua carga genética.

A cultura de tecidos é comumente usada para descrever todos os tipos de cultura *in vitro* de plantas. Didaticamente, George et al. (2008) a separa em duas categorias de acordo com a organização do crescimento *in vitro*: (a) cultivos com crescimento organizado e (b) cultivos com crescimento não organizado.

a) *Cultivos com crescimento organizado*:

- Cultura de meristemas: cultura de ápices caulinares muito pequenos, consistindo do domo meristemático apical com ou sem primórdios foliares, com tamanho entre 0,1 mm e 0,3 mm, dependendo da espécie. Originam eixos caulinares unipolares.
- Cultura de ápices caulinares ou gemas: inicia-se a partir de gemas ou brotos de tamanho maior que os meristemas, contendo vários primórdios foliares, que são conduzidos de forma a produzir múltiplas brotações ou multigemas.
- Cultura de segmentos nodais: inicia-se a partir de gemas laterais existentes nos nós da planta, cada um tendo anexo um pequeno pedaço de tecido do ramo. Entrenós contendo uma ou várias gemas podem ser cultivados.
- Cultura de raízes isoladas: cultura de raízes desconectadas da parte aérea, resultando na produção de um sistema de raízes ramificadas.
- Cultura de embriões (resgate): embriões zigóticos são excisados e cultivados para dar origem a plântulas.

b) *Cultivos com crescimento não organizado:*

- Cultura de calos: indução do crescimento e manutenção de uma massa de células desorganizada, a partir do crescimento descoordenado de pequenos órgãos, pedaços de tecidos ou de células previamente cultivadas.
- Culturas em suspensão: cultura de populações de células individuais e pequenos grupos de células, dispersas em meio liquido sob agitação e aeração.
- Cultura de protoplastos: cultura de células vegetais, sem parede celular.
- Cultura de anteras e pólen: cultura de anteras completas contendo micrósporos imaturos, com o objetivo de formar embriões somáticos diretamente sobre o pólen, ou algumas vezes por organogênese passando pela fase de calo.
- Cultura de pólen: culturas iniciadas de grãos de pólen que foram removidos das anteras.

O processo de desenvolvimento de uma nova plântula pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática. Os fatores que influenciam na determinação da rota morfogenética são: o tipo de explante escolhido, estágio fisiológico da planta e o ambiente do meio de cultura (reguladores de crescimento, nutrientes, luz, etc). A organogênese e o processo de formação de uma nova plântula, a partir de um explante, já, na embriogênese somática, ocorre a formação de embriões a partir de células somáticas, sem a fecundação zigótica. Ambas as rotas podem ocorrer de forma direta ou indireta. O processo de organogênese/embriogênese direta ocorre quando as plântulas/embriões surgem a partir de meristemas pré-existentes nos tecidos do explante, enquanto pela via indireta, ocorre primeiro a formação de calos, seguida da formação de meristemóides e finalmente plântulas/embriões (ANDRADE, 2002). O esquema simplificado da cultura de tecidos pode ser visto na Figura 1.

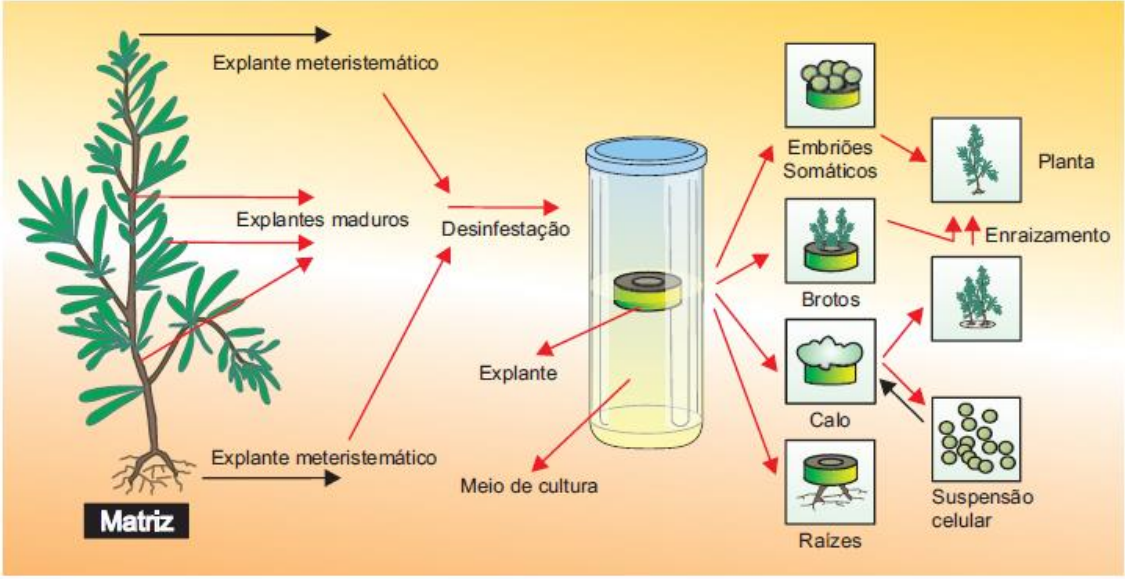


Figura 1. Etapas da cultura de tecidos.

Aplicações da cultura de tecidos

Baseado na disponibilidade das várias técnicas *in vitro* já citadas, a partir de meados da década de 1960 houve um significativo crescimento das aplicações da cultura de tecidos em pesquisas nos campos da biologia, agricultura e engenharia florestal. As aplicações na agropecuária podem ser divididas em cinco áreas: (a) melhoramento genético: (b) limpeza clonal; (c) conservação de germoplasma; (d) propagação clonal; e (e) produtos do metabolismo secundário.

Melhoramento genético

O papel da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas tem sido reconhecido de forma crescente. Variações herdáveis podem ser observadas nas colônias de células ou em plantas regeneradas *in vitro*, as quais podem posteriormente se expressar por meio de reprodução vegetativa ou sexual. Métodos *in vitro* têm sido usados de forma crescente em associação com os métodos tradicionais de melhoramento de plantas. As principais aplicações da cultura de tecidos são destacadas abaixo.

Geração de variabilidade genética

Pesquisas pioneiras sobre cultura de tecidos mostraram que células cultivadas *in vitro* durante longos períodos podem apresentar variações genéticas inéditas. Muitos pesquisadores têm confirmado que um tecido é um mosaico de diferentes tipos de células. Algumas delas, quando cultivadas separadamente, produzem colônias organizadas, enquanto outras regeneram plantas frequentemente afetadas por variações morfológicas. Em virtude disso, as culturas *in vitro* são fontes diretas de variabilidade genética. Estudos citogenéticos de células cultivadas *in vitro* revelaram mitose anormal, o que é uma das causas da variabilidade. Números de cromossomos instáveis resultam em variabilidade na cultura de tecidos, possibilitando a seleção de variantes (RAZDAN, 2003).

A cultura de células tem desempenhado papel importante no melhoramento de plantas, uma vez que permite o isolamento de variantes somaclonais (FLICH, 1983). Embora a produção de variantes por cultura de tecidos seja conhecida desde longa data, foi somente nos anos 1970 que passou a ser utilizada no melhoramento de plantas.

A variação somaclonal é dependente da variação natural que ocorre numa população de células, podendo ser pré-existente ou induzida pela cultura *in vitro*, e é usualmente observada nas plantas regeneradas (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). A variação pode ser genética ou epigenética, sendo complexa quanto à origem (LARKIN et al., 1985; SCOWCROFT et al., 1987). As variações observadas nas plântulas regeneradas podem ter importância agrícola. É também possível produzir um amplo espectro de células mutantes em cultura (JACOBS et al., 1987), nas quais incluem-se células apresentando diferenças bioquímicas, algumas conferindo características uteis do ponto de vista econômico como resistência a herbicidas, antibióticos e estresses.

A seleção *in vitro*, mediante a aplicação de um agente seletivo na presença do mutante, permite a seleção de plantas com sistemas de desenvolvimento alterados, podendo manifestar resistência a sais, produtos químicos e toxinas. Entretanto, somente

em poucos casos, tem sido possível regenerar plantas com as características desejáveis, por exemplo, plantas de fumo resistentes a herbicidas e *Datura inóxia* resistente ao metil-triptofano (SMITH, 2000).

Indução de haploidia

A aplicação da cultura de tecidos na produção de haplóides tem chamado a atenção pelo seu potencial de uso no melhoramento de plantas. Normalmente, as células somáticas de plantas superiores têm número de cromossomos diplóide, enquanto células reprodutivas (gametas) são haploides. Guha e Maheswari (1966) cultivaram anteras imaturas de *Datura innoxia* (*Solanaceae*) e foram capazes de gerar embrióides e plântulas. Essas plântulas tornaram-se haplóides.

Aparentemente elas surgiram a partir de micrósporos dentro das anteras; isso abriu o caminho para a androgênese. Bourgin e Nitsch (1967) confirmaram a totipotência dos grãos de pólen conseguindo regenerar plantas haplóides completas de tabaco, arroz e trigo.

Evidências experimentais indicam que as populações de pólen são praticamente dimórficas e que somente aqueles grãos de menor tamanho são capazes de formar haplóides. Esses tipos de grãos de pólen ocorrem em baixa frequência e aparentemente são diferentes da maioria daqueles destinados a formação de gametas (GEORGE et al., 2008).

A indução de plantas haplóides a partir de ovários e óvulos não polinizados (ginogênese) e outro avanço na cultura de tecidos. San e Gelebart (1986) relataram seu primeiro resultado em cultura *in vitro* de ovário isolado de *Hordeum vulgare* e, subsequentemente, muitos outros pesquisadores obtiveram plantas haplóides ginogênicas de ovários e óvulos cultivados *in vitro* de tabaco, trigo, arroz, lírio, milho e outras plantas (THOMAS et al., 1999). Isso demonstra que não somente o micrósporo, mas também o megásporo ou gametófito feminino de angiospermas podem ser cultivados *in vitro* até o desenvolvimento esporofítico, abrindo uma via alternativa para o melhoramento de plantas por meio de haplóides (SMITH, 2000).

O valor dos haplóides é grande nos programas de melhoramento, uma vez que eles podem ser utilizados para detectar mutações e para recuperar combinações genéticas únicas, tendo em vista que, por meio dos haplóides duplicados, regeneram-se plantas completamente homozigotas, onde se visualiza a expressão de alelos recessivos, o que tem grande aplicação nos estudos genômicos. Além disso, a produção de duplos

haplóides tem permitido a produção de híbridos e sua integração em programas de melhoramento.

Hibridação somática

Isolamento, regeneração e fusão de protoplastos (células cuja parede celular foram digeridas) de plantas *in vitro* são tecnologias com potencial para manipulação genética. A hibridação somática, uma hibridação assexual que utiliza protoplastos somáticos isolados (Figura 2), é uma ferramenta a mais no melhoramento de plantas (RAZDAN, 2003). O produto da fusão de dois protoplastos (heterocarion) pode ser cultivado para regenerar um híbrido somático com o genótipo desejado. A técnica de hibridação somática evoluiu tremendamente após se ter demonstrado a viabilidade de isolar um largo número de protoplastos por meio da incubação de uma pequena quantidade de tecido com a enzima celulase.

Protoplastos isolados entram em processo de divisão celular e regeneram plantas (NAGATA; TAKEBE, 1971), comprovando a totipotência em protoplastos. Centenas de espécies de angiospermas podem ser regeneradas a partir de protoplastos (BINDING, 1986). A possibilidade de fundir protoplastos de plantas por métodos químicos (por exemplo, PEG) e físicos (por exemplo, eletrofusão) permite a produção de híbridos somáticos. A fusão de protoplastos comprovou ser uma forma de se obter híbridos somáticos entre plantas sexualmente incompatíveis. O maior gargalo na técnica de fusão de protoplastos e a regeneração de plantas a partir das células híbridas (EVANS et al., 1984; SCHIEDER; KOHN, 1986).

A fusão de protoplastos tem sido utilizada para produzir combinações núcleo-citoplasma únicas. Como exemplo, pode-se citar a combinação de cloroplastos de *Brassica campestris* que codificam para resistência a atrazina (obtida de protoplastos) com protoplastos de *Brassica napus* possuindo citoplasma de *Raphanus sativus* (que confere macho esterilidade a partir de sua mitocôndria). As plantas selecionadas continham núcleo de *B. napus*, cloroplastos de *B. campestris* e mitocondria de *R. sativus*; tinham as características desejadas em um fenótipo de *B. napus*; e são atualmente utilizadas para a produção de sementes hibridas (CHETRIT et al., 1985).

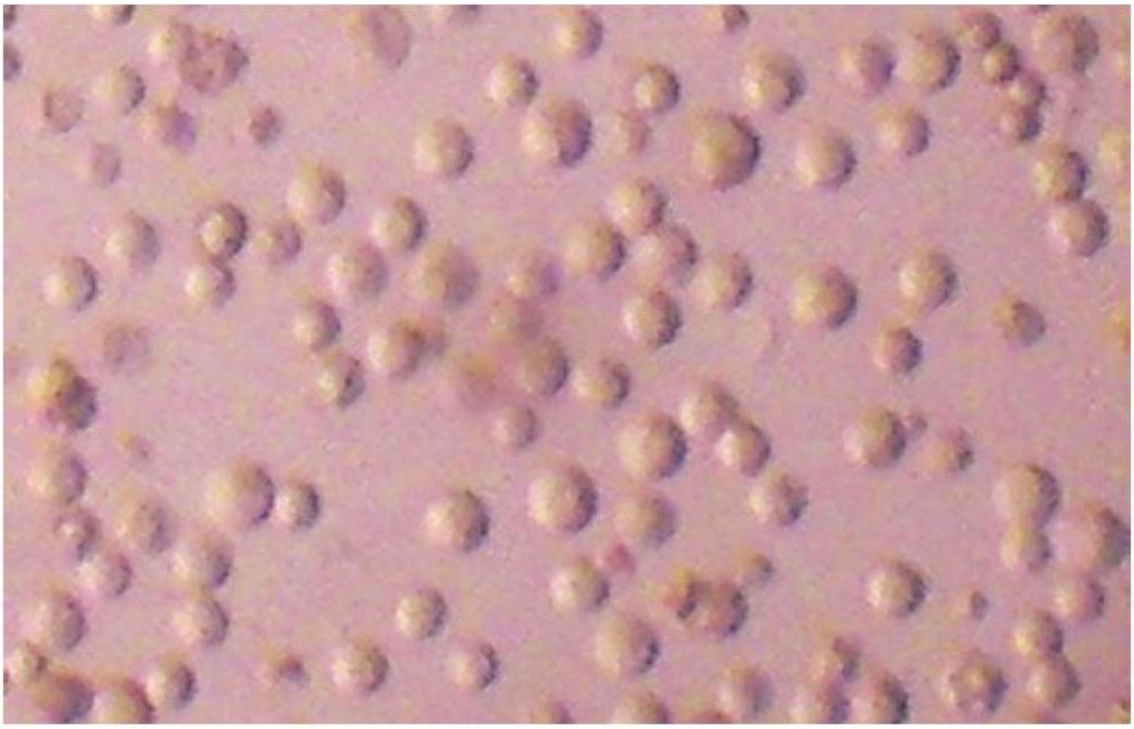


Figura 2. Protoplasto de bananeira

Transformação genética

A atual importância da transformação genética de células por meio da introdução de DNA exógeno tem gerado enorme interesse pelas técnicas de regeneração oferecidas pela cultura de tecidos. A transformação genética consiste basicamente de quatro passos: inserção, integração, expressão e replicação do DNA exógeno dentro da célula hospedeira (TORRES et al., 1998).

O princípio da transformação é baseado no mecanismo de infecção por vírus. Desde 1976, muitos trabalhos têm relatado que vários genes eucarióticos introduzidos em bactéria são capazes de expressar sua atividade específica no hospedeiro e que isso possibilita obter uma transformação similar de células eucarióticas. Na natureza, *Agrobacterium tumefaciens* pode transferir informação genética para células de plantas na forma de um plasmídeo que promove formação tumoral (galha). Usando a tecnologia do DNA recombinante, foi possível introduzir o gene para resistência a kanamicina no DNA do plasmídeo do *A. tumefasciens*, e o plasmídeo modificado foi posteriormente incorporado em protoplastos de tabaco. Plantas do tabaco transformado expressaram resistência a kanamicina. Atualmente tem-se obtido êxito em modificar geneticamente plantas por meio da introdução de outros genes uteis, como resistência a insetos, ervas daninhas, herbicidas, doenças, ou para estudos do mecanismo da ação genica.

Plantas geneticamente modificadas podem ser obtidas por métodos vetores-dependentes (transformação indireta) ou vetores-independentes (transformação direta). A transformação genética de plantas por transferência direta de DNA por meio de métodos vetores-independentes pode ser utilizada para transformar protoplastos e células bacterianas, e incluem eletroporação (POTRYKUS et al., 1985), fusão de lipossoma (DESHAYES et al., 1985), microinjeção (CROSSWAY et al., 1986), bem como bombardeamento de micro partículas (biolística) (KLEIN et al., 1987). O método da biolistica pode ser executado com células, tecidos e órgãos.

Limpeza clonal

A habilidade de eliminar vírus, bactérias e fungos de plantas por cultura de meristemas tem sido utilizada desde a década de 1960. A técnica começou quando White (1934) observou que subcultivos de raízes infectadas com vírus frequentemente resultavam em culturas que eram isentas do vírus. Isso mostrou que, mesmo em plantas infectadas, as células das extremidades meristemáticas ou são livres do vírus ou possuem uma concentração muito pequena do mesmo. Fato que se dá porque os tecidos meristemáticos não sendo vascularizados dificultam o acesso do vírus, que necessita dos vasos para se movimentar de forma sistêmica na planta. A técnica é particularmente importante para espécies de propagação vegetativa e quando o material vegetal está infectado por vírus (BHOJWANI; RAZDAN, 1983). A cultura de meristemas é frequentemente associada com termoterapia ou quimioterapia para a erradicação de vírus na limpeza clonal (RAZDAN, 2003).

Conservação de germoplasma

Tradicionalmente, os germoplasmas de plantas cultivadas têm sido mantidos na forma de materiais propagativos como sementes, tubérculos, raízes, bulbos, rizomas, gemas, estacas, etc. Canteiros, estufas e casas de vegetação são outras formas de se manter os germoplasma ou bancos genéticos. Entretanto, algumas dificuldades podem ser encontradas na utilização dessas formas de conservação. Entre elas, está o fato de que importantes espécies produzem sementes recalcitrantes, com degeneração rápida do embrião (SMITH, 2000). Além disso, a manutenção de coleções a campo pode ser cara e ter como desvantagem o fato de as plantas serem vulneráveis a insetos, patógenos e variações do clima. Milhares de espécies de plantas superiores são consideradas ameaçadas de extinção e necessitam ser mantidas em bancos de germoplasmas visando a preservação e a utilização de fontes de genes para futuros projetos de melhoramento

genético. A habilidade de regenerar plantas completas a partir de células embrionárias e gaméticas, e ápices caulinares, tem levado ao seu uso na conservação de germoplasma (RAZDAN, 2003) (Figura 3).

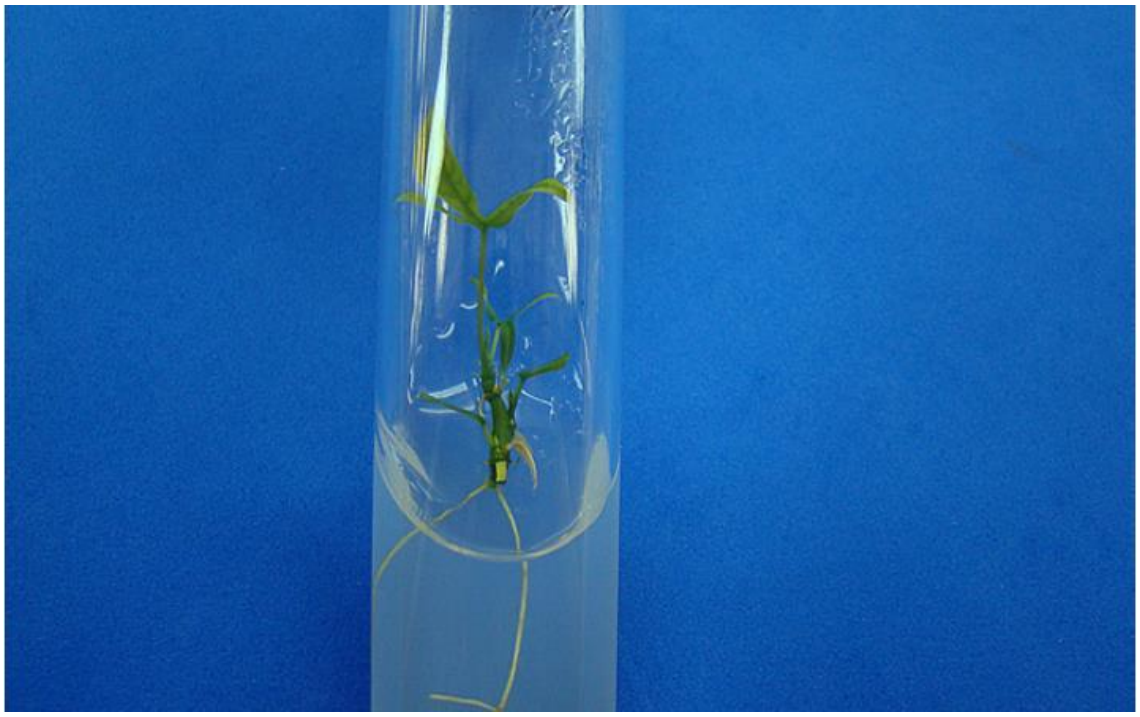


Figura 3. Conservação *in vitro* de mandioca

Três técnicas *in vitro* têm sido desenvolvidas a partir do uso de componentes que retardam o crescimento (por exemplo: hidrazida málica, B995, e ABA; Dodds, 1989), baixas temperaturas (1 °C a 9 °C; RAZDAN, 2003), e criopreservação (KARTHA, 1981). Nessa ultima técnica, suspensões celulares, ápices caulinares, embriões assexuais e plântulas jovens, após o tratamento com um "crioprotetor", são congelados e conservados em baixas temperaturas (-196 °C), em nitrogênio liquido (KARTHA, 1981; WITHERS, 1985). A cultura de tecidos é considerada como uma forma efetiva de conservação de germoplasma, desde que a manutenção do germoplasma *in vitro* seja viável economicamente em relação as demais alternativas.

Propagação clonal (micropropagação)

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

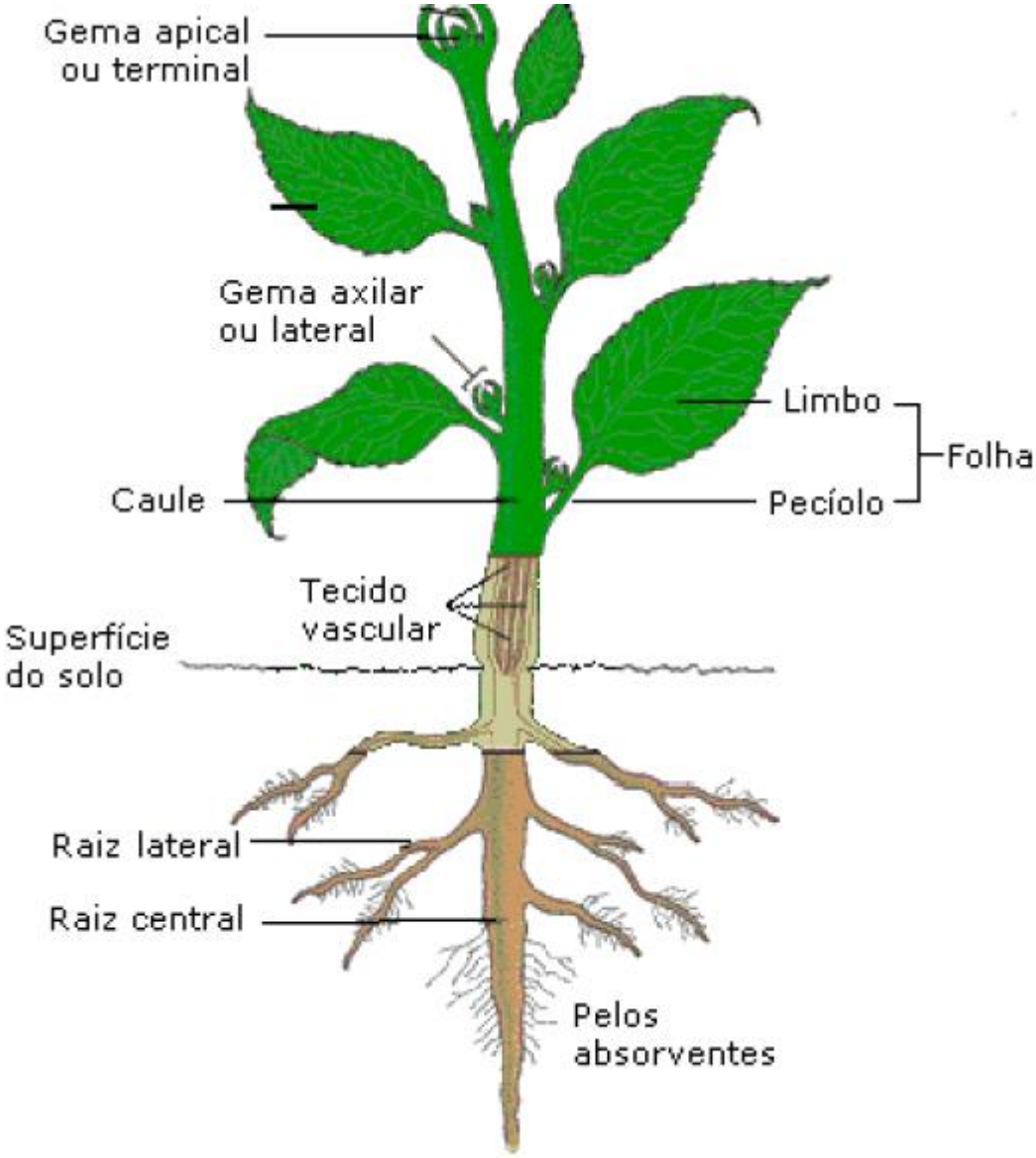


Figura 4. As diversas partes de uma planta angiosperma

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

1. Estabelecimento de uma cultura asséptica

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

2. Multiplicação

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

3. Preparação das plântulas para a transferência ao solo.

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

4. Aclimatação

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

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

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

O uso da cultura de tecidos para propagação vegetativa de plantas é a aplicação mais largamente utilizada dessa tecnologia. Ademais, tem sido bem sucedida em todas as classes de plantas (GEORGE et al., 2008). Há três formas por meio das quais a micropropagação pode ser realizada. Essas são: (i) a intensificação da quebra de dormência de gemas axilares; (ii) produção de gemas adventícias diretamente ou indiretamente sobre calos; e (iii) embriogênese somática direta ou indireta sobre explantes (MURASHIGE, 1974, 1978).

O uso exógeno de citocininas no meio de cultura libera as gemas da dominância apical tanto no ramo original, como nos subsequentes ramos laterais que são formados. Consequentemente numerosas brotações são formadas (Figura 5).

Figura 5. Micropropagação de bananeira

Após sucessivos subcultivos sob efeito do adequado balanço de reguladores de crescimento para multiplicação *in vitro*, os explantes são enraizados e aclimatados, dando origem a plantas completas que são utilizadas como material propagativo de qualidade superior por serem livres de patógenos, serem geneticamente uniformes e fisiologicamente mais ativas (Figura 6).

Figura 6. Mudas micropropagadas de abacaxi em aclimatação

Esse método de propagação é explorado intensivamente na horticultura e na indústria de mudas para a propagação clonal de muitas espécies dicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas. A micropropagação tem sido crescentemente utilizada na produção de material propagativo de espécies ornamentais (SANTOS, 2009), fruteiras, como a bananeira (MATSUMOTO; SILVA NETO, 2003), e florestais, como *eucaliptus* e *pinus* (ARENHART; ZAFFARI, 2008). A limitação de uma aplicação mais ampla da micropropagação reside no custo de produção, que ainda se apresenta alto para algumas espécies.

Os itens que mais oneram os custos são a necessidade do uso intensivo de mão-de-obra para as repicagens e as perdas por contaminação, que podem ser muito altas dependendo da espécie e da infraestrutura laboratorial disponível.

Com vistas a superar problemas de custo e a falta de adaptação de algumas espécies, sobretudo as lenhosas, as metodologias de organogênese anteriormente relatadas, a embriogênese somática tem sido utilizada em sistemas direcionados a propagação massal de plantas (NOMURA; KOMAMINE, 1985). A rápida multiplicação de embriões somáticos (Figura 7) é possível em bioreatores automatizados, diminuindo sensivelmente o custo de produção de plantas clonadas *in vitro* devido ao efeito escala e redução de custo em mão-de−obra (TEIXEIRA, 2002). Esses embriões somáticos podem, ainda, ser encapsulados individualmente para uso como "sementes sintéticas" (TEIXEIRA; TORRES, 1999). Diferentes tipos de bioreatores têm sido testados e usados com sucesso para aumentar a escala da embriogênese (GEORGE et al., 2008).

Figura 7. Embriões somáticos de café (*Coffea arábica)*

Por meio de gemas axilares, alcança-se o menor numero de plântulas, mas elas são geralmente geneticamente mais padronizadas, enquanto a embriogênese somática tem o potencial para produzir quantidade infinitamente superior de plântulas, mas comparativamente é viável em menor número de espécies. Comercialmente, numerosas espécies são produzidas, principalmente via cultivo de gemas axilares (MURASHIGE, 1990; MATSUMOTO; SILVA NETO, 2003). Existem protocolos de larga escala para outras classes de plantas, incluindo culturas agrícolas e florestais, mas o custo de produção é o fator limitante para a ampliação do seu uso comercial (ZIMMERMAN, 1986). A evolução dos estudos de embriogênese somática associados e seu cultivo em bioreatores para um maior numero de espécies tenderá a viabilizar comercialmente a micropropagação em larga escala (Figura 8).

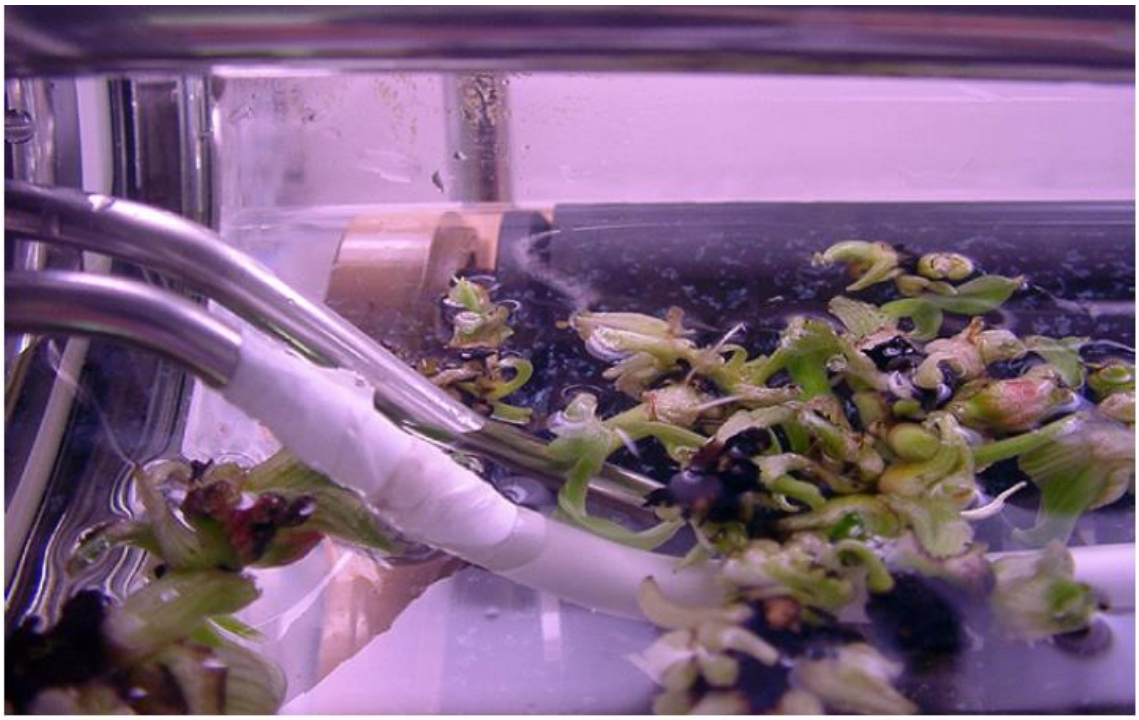


Figura 8. Explantes de bananeira (*Musa* spp.) sendo cultivados em bioreator.

Produção de metabólitos secundários

As plantas superiores produzem uma grande quantidade de substancias química, as quais podem ser de interesse farmacêutico e industrial. A primeira tentativa de cultivar células em larga escala para a produção de fármacos foi na década de 1950, na companhia Pfizer, com pouco sucesso inicialmente. Entretanto as pesquisas permitiram que a partir de 1978 a técnica fosse considerada viável, com base em pesquisas feitas na Alemanha e Japão, principalmente (ZENK, 1978).

Muitos dos produtos químicos vegetais considerados importantes têm possibilidade de serem formados em cultura de células vegetais. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade de metabólitos secundários. Estes incluem a clonagem de células e seleção repetida de linhagens altamente produtivas a partir de populações de células heterogêneas (ZENK, 1978; DOUGALL, 1987) e pelo uso de Elisa e técnicas de radioimunoensaio (KEMP; MORGAN, 1987). Outra metodologia envolve a seleção de linhas mutantes de células superprodutoras do produto desejável (WIDHOLM, 1987). Da mesma forma que fatores abióticos, como radiação UV, exposição ao calor ou frio, e sais de metais pesados e estimulantes de natureza vegetal ou microbiológica têm sido utilizados para melhorar a produtividade de produtos secundários (EILERT, 1987; KURZ, 1988).

O fator principal para o sucesso da produção em escala comercial de substancias biologicamente ativas é a capacidade de crescer células em larga escala. Isso tem sido conseguido com o uso de bioreatores sob agitação e vários tipos de bioreatores com sistemas de ar forcado (FOWLER, 1987). Para muitos sistemas, o processo de cultivo em dois estágios (ou duas fases) tem sido testado (BEIDERBECK; KNOOP, 1987; FOWLER, 1987). No primeiro estagio, rápido crescimento de células e acumulação de biomassa é enfatizado, enquanto, no segundo estágio, focaliza-se a síntese de produto com mínima divisão celular. Fujita e Tabata (1987) relataram a produção comercial em larga escala do metabólito secundário shikonina, que é um derivado da naftoquinona com ação similar a da insulina, por cultura de células.

As pesquisas continuam sendo realizadas com novas espécies vegetais e outras tecnologias, e podem ser viabilizadas a medida que as pesquisas avancem.

Os meios de cultura

O meio de cultura inclui água, uma fonte de carbono, substâncias inorgânicas (sais minerais), vitaminas, hormônios e fatores reguladores do crescimento (Ver Tabela 1). Alguns destes componentes podem ser substituídos por misturas pouco definidas, mais econômicas ou simples de manipular (água de coco, suco de tomate, suco de laranja). Geralmente, o pH do meio varia entre 5,0 e 6,5.

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

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

Tabela 1: Os componentes do meio de cultura para células vegetais.

Componentes	**Características e exemplos**
Água destilada	Representa 95% do meio nutriente.
Fonte de carbono	Geralmente se utiliza sacarose. A fonte de carbono é necessária porque os explantes não são totalmente autotróficos e a fotossíntese *in vitro* não supre as necessidades das células.
Substâncias inorgânicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) e microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), em uma proporção que depende da planta escolhida.
Vitaminas	Mioinositol, vitamina B1 (tiamina), ácido nicotínico (niacina), vitamina B6 (piridoxina), pantotenato de cálcio, ácido fólico, vitamina B2 (riboflavina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina H (biotina), ácido para-aminobenzoico e vitamina E (tocoferol).
Hormônios e reguladores de crescimento	<u>Auxinas</u> Estas promovem o alongamento celular, a formação de calos e de raízes adventícias; inibem a formação de brotos axilares adventícios e, às vezes, a embriogênese em suspensões celulares. Exemplos: IAA (ácido indolacético), NAA (ácido naftalenoacético), IBA (ácido indolbutírico), 2,4 D (2,4-diclorofenoxiacético).
	<u>Citocininas</u> Estas promovem a divisão celular, regulam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais. Exemplos: cinetina, 2iP (2-isopentiladenina), BAP (benzilaminopurina), zeatina. <u>Outras substâncias</u> Exemplos: giberelinas, ácido abcíssico, etileno.
Misturas de substâncias pouco definidas	Exemplos: extrato de levedura, extratos vegetais, hidrolisados de caseína, peptona e triptona. A tendência atual em pesquisa

	é de substituí-los por meios de composição definida.
Materiais inertes	Utilizados como suporte. Exemplos: ágar, agarose, outros polissacarídeos (Gelrite, Phytagel), lã de vidro, papel de filtro, areia, esponjas de poliestireno.

Considerações finais

A ferramenta biotecnológica da cultura de tecidos vegetais tem papel relevante em várias linhas de pesquisa de natureza básica e aplicada, e seu uso tem sido largamente empregado na indústria da propagação de plantas. Isso confere ao sistema produtivo de muitas espécies agrícolas e florestais vantagens qualitativas do ponto de vista genético e fitopatológico, resultando em maior produtividade com menor demanda por defensivos, refletindo nos custos e na sustentabilidade econômica e ambiental do sistema produtivo. As técnicas de melhoramento genético por transgenia têm na cultura de tecidos uma ferramenta básica, sem a qual não se alcança a regeneração da planta transgênica completa e funcional a partir da célula geneticamente modificada. Muitas outras metodologias importantes no campo da cultura de tecidos vegetais têm sido diariamente implementadas e tem trazido novas possibilidades para o desenvolvimento e aplicação da biotecnologia na agropecuária. A intensificação das pesquisas no campo da cultura de tecidos possibilitara a aplicação dos benefícios acima mencionados em um maior número de espécies vegetais, incluindo muitas das espécies nativas brasileiras, que até o momento foram pouco estudadas.

Capítulo 5 - Melhoramento genético de plantas e biotecnologia

Introdução

Segundo seu conceito amplo, a biotecnologia é o uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade. Conceitualmente, o melhoramento de plantas não deixa de ser uma biotecnologia, como ciência que visa a modificação genética das plantas para torná-las mais uteis ao homem.

O melhoramento de plantas pode ser definido de forma clássica como a ciência e/ou a arte de modificar as plantas para o benefício humano (BOREM, 1998; BERNARDO, 2002). Trata-se de uma ciência multidisciplinar que aplica os princípios da genética para o desenvolvimento de cultivares melhorados para utilização humana e animal, utilizando-se de conhecimentos de agronomia, botânica, genética, genética molecular, citogenética, fisiologia, patologia, entomologia, bioquímica e estatística (SCHLEGEL, 2003).

Após a descoberta da hereditariedade por Gregor Mendel em 1865, novas e grandes descobertas como a heterose, a mutagênese, a genética quantitativa, avanços na fisiologia e bioquímica, a cultura de tecidos, a bioinformática e os avanços na genética e biologia molecular tiveram influência direta e muito positiva no melhoramento de plantas.

Nas últimas décadas, surgiram inúmeras tecnologias baseadas em análises do DNA e na sua manipulação controlada e intencional por meio das técnicas de engenharia genética. Essas tecnologias abriram novas possibilidades para o melhoramento genético por romperem a barreira de cruzamentos entre diferentes espécies estabelecidas pela compatibilidade sexual. Mediante a engenharia genética, é possível transferir, para plantas, genes isolados de plantas de outras espécies ou mesmo de microrganismos e animais, aumentando o conjunto gênico disponível para cada programa de melhoramento.

Neste capítulo, é apresentado um pouco da história e da importância do melhoramento genético vegetal para a humanidade, abordando aspectos gerais e exemplos do melhoramento clássico e do melhoramento baseado em técnicas da biotecnologia moderna relacionadas à engenharia genética.

História do melhoramento genético de plantas

Podemos dizer que o melhoramento de plantas nasceu com o início da agricultura, há aproximadamente 10.000 anos. A agricultura incentivou a prática empírica do melhoramento de plantas pelos primeiros agricultores, os quais selecionavam sementes das melhores plantas para estabelecer novos plantios com melhor qualidade e maior produtividade. Esse processo possibilitou a domesticação de várias espécies de plantas pelo homem (Figura 1).

Figura 1. Ilustrações da origem do melhoramento genético, do processo de domesticação das plantas e de alterações no tamanho da espiga e da arquitetura da planta do milho e do tamanho do fruto do maracujá decorrentes do melhoramento genético.

Como ciência, o melhoramento de plantas começou logo após a redescoberta das leis de Mendel no começo do século XX. Desde então, vem evoluindo em diferentes áreas, permitindo aos melhoristas aumentarem a eficiência na seleção e explorarem mais racionalmente os recursos genéticos. Dos primórdios da agricultura até hoje, o melhoramento passou por muitas modificações no exercício da sua prática, mas poucas mudanças foram observadas, nos últimos 50 anos, em seus princípios fundamentais de geração de variabilidade (BOREM; MILACH, 1999).

Com o avanço da ciência, o melhoramento de plantas passou a possibilitar aos melhoristas a criação de novos tipos de plantas, pela modificação dirigida e controlada dos caracteres hereditários de interesse. Hoje, vários cultivares de várias espécies são desenvolvidas a cada ano com características de alta produtividade, qualidade, resistência a estresses bióticos e abióticos, adaptabilidade, etc. Logicamente, os altos rendimentos das culturas atualmente utilizadas na produção agrícola mundial somente foram possíveis com a ajuda do melhoramento do ambiente para as plantas, sendo exemplos a correção da acidez e fertilidade dos solos, a irrigação, o controle fitossanitário e das plantas invasoras entre outras praticas de manejo fitotécnico.

Estima-se que a contribuição do melhoramento de plantas ao nível mundial responde por cerca de 50% dos aumentos em produtividade nas espécies cultivadas (FEHR, 1984).

O melhoramento genético convencional

O melhoramento genético clássico possibilita a criação de novas combinações de genes por diferentes métodos, desenvolvidos e aperfeiçoados no último século (BOREM, 1997), utilizando-se o cruzamento sexual entre plantas da mesma espécie e, quando possível, entre plantas de espécies próximas geneticamente. Por meio desse cruzamento, é possível combinar características desejáveis presentes em diferentes plantas. As atividades de melhoramento envolvendo a combinação de características e a fixação dos genes de interesse em novos cultivares são feitas em sucessivas gerações envolvendo a recombinação e seleção gênica baseada no fenótipo.

Esse processo de desenvolvimento de uma nova variedade ou cultivar é um processo lento que pode demorar uma década ou mais. Nas primeiras gerações de melhoramento, milhares de plantas são obtidas por meio de cruzamentos; testadas e ao longo das gerações, as plantas com características desejáveis (produtividade, resistência a doenças, adaptabilidade, etc.) são selecionadas, culminando com o lançamento de um novo cultivar (Figura 2). Essas atividades possibilitaram um notável avanço do melhoramento genético de plantas nos últimos 100 anos.

Os cultivares de plantas de diferentes espécies cultivadas foram desenvolvidas, em sua grande maioria, com base na seleção fenotípica de características de interesse econômico. Essa tarefa torna-se complexa e menos eficiente quando a característica de interesse é controlada por vários genes (característica quantitativa), geralmente com pequeno efeito e significativa influência ambiental. Não obstante, os programas de melhoramento genético têm tido sucesso no desenvolvimento de cultivares superiores para características qualitativas e quantitativas. Esse sucesso pode ser atribuído, entre outros fatores, a combinação de métodos clássicos de melhoramento genético, avaliação do fenótipo em diferentes anos e ambientes, e a sistemas sofisticados de experimentação, fitotecnia, estatística e estratégias de seleção (FERREIRA; FALEIRO, 2008).

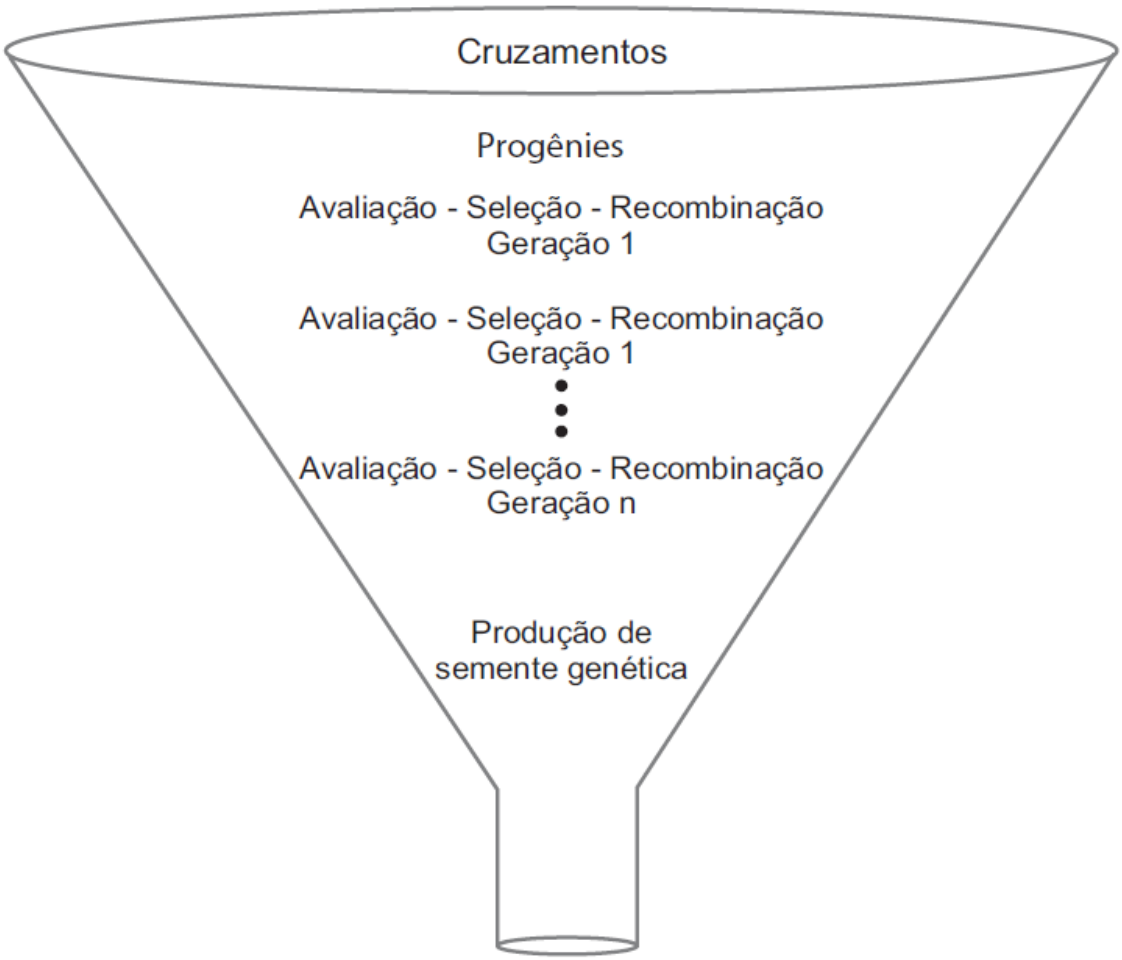


Figura 2. Ilustrações do processo de avaliação, seleção e recombinação de plantas com características desejáveis ao longo de sucessivas gerações de melhoramento, culminando com o lançamento de uma nova cultivar.

O melhoramento auxiliado pela biotecnologia

De um modo geral, as técnicas relacionadas à biotecnologia como a cultura de tecidos, marcadores moleculares, análises do DNA e engenharia genética, além de aumentarem a disponibilidade de genes desejáveis, tem auxiliado o melhoramento genético das plantas, tornando o processo mais rápido, preciso e eficiente.

A cultura de tecidos, por meio das técnicas de micropropagação, produção de di-haplóides, cultura de anteras e cruzamentos interespecíficos pela fusão de protoplastos, tem sido uma ferramenta interessante.

As técnicas de melhoramento genético por engenharia genética têm na cultura de tecidos uma ferramenta básica, sem a qual não se alcança a regeneração da planta transgênica completa e funcional a partir da célula geneticamente modificada. Muitas outras metodologias importantes no campo da cultura de tecidos vegetais têm sido diariamente implantadas e têm trazido novas possibilidades como ferramenta auxiliar para o melhoramento genético.

Marcadores moleculares e análises do DNA estão, a cada dia, sendo utilizados de maneira rotineira nos programas de melhoramento genético, auxiliando nas diferentes fases do programa, desde a caracterização da variabilidade genética do germoplasma, passando por diferentes atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento.

A engenharia genética tem aberto novas possibilidades para o melhoramento genético, sendo exemplos o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro resistentes ao vírus-do-mosaico dourado, cultivares de mamoeiro resistentes ao vírus-da-mancha-anelar, cultivares de milho, soja e algodão resistentes a insetos, cultivares resistentes a herbicidas para reduzir custos e facilitar o manejo da cultura, cultivares tolerantes a condições adversas como seca, frio, geada, alcalinidade e acidez do solo, cultivares de alimentos com melhor qualidade nutricional, etc. Com a engenharia genética, o conjunto gênico disponível para o melhorista foi ampliado. Essa possibilidade traz a esperança de equacionar problemas de certas culturas, os quais não teriam solução utilizando apenas a variabilidade genética limitada pela compatibilidade sexual intraespecífica ou entre espécies relacionadas.

Planejamento de programas de melhoramento

O planejamento e as decisões sobre as estratégias a serem utilizadas em programas de melhoramento são tão importantes quanto a sua execução propriamente dita. As principais etapas do planejamento de programas de melhoramento de plantas são descritas por Borém (1998); e Ribeiro Junior et al. (2008) fazem uma discussão dessas etapas, incluindo um estudo de caso sobre melhoramento genético do trigo (RIBEIRO JUNIOR et al. 2006). O primeiro passo estratégico de um programa de melhoramento é a identificação de demandas e em função delas, a definição dos objetivos.

Para a identificação das demandas, costuma-se considerar somente o mercado com sua cadeia produtiva e a possibilidade de lucro, o que é uma visão reducionista e limitada. Para uma visão sistêmica, deve-se considerar também impactos sócios econômicos e ambientais de um possível cultivar a ser gerado, que, em outras palavras, significa sustentabilidade.

Em função desse ponto de vista mais amplo, deve-se definir as demandas, objetivos e metas do programa. É importante que as demandas, objetivos e metas sejam coerentes e exequíveis porque projetos muito ambiciosos podem fracassar. Deve-se

considerar de forma realista a relação custo e beneficio das novas cultivares a serem obtidas.

Para a obtenção das novas cultivares, a variabilidade genética da espécie alvo é a mais importante ferramenta a ser utilizada. Essa variabilidade pode ser buscada não somente em cultivares modernas, mas também em acessos obsoletos, raças locais, espécies selvagens de gêneros relacionados à espécie-alvo, entre outros. Quando se considera a espécie e seu sistema produtivo, pode-se prever os gargalos a serem enfrentados, ou seja, quais características de interesse estão ausentes nas atuais cultivares comerciais. Nessa fase do planejamento, é possível definir se haverá necessidade de atividades de pré-melhoramento, envolvendo a identificação de genes de interesse em espécies silvestres e sua transferência para acessos mais adaptados.

As atividades de pré-melhoramento são de grande importância para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos e ampliar a base genética dos programas de melhoramento (DUVICK, 1990; NASS; PATERNIANI, 2000), sendo várias experiências de sucesso relatadas por Faleiro et al. (2008a). A impossibilidade de atingir os objetivos com a variabilidade genética existente no *pool* gênico da espécie ou de espécies relacionadas pode levar a decisão de se utilizar técnicas biotecnológicas, incluindo a transgenia.

As atividades do melhoramento propriamente dito envolvem basicamente metodologias de avaliação, seleção e novas recombinações a cada geração. Caso não se domine essas metodologias para a espécie-alvo, um estudo prévio deve ser conduzido inicialmente antes do melhoramento propriamente dito. O conhecimento prévio da forma de reprodução e multiplicação da espécie-alvo é imprescindível para se decidir a estratégia apropriada do melhoramento. Espécies autógamas ou alógamas, com reprodução via sementes ou assexuada, requerem metodologias distintas de melhoramento. Finalmente, as limitações de manejo da espécie na região-alvo, como por exemplo, doenças e problemas de adaptação às condições climáticas, assim como necessidade de irrigação nas diferentes épocas de plantio, são determinantes no planejamento dos experimentos. O conhecimento das exigências do mercado auxilia na busca de produtos tecnológicos com maior valor agregado.

O programa de melhoramento não termina com a obtenção do cultivar. Para atingir seu objetivo central, esse cultivar deve ser utilizado pelos produtores e atingir o mercado com benefícios para toda cadeia produtiva, envolvendo a indústria e os consumidores. Para isso, atividades de pós-melhoramento são essenciais. Essas

atividades envolvem a elaboração de planos de marketing, logística de produção e comercialização de sementes e difusão da tecnologia. A divulgação dos ganhos não somente econômicos, mas também sociais e ambientais podem ser importantes para a adoção dos novos cultivares.

Para realização de todas as atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (FALEIRO et al., 2008b), o trabalho em equipe envolvendo profissionais com várias especialidades (genética, fitossanidade, fitotecnia, fisiologia vegetal, bioquímica, estatística, etc.) assume grande importância. Toda equipe, por mais qualificada que seja, possui limitações e lacunas de conhecimento e, nesse sentido, parcerias multidisciplinares e interinstitucionais devem ser criteriosamente estabelecidas, aproveitando-se as áreas de maior domínio ou de maior experiência de cada instituição ou equipe parceira.

Importância e exemplos do desenvolvimento de novas cultivares

O melhoramento clássico tem contribuído de forma significativa para o aumento da produção brasileira de plantas cultivadas, assim como para a redução dos custos de produção dessas culturas e para a incorporação de novas áreas de produção (RAMALHO, 2004). O melhoramento de plantas de diversas espécies produtoras de grãos, fibras, frutos e energia foi fundamental para a ocupação agrícola da região, por meio da criação de cultivares adaptados a região do Cerrado. Hoje, essa região responde por quantidades significativas da produção nacional de carne, soja, milho, feijão, algodão, arroz, café, entre outras culturas.

O melhoramento baseado na biotecnologia e engenharia genética também tem contribuído significativamente na produção de alimentos no mundo, com um número crescente de países que cultivam plantas geneticamente modificadas e considerável aumento de áreas cultivadas com estas plantas. Um total de 25 países cultiva plantas geneticamente modificadas em aproximadamente 134 milhões de hectares, dos quais 15 têm a área cultivada superior a 50 mil hectares (Figura 3) (JAMES, 2009). Os países com maiores áreas cultivadas com plantas geneticamente modificadas são EUA, Brasil e Argentina com 64; 21,4 e 21,3 milhões de hectares, respectivamente.

O melhoramento genético convencional ou baseado na engenharia genética é um processo contínuo e vibrante com capacidade de se reinventar, absorvendo novas técnicas científicas e metodologias modernas, na busca do desenvolvimento de cultivares que contribuam para uma agricultura sustentável combinando produtividade,

qualidade nutricional, adaptação a estresses bióticos e abióticos, manejo de solo e manejo integrado de pragas, entre outros. São vários os exemplos de cultivares desenvolvidos, com inúmeros benefícios econômicos, sociais e ambientais.

Perspectivas do melhoramento de plantas

A cada ano surgem novos desafios e demandas para o desenvolvimento de novos cultivares, fazendo com que os programas de melhoramento genético convencional e baseado na engenharia genética tenham uma natureza dinâmica e importância estratégica atual e futura. O grande potencial de uso da biotecnologia moderna no melhoramento de plantas é inegável. Os resultados obtidos até o presente momento refletem as contribuições atuais da biotecnologia moderna e, para o futuro, certamente, novos produtos tecnológicos serão gerados.

Várias oportunidades são citadas para geração de produtos com o auxílio da biotecnologia (NAS, National Academy of Sciences, 2010). Entre elas, o aumento da produtividade de plantas cultivadas, através de maior resistência e tolerância a estresses bióticos (pragas, doenças, ervas daninhas) e estresses abióticos (altas temperaturas, seca, maior eficiência no uso de nutrientes); aumento do valor nutricional das plantas, através do aumento da concentração de vitaminas, minerais e proteínas em plantas; geração de plantas biofábricas, para produção de vacinas e proteínas terapêuticas; aumento da segurança de produtos, por intermédio da geração de plantas com maior durabilidade pós-colheita; uso da biotecnologia com o objetivo da preservação da biodiversidade e na conservação dos recursos naturais e produção de energia renovável.

Entretanto, é necessário que sejam considerados pontos essenciais para o desenvolvimento de novos produtos como a identificação das demandas e prioridades de cada região e dos diferentes sistemas de produção existentes, tendo em vista que eles são diversos entre regiões e mesmo dentro de uma região. James (2009) cita como fator importante o fornecimento de tecnologias relevantes para satisfazer as necessidades de países em desenvolvimento na Ásia, América Latina e África. Também devem ser considerados fatores relacionados à definição clara dos beneficiários dos produtos a serem gerados e o impacto que os mesmos irão causar e as questões de protocolos de testes de campo necessários para novos eventos tendo em vista as diferenças ambientais, por exemplo, as regiões temperadas e as regiões tropicais (PERSLEY, 1999). Da mesma forma, devem ser considerados os protocolos para regulação e liberação de novos produtos e o engajamento da indústria de processamento e do consumidor, considerando

que o sucesso de novos produtos geneticamente modificados também depende da aceitação por parte do consumidor.

Considerações finais

É inquestionável a grande importância do melhoramento genético vegetal para a humanidade. São inúmeros os exemplos de sucesso no desenvolvimento de cultivares de plantas melhoradas geneticamente que trouxeram grandes benefícios para o agronegócio, garantindo a sustentabilidade econômica e ambiental da agricultura. Os exemplos vão desde as primeiras atividades de domesticação de genótipos selvagens, passando pelas inúmeras cultivares desenvolvidas pelo melhoramento clássico, até o uso de tecnologias avançadas de engenharia genética para o desenvolvimento de novos cultivares. Certamente, essas tecnologias modernas podem beneficiar diferentes culturas e programas de melhoramento genético em algumas situações, em que o melhorista teria dificuldades utilizando apenas metodologias convencionais de melhoramento. Logicamente, as novas tecnologias como ferramentas auxiliares ao melhoramento genético nunca irão substituir as práticas essenciais do melhoramento como a avaliação fenotípica das plantas contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo x ambiente.

Capítulo 6 - A tecnologia do DNA

As ferramentas disponíveis

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

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

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

As nucleases ou enzimas de restrição

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

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

A eletroforese do DNA

A eletroforese separa os fragmentos de DNA obtidos com uma enzima de restrição. As amostras são colocadas em um gel no qual se aplica um campo elétrico. Os fragmentos de DNA carregados negativamente se movimentam na direção do pólo

positivo. Ao encontrar uma resistência menor, os fragmentos menores migram mais rapidamente (Figura 1).

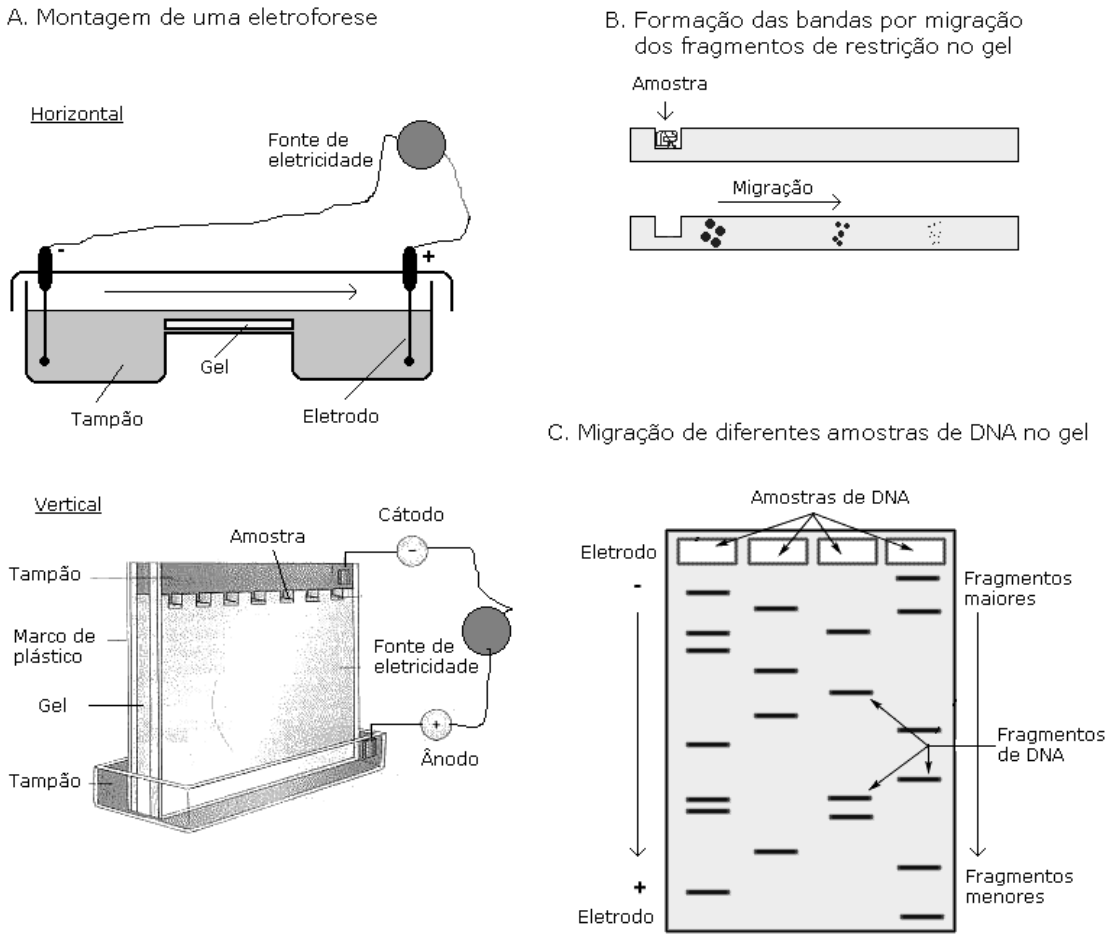


Figura 1. A eletroforese do DNA.

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

A síntese e amplificação de DNA

Síntese de oligonucleotídeos

A síntese de oligonucleotídeos de DNA e RNA se desenvolve hoje em máquinas automatizadas (sintetizadores) capazes de construir, em poucos minutos, moléculas com

dezenas de pares de bases. Estes oligonucleotídeos podem ser utilizados como sondas ou como *primers* para a PCR.

Síntese de cDNA

Uma enzima de origem viral transcreve a informação genética no sentido RNA → DNA. Esta enzima, denominada transcriptase reversa, normalmente garante aos vírus com genoma de RNA sua multiplicação no hospedeiro (como o HIV, por exemplo).
O rRNA e os tRNAs podem ser isolados facilmente devido a seu tamanho; o mRNA, por sua vez, deve ser isolado dos tecidos onde se expressa. O mRNA da proteína da seda ou fibroína, por exemplo, se extrai das glândulas salivares do bicho-da-seda.

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

A reação em cadeia da polimerase

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

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

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

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

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

O sucesso da PCR se deve a sua extraordinária versatilidade, permitindo que seja utilizada, com objetivos diversos, em campos tão diferentes como a agricultura, a medicina veterinária, os estudos ambientais, os testes de diagnóstico e a medicina forense. Entre suas muitas aplicações, cabe citar também os estudos antropológicos e evolutivos, tais como a extração de DNA de múmias egípcias, de animais extintos como o *quagga* (um tipo de zebra) ou de insetos presos em âmbar 40 milhões de anos atrás.
Uma máquina de PCR pode desenvolver 25 ciclos em menos de uma hora, amplificando 105 vezes o fragmento de DNA.

O sequenciamento do DNA

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

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

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

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

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

OS *ARRAYS*

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

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

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

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

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

Capítulo 7 - A engenharia genética

As primeiras experiências

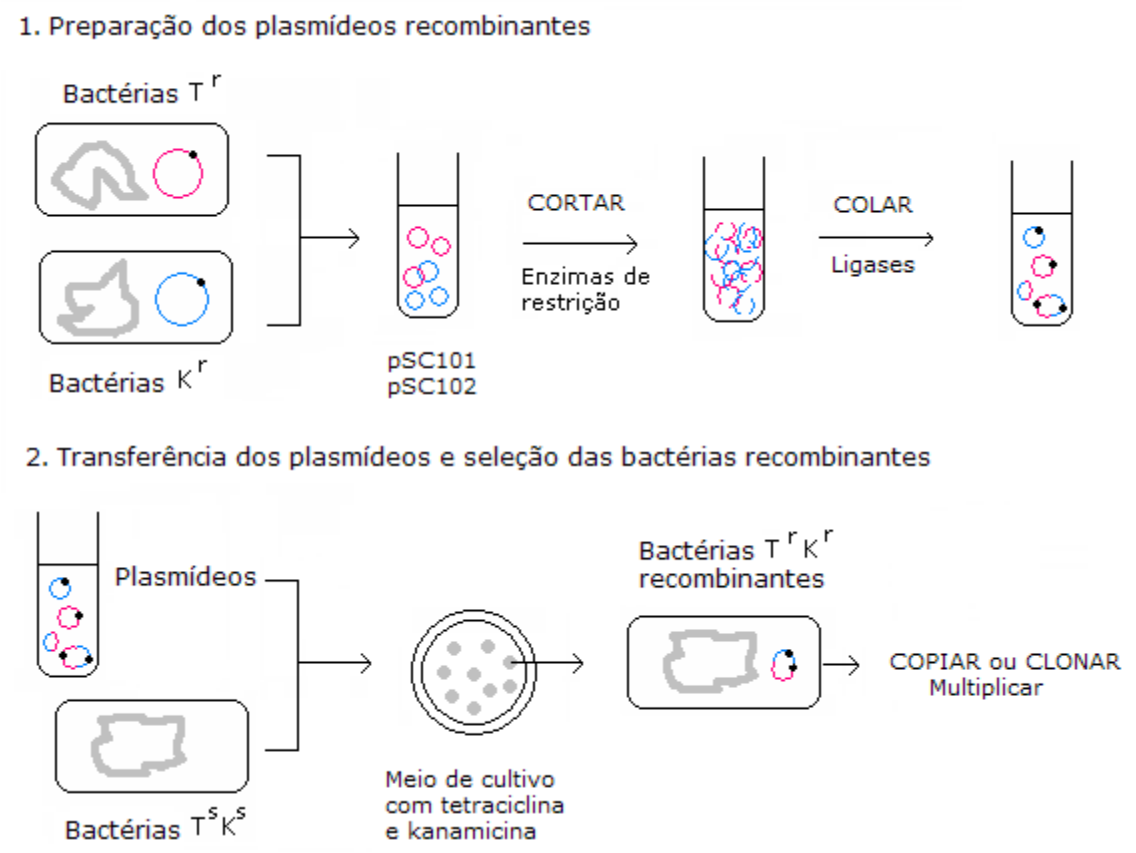
Em 1972, na Universidade de Stanford (Califórnia), Paul Berg conseguiram associar o DNA de dois microrganismos diferentes, formando uma molécula mista de DNA. Na mesma Universidade, Stanley Cohen especializava-se na biologia dos plasmídeos microbianos, pequenas moléculas de DNA circular, portadoras de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

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

As bibliotecas de genes

O enorme tamanho de um genoma dificulta tanto o mapeamento como a localização de um gene. Uma forma de facilitar a manipulação é extrair o DNA de um organismo determinado, cortá-lo com enzimas de restrição, inserir os fragmentos em plasmídeos e introduzir os plasmídeos recombinantes em bactérias. Cada bactéria formará um clone e cada clone levará um fragmento do genoma do organismo estudado. O conjunto de clones representa o genoma inteiro de um organismo, constituindo uma biblioteca genômica (Figura 1).

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



Legenda:
T: tetraciclina, Ts: sensível à tetraciclina, Tr: resistente à tetraciclina, K= kanamicina, Ks: sensível à kanamicina, Kr: resistente à kanamicina, pSC101: plasmídeo de Stanley Cohen n0 101; pSC102: plasmídeo de Stanley Cohen n0 102.

Figura 1. A construção de bibliotecas de genes.

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

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

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

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

A construção de um microrganismo recombinante

Uma das primeiras proteínas de origem recombinante foi a somatotropina ou hormônio de crescimento. Como a enzima de restrição eliminava do cDNA, além da sequência codificadora do peptídeo-guia, os nucleotídeos correspondentes aos primeiros aminoácidos da molécula, estes tiveram que ser acrescentados quimicamente, em um processo extremamente engenhoso (Figura 2).

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

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

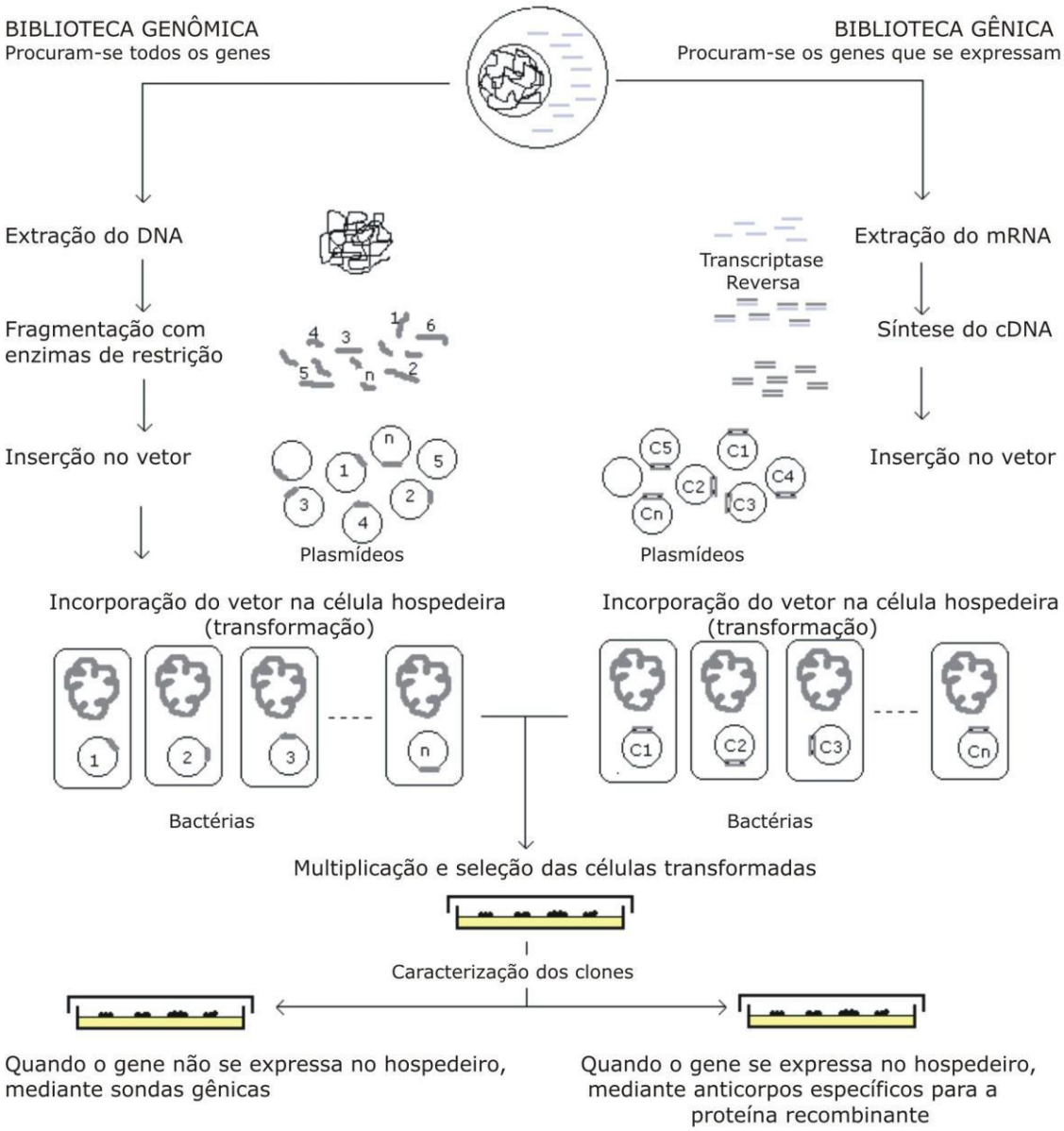


Figura 2. A produção de somatotropina por engenharia genética

Encontrar o gene

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

A segunda dificuldade está na obtenção de numerosas cópias desse gene. Uma solução é a multiplicação do clone correspondente e posterior isolamento do gene procurado. Outra é a amplificação do gene mediante a PCR, sempre que se conheçam as sequências iniciais e finais ou, eventualmente, as sequências adjacentes à região onde está inserido. Se a sequência do gene for conhecida e relativamente curta, podem-se

construir cadeias curtas de oligonucleotídeos e associá-las, formando um gene sintético que será amplificado por PCR. Existem numerosas estratégias, que dependem do caso e, também, das características e possibilidades do laboratório (Figura 3).

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

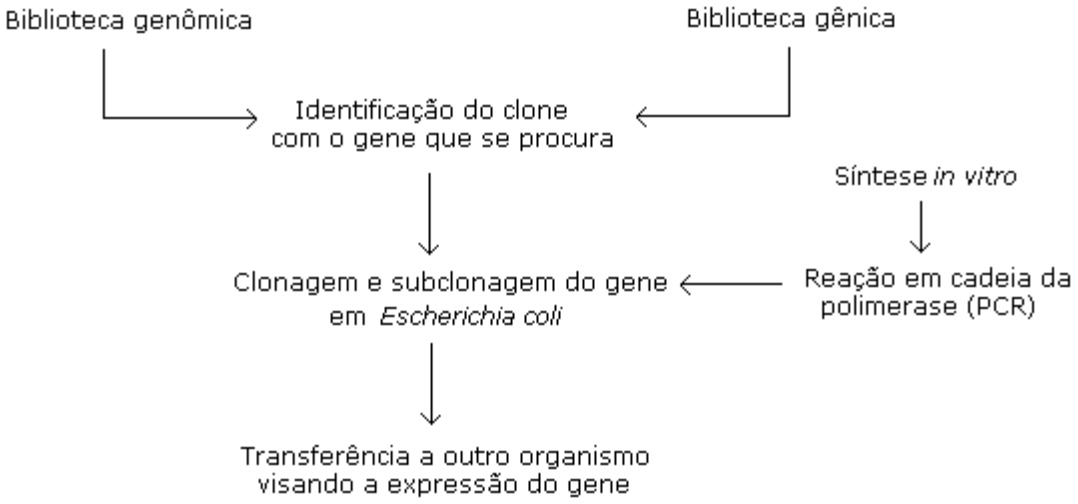


Figura 3. Algumas estratégias possíveis de clonagem

Inserir o gene

Vetores de expressão gênica

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

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

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

células eucarióticas, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo utilizado há séculos na produção de alimentos e bebidas.

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

O ideal é construir um vetor que já contenha os genes marcadores para seleção ou reconhecimento, os sítios de restrição, uma sequência promotora e os sinais adequados de início e fim da transcrição. Ao colocar a sequência codificadora da proteína, o vetor funciona como um "cassete" de expressão (Figura 4).

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

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

Transformação e transfecção

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

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

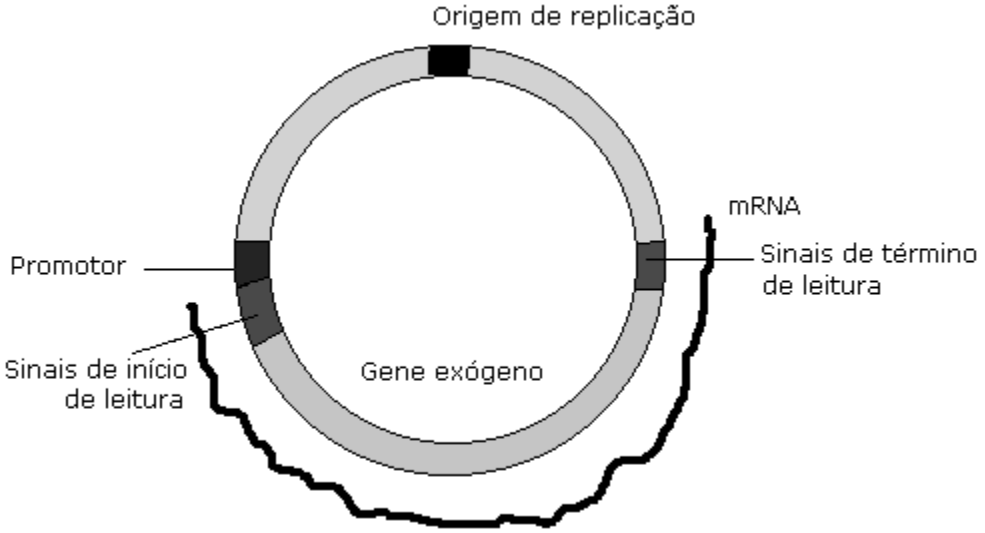


Figura 4. A estrutura de um vetor de expressão: este deve incluir os elementos genéticos da célula hospedeira para a transcrição e tradução.

Identificar os microrganismos recombinantes

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

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

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

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

A construção de plantas transgênicas

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

O transgene

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

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

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

A transferência dos genes a células vegetais

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

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

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

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

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

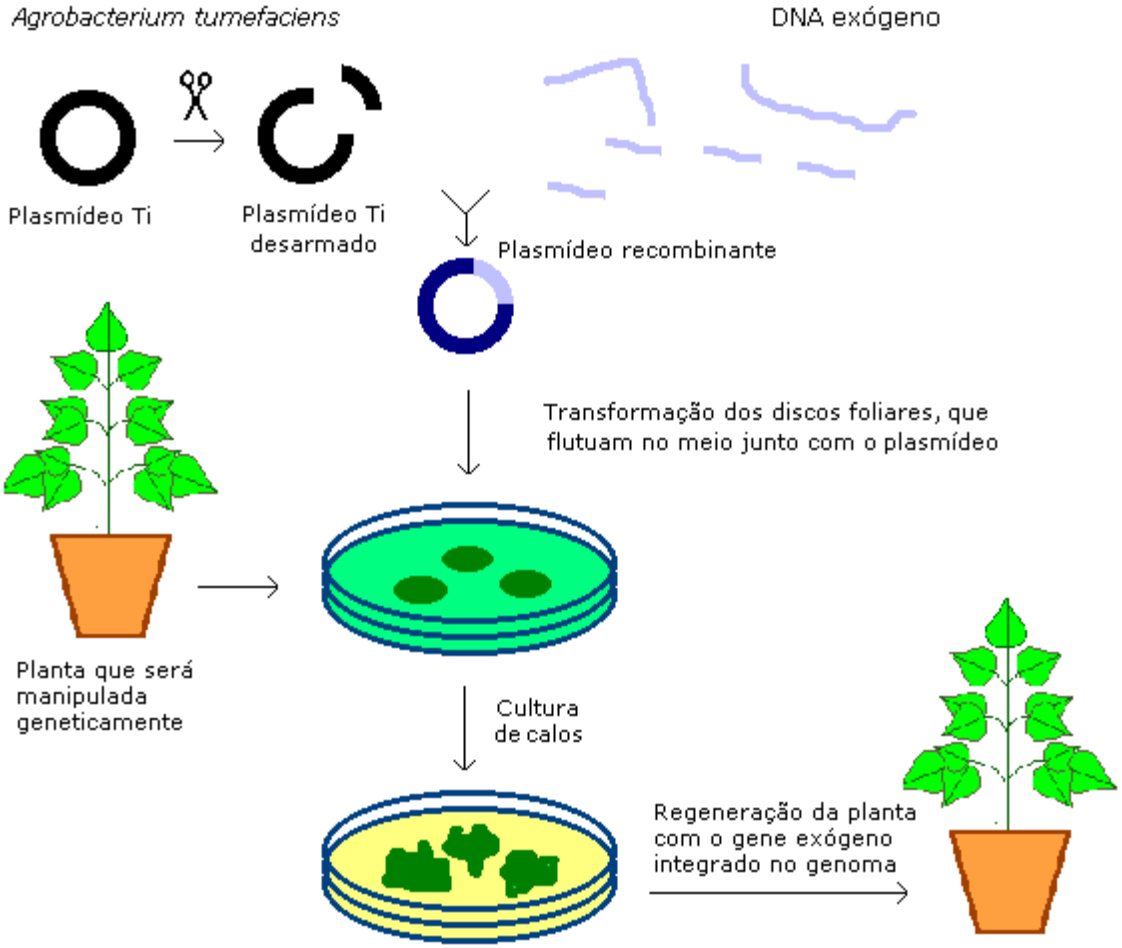


Figura 5. A construção de uma planta transgênica: O plasmídeo Ti "desarmado" portando um gene exógeno é transferido a células de discos foliares. Formam-se calos que poderão regenerar a planta inteira.

O problema dos marcadores seletivos

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

Do laboratório ao campo

No laboratório, transfere-se a construção genética às células receptoras por algum dos métodos possíveis (geralmente eletroporação, biolística ou uso de vetores, como o plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens)*; a seguir se selecionam e recuperam as células transformadas e, mediante as técnicas de cultura *in vitro*, se regeneram as plantas correspondentes (Figura 6). Note-se que este trabalho costuma ser realizado em plantas cujo genótipo favorece a transformação e a regeneração da planta transformada, mas que geralmente resultam pouco vantajosas do ponto de vista agronômico.

Figura 6. As etapas da construção de uma planta transgênica

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

Acabada a etapa de laboratório, iniciam-se os testes controlados em casa de vegetação, para selecionar as plantas-mãe com as quais se originará várias gerações de retrocruzamentos seletivos com alguma das linhagens "elite". Os testes visam à obtenção de uma linhagem transgênica de alto rendimento, adaptada a um contexto

específico, isto é, um cultivar com uma produtividade potencial parecida à da linhagem "elite" que expresse o traço codificado pelo novo transgene.

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

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

Células e animais transgênicos

A transferência gênica a células animais

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

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

A transfecção mediante vetores virais dos quais se eliminaram as sequências patogênicas, interessa ao laboratorista porque os vírus animais infectam tecidos específicos e se integram no genoma da célula hospedeira de maneira estável.

Os animais transgênicos

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

Os animais como modelos para a experimentação

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

Os animais como biofábricas

A ovelha Dolly nasceu em 1996, depois de numerosas tentativas de transferir o núcleo de uma célula mamária a um ovócito anucleado (Figura 7). Adorada pela mídia, o clone Dolly teve que ser sacrificada em 2003 com um tumor no pulmão, artrite e sinais de envelhecimento precoce. Poucos meses depois do nascimento de Dolly, o mesmo grupo do Instituto Roslin e de PPL Therapeutics anunciou o nascimento de Polly, uma ovelha transgênica para o gene codificador do fator IX, uma proteína que falta nos hemofílicos.

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

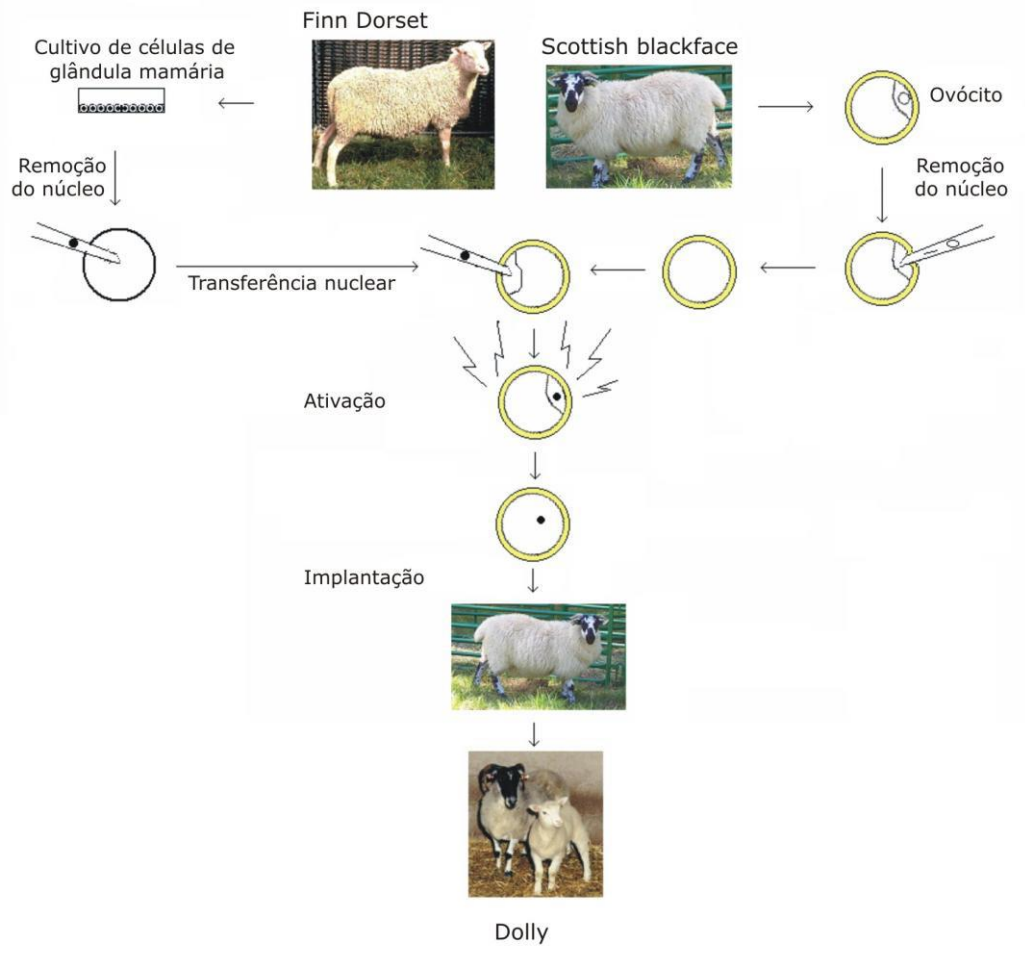


Figura 7. Dolly, um clone obtido por transferência nuclear.

Capítulo 8 – Bioinformática

Ferramentas de bioinformática

As ferramentas de bioinformática são programas de computador que auxiliam na interpretação dos resultados gerados pelos diferentes sequenciamentos. Permitem identificar um possível papel biológico para os segmentos de DNAs e proteínas, por meio de comparações com sequências e estruturas depositadas em bancos de dados e desenvolver marcadores moleculares específicos e iniciadores de replicação (primers) para identificação e ou captura de genes de interesse.

Na pesquisa biotecnológica, existem duas situações corriqueiras em que o pesquisador busca as ferramentas de bioinformática:

1) Quando se tem uma ou conjunto de sequências da qual se deseja identificar a função biológica.

2) Quando se tem um problema biológico para o qual há necessidade de se identificar os genes ou rotas metabólicas.

A seguir serão apresentadas algumas dessas ferramentas no contexto da situação um e dois.

Ferramentas para anotação de sequências genômicas

Nos estudos de genômica, proteômica, engenharia genética e desenvolvimento de marcadores moleculares, frequentemente o pesquisador tem necessidade de confirmar se o segmento obtido realmente é o desejado. Para tanto, faz-se a determinação da ordem das bases nitrogenadas (no caso de DNAs) ou dos aminoácidos (no caso de peptídeos) pelo método de sequenciamento de DNA ou de peptídeos. Uma vez obtidos os dados dos sequenciadores, inicia-se a etapa de tratamento informatizado para interpretação dos resultados.

No caso específico de DNAs, chama-se de sequência bruta aquela recém-obtida da leitura do eletroferograma (representação gráfica da ordem das bases nitrogenadas gerado pelo sequenciador automático de DNA). Essas sequências podem conter, além do DNA de interesse, segmentos do vetor de clonagem que necessitam ser identificados e removidos antes de qualquer estudo para se evitar interpretações errôneas. A remoção de vetores da sequência bruta é feita comparando-se o segmento com bancos genéticos de vetores de clonagem.

Identificada a similaridade, faz-se a retirada da região correspondente ao vetor. Esse processo pode ser feito visualmente e o próprio pesquisador analisa e identifica a sequência do vetor, ou com auxílio de programas de bioinformática.

Após esse tratamento inicial, faz-se o envio da sequência para a comparação com outras depositadas em bancos de dados. O objetivo da etapa de comparação é identificar similaridades com segmentos de DNA ou de peptídeos disponíveis nos bancos de dados, permitindo atribuir prováveis funções ao segmento em estudo. O programa de busca de similaridades mais conhecido na atualidade é o Blast, que está disponível na página inicial do NCBI (NCBI, 2009; BLAST, 2009).

A Embrapa desenvolveu um programa de bioinformática que permite, de forma automatizada, identificar e retirar o vetor, enviar e recuperar as sequências similares dos bancos de dados. O programa dispõe de um tutorial e está disponível para pesquisadores cadastrados no site: www.genoma.embrapa.br (SISGEN, 2009).

Na Figura 1, ilustra-se o resultado de uma pesquisa de similaridade em bancos de dados provenientes do Blast. No exemplo, foi identificado apenas um segmento similar à sequência pesquisada, contudo é comum aparecer múltiplas sequências ou a situação inversa em que não aparecem similaridades.

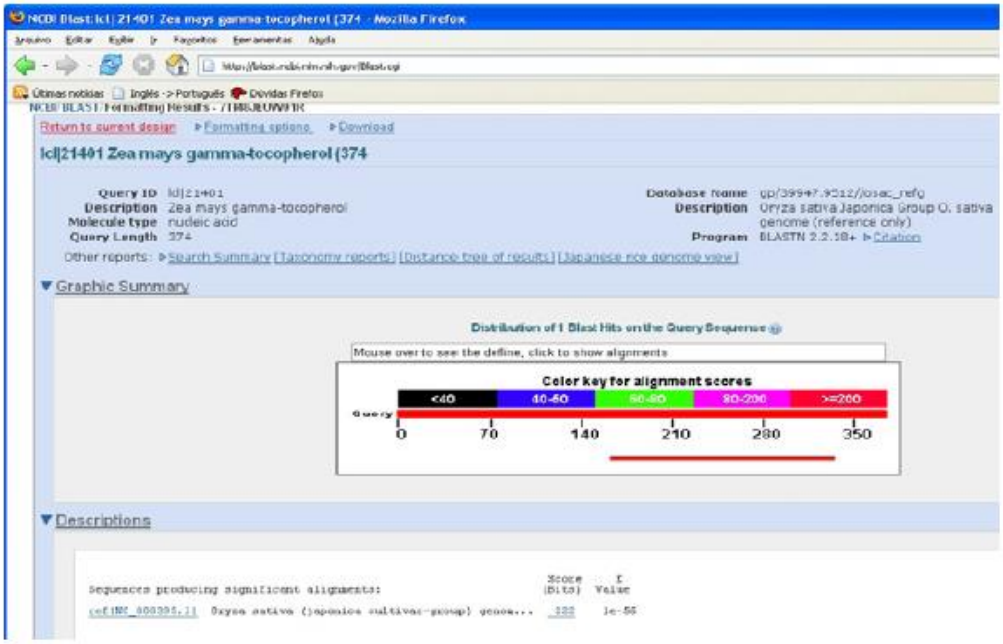


Figura 1. Página de resultados da busca de similaridades com sequências depositadas no banco de dados BLAST. No exemplo foi pesquisada a similaridade no banco de arroz da sequência de tocoferol obtida do sequenciamento do banco genômico do milho. A representação gráfica mostra a região do segmento do milho com similaridade ao clone NR008395. 1 do banco de arroz.

Igualmente comum é a situação em que apenas uma parte da sequência apresenta similaridade com outras provenientes dos bancos de dados. Esses casos geralmente ocorrem quando existem domínios conservados entre famílias gênicas ou genes com origem evolutiva comum, ou mesmo em virtude da presença de elementos repetitivos diversos de origem viral ou não viral (COSTA; MARTINS, 2010). Identificada a similaridade, faz-se a anotação das bases e (ou) aminoácidos de início e fim e sua função hipotética, destacando o termo "hipotético" quando a função não tiver sido comprovada experimentalmente.

O Blast permite identificar e recuperar dos bancos de dados as fases abertas de leitura (open reading frame – ORF), ou seja, possíveis peptídeos que poderiam ser codificados pelo segmento se a região correspondesse a um gene. Esse procedimento pode ser feito de forma menos automatizada por meio de outros programas de bioinformática disponíveis gratuitamente ou não para esse fim (ex.: ORF finder encontrado no próprio site do ncbi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf).

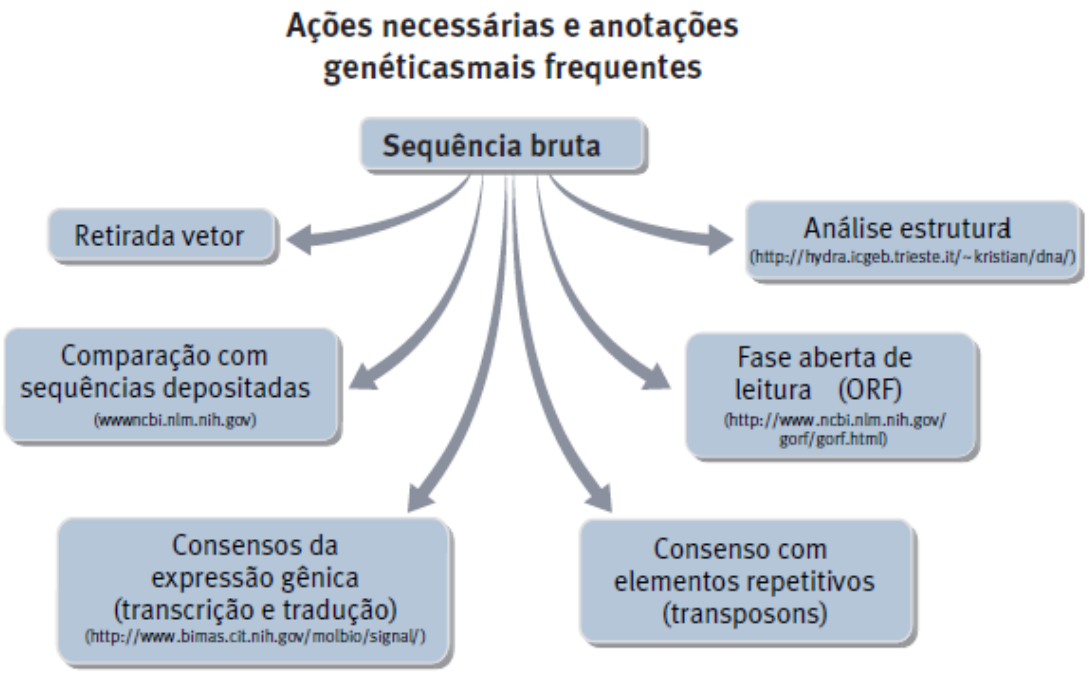


Figura 2. Anotações mais comuns realizadas nas sequências brutas: (1) retirada da região do vetor; (2) Comparação com sequências depositadas em banco de dados; (3) Identificação de fases abertas de leitura; (4) Identificação de consensos da transcrição ou tradução; (5) Identificação de elementos repetitivos; e (6) Análise estrutural.

No caso particular de não existirem similaridades com as sequências depositadas nos bancos de dados, dependendo da necessidade do pesquisador, faz-se uso de outros programas de bioinformática que permitam identificar outras informações que possam

auxiliar na identificação do papel biológico. Entre esses programas, destacam-se aqueles que identificam consensos ativadores ou repressores da transcrição, segmentos característicos de região promotora. Essas regiões podem ser caracterizadas com o auxílio de programas do tipo “Signal scan”. Também, podem-se fazer análises de curvaturas e dobramentos de DNAs e cadeias polipeptídicas com ferramentas específicas disponíveis para tal (Figura 2).

Após a etapa de anotação, em geral as sequências caracterizadas são enviadas para depósito nos bancos de DNA ou de proteínas. A forma de envio e depósito depende do banco de dados. No caso do site do NCBI, há a possibilidade de se depositar a sequência de forma unitária ou em conjunto por meio do programa específicos. (UPDATING INFORMATION ON GENBANK RECORDS, 2009).

Com base no conhecimento gerado pelas anotações, é possível definir as estratégias para comprovação da função do segmento no organismo. Portanto, a anotação é bastante útil na situação em que o pesquisador tem alguma sequência (ou conjunto de sequências) da qual necessita identificar a função biológica.

De tempos em tempos, as sequências depositadas nos bancos de dados são atualizadas. Somente a equipe que as depositou poderá promover modificações nas informações disponibilizadas. Essa situação é comum quando são disponibilizados os resultados de sequenciamentos parciais ou quando se deseja atualizar as anotações.

Uma vez publicadas as sequências pelos bancos, qualquer usuário pode salvar a informação em seu computador. Os arquivos no formato Genebank fornecem a sequência com todas as informações anotadas pelo depositante (Figura 3). Por meio desse arquivo, é possível conectar as informações complementares disponibilizadas na internet como, por exemplo, a bibliografia relacionada ao arquivo.

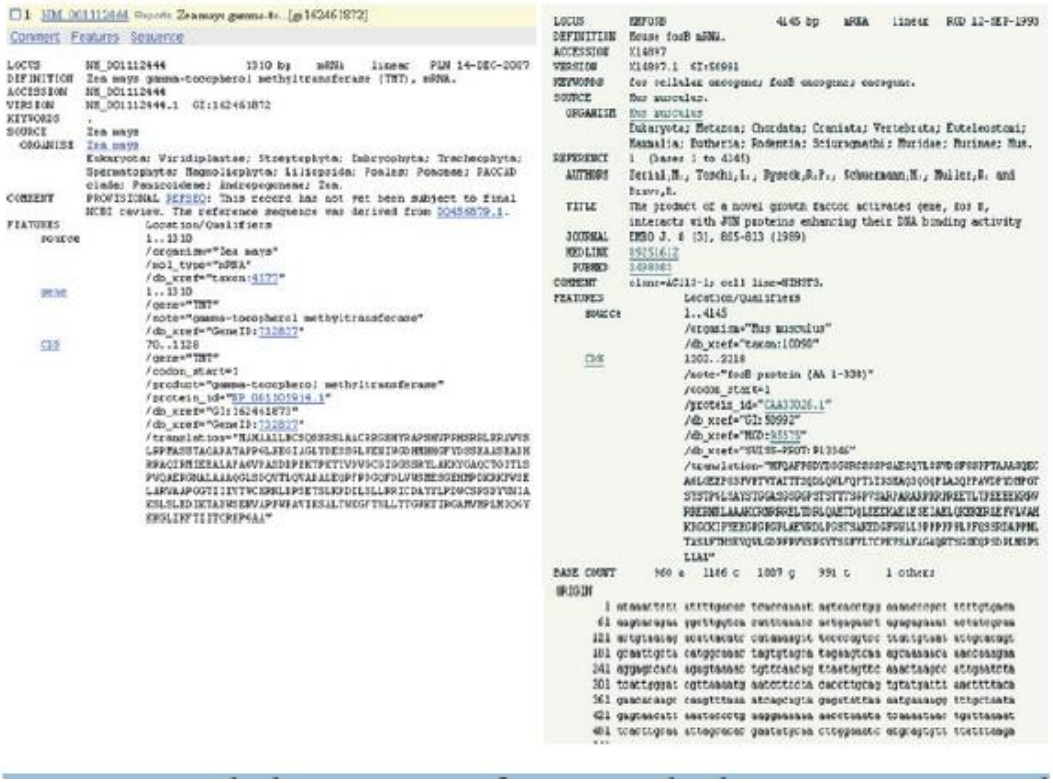


Figura 3. Exemplo de sequência no format Genebank. As anotações em azul permitem o acesso ao detalhamento da informação, incluindo acesso às publicações via ligação com o Medline e Pubmed (seta em vermelho).

O formato Fasta disponibiliza a sequência sem as anotações (Figura 4). Esse formato de apresentação é útil quando a informação obtida é utilizada em algum programa de análise de bioinformática, como no caso de desenho de primers para amplificação de regiões específica do genoma.

FASTA

```
>C5 região hibrida humana/minicírculo kDNA, 1075 bp
GAATTCTCTGTGGCATAGTTCCCAACTTCGATGGCTTACCCTGTTACTCAGCAACATCCTAG
GACTGTCCATCCTGCTTGAAAAATAAGGAAGTTGGCCAAAGTTATGGTTCAGAGGGTAACAT
ACTTGTGGAACAGCATGAGGGACCTCAGTTTGAATCCCCAGCGACCCTGTAAAAGTCAGTTG
TGACTGTACTACAAGTATCATGCTATAACTCCAGTTCTGGGAGGCAGAGACAGGTGGGTCCC
TGGAGTTCACAAGTCAGTCATCCTATTTCAATAGATAGTTTTATGTTCAGGGAAAGGGACTG
TCTCAAAATCGAGGAAGATACACGCACAACTCTGGTATACACACACACACACACACACACAC
ACACACACACACACTCACACACAGTTTTCAGCACCTCCATTTACCATAAAACACCACAACTA
TCACCAAACTCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACCTCCCGTAAACAACCCCCC
ACTTTCGGCCAAATAATGTACGGGGGAGATGCATGAATTTTCCGGCCAAAATCTGA

>FOSB_MOUSE Protein fosB. 338 bp
MFQAFPGDYDSGSRCSSSPSAESQYLSSVDSFGSPPTAAASQECAGLGEMPGSFVPTVTA
ITTSQDLQWLVQPTLISSMAQSQGQPLASQPPAVDPYDMPGTSYSTPGLSAYSTGGASGS
GGPSTSTTTSGPVSARPARARPRRPREETLTPEEEEKRRVRRERNKLAAAKCRNRRRELT
DRLQAETDQLEEEKAELESEIAELQKEKERLEFVLVAHKPGCKIPYEEGPGPGPLAEVRD
LPGSTSAKEDGFGWLLPPPPPPPLPFQSSRDAPPNLTASLFTHSEVQVLGDPFPVVSPSY
TSSFVLTCPEVSAFAGAQRTSGSEQPSDPLNSPSLLAL
```

Figura 4. Exemplo de sequência de DNA (A) e de peptídeo (B) no formato fasta. O sinal “maior” (>) indica que a linha é o cabeçalho da sequência e que o parágrafo seguinte contém a sequência.

A segunda situação muito comum enfrentada pelos profissionais que atuam na área de biotecnologia é aquela em que se tem um problema biológico para o qual há a necessidade de se identificar os genes ou rotas metabólicas. Nesses casos, os bancos de dados podem ser muito úteis para obter as informações desejadas. Entre os bancos, destacam-se os do NCBI (ENTREZ, 2009) e os do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KEGG,2009).

A pesquisa do tema é geralmente feita por meio de palavras-chave grafadas em inglês. Os resultados são páginas com dados gerais e links para o acesso às informações específicas. O NCBI é um portal que integra diferentes bancos de dados por meio do sistema Entrez (NCBI, 2009; ENTREZ, 2009). A entrada para o sistema é feita pela página inicial do NCBI (Figura 5). Nessa página, o usuário visualiza dois campos. O campo 1 é destinado à colocação da palavra-chave, e o segundo, marcado com a frase "All Database", permite a escolha do banco de dados onde será realizada a busca, clicando-se na seta ao lado da frase.

Figura 5. Resultado da pesquisa da palavra-chave tolerância à seca no Entrez. Os números à esquerda de cada ícone indicam a quantidade de arquivos obtidos com a palavra-chave em cada banco de dados. Para acessar o resultado, basta clicar sobre o ícone.

Exemplo de problema biológico aplicado ao melhoramento genético

Existe hoje uma grande expectativa da sociedade por alimentos mais ricos em nutrientes e benéficos à saúde, os chamados alimentos funcionais. Uma categoria de composto correlacionada a propriedades funcionais é a dos antioxidantes. Para tanto, alguns grupos de pesquisa desenvolveram alimentos com maiores teores de compostos fenólicos e carotenoides. No melhoramento genético clássico, identificam-se os materiais genéticos ricos nesses compostos e, por meio de cruzamentos e seleções, agregam-se as propriedades benéficas às características agronômicas da variedade comercial. Mas, como predizer o comportamento biológico da planta rica em carotenóide? Como identificar as variantes alélicas da via dos carotenóides para síntese em sistemas biotecnológicos com o auxílio das ferramentas de bioinformática?

Como aplicar as ferramentas de bioinformática para desenvolver marcadores moleculares específicos para acelerar os programas de melhoramento genético? Para responder essas questões, há a necessidade de se identificar os genes envolvidos na via de síntese dos carotenóides. A pesquisa pode ser feita pelo Entrez (NCBI, 2009; ENTREZ, 2009), no banco Biosystems ou consultar diretamente a existência dos mapas metabólicos no Kegg (KEGG, 2009), utilizando-se a palavra-chave "carotenoid" nos campos de busca correspondentes.

A análise da via permite identificar uma correlação da via de síntese dos carotenóides com a de síntese de ácido abscísico. O ácido abscísico é um hormônio vegetal associado aos processos de maturação de frutos, queda de folhas e proteção da planta ao estresse ambiental. Esse hormônio provoca dormência das sementes e diminuição do porte da planta. Como existe ligação entre as duas vias, é possível inferir que plantas ricas em carotenóides podem, eventualmente, apresentar maior expressão do hormônio, o que poderia afetar no porte e dormência das sementes.

A manifestação ou não do prognóstico, entretanto, vai depender da combinação alélica da planta. No caso do exemplo, para haver acúmulo dos carotenóides, faz-se necessário combinações alélicas mais eficientes na síntese do composto. Como esse produto é substrato de outras vias biossintéticas, é necessário também que essas vias possuam alelos menos eficientes no consumo do composto.

No momento, ainda não estão disponíveis programas de predição do comportamento fenotípico em função do perfil alélico. A dificuldade está na falta de informações organizadas sobre o comportamento genético dos alelos frente às variações

ambientais que permitam subsidiar a elaboração de programas preditivos. Contudo já existem alguns estudos em andamento conforme pode ser constatado na lista de projetos sobre o assunto disponibilizado pelo Entrez (DBGAP, 2009).

Considerações finais

As ferramentas de bioinformática e bancos de dados permitem que o usuário adquira uma noção do estado da arte e acesso ao detalhamento de informações biológicas úteis, tais como sequências de DNA e de proteína, estruturas tridimencionais de ácidos nucleicos e peptídeos, localização de segmentos gênicos e não gênicos nos cromossômicos, identificação de rotas metabólicas, entre outros. Esse conhecimento é de extrema utilidade na geração, interpretação e discussão de dados e formulação de hipóteses.

Como qualquer fronteira do conhecimento, os programas de bioinformática estão em constante aprimoramento. Dia após dia, novas ferramentas surgem no mercado, exigindo atenção e esforços por parte do usuário no sentido de conhecer os novos recursos. Contudo, trata-se de um esforço compensador que resulta em grande economia de tempo e também de esforços, que, se bem explorado, pode ser uma poderosa ferramenta para o avanço tecnológico.

Capítulo 9 - Biossegurança ambiental e alimentar de OGMs

Introdução

A preocupação com a biossegurança de organismos geneticamente modificados (OGMs) surgiu na década de 1970, após a divulgação dos primeiros trabalhos sobre a construção de genes (JACKSON et al.,1972) e a transferência de genes entre espécies diferentes via engenharia genética (COHEN et al., 1972). Nesse momento, acendeu o sinal de alerta na comunidade científica em relação às possibilidades ilimitadas que as novas ferramentas estavam trazendo e seus imprevisíveis impactos na saúde humana e ambiental. Assim, de maneira voluntária, houve mobilização da comunidade científica para estabelecer um sistema legal com fundamentação científica para normatizar os assuntos referentes a biossegurança (ANDRADE; FALEIRO; 2009a).

Resumidamente, a biossegurança de OGMs compreende as normas necessárias para minimizar os impactos das tecnologias geradas pela biotecnologia por meio de leis, procedimentos e diretivas discutidas mundialmente, porém aplicadas de modo específico em cada país. Essas normas e regulamentações são importantes para o desenvolvimento e utilização das técnicas de biotecnologia (FALEIRO; ANDRADE, 2009; JESUS et al., 2006).

Neste capítulo, são abordados aspectos históricos, conceituais e técnicos sobre a biossegurança de OGMs. Os principais riscos e análises de OGMs relacionados à biosseguranca ambiental e alimentar são discutidos e exemplificados.

Um pouco da história da biossegurança

A biossegurança de OGMs surgiu juntamente com a engenharia genética, considerando as potencialidades da tecnologia na geração de produtos tecnológicos, mais os riscos ambientais e alimentares que esses produtos poderiam apresentar. Para discutir esses riscos, foi realizado um primeiro encontro da comunidade científica em 1974, chamado de “Conferência de Asilomar sobre as Moléculas de DNA Recombinante”. Nessa reunião, foram discutidos os critérios de segurança, principalmente barreiras biológicas e físicas, para os experimentos com OGMs, bem como os critérios éticos para regular esses experimentos, além de recomendações para o controle de descartes de material e padronização da metodologia. Esse foi o início de diversas discussões mundiais a respeito das regras de biossegurança, como fundamento básico para assegurar o avanço dos processos tecnológicos e proteger a saúde humana, animal e ambiental (ANDRADE; FALEIRO, 2009a; BERG, 2004).

Em 1992, na Convenção de Diversidade Biológica (CBD), que ficou conhecida como ECO-92, foi reconhecida a soberania de cada país sobre seus recursos genéticos. Também foi ratificado que deveria haver uma divisão justa e equitativa dos benefícios gerados pelo uso dos recursos genéticos (BRAUN, AMMAN, 2002; ANDRADE, FALEIRO; 2009a; MINARE, 2005). Na Carta da Terra, o Princípio15, também conhecido como Princípio da Precaução, diz o seguinte:

"*Com o fim de proteger o meio ambiente, o princípio da precaução deverá ser amplamente observado pelos Estados, de acordo com suas capacidades. Quando houver ameaça de danos graves ou irreversíveis, a ausência de certeza científica absoluta não será utilizada como razão para o adiamento de medidas economicamente viáveis para prevenir a degradação ambiental",* traduzindo, "é melhor prevenir do que remediar" (UNITED NATIONS, 1992; BOREM, 2005; ANDRADE; FALEIRO, 2009a).

Assim, a preocupação em manter o risco ambiental dentro de um grau de segurança aceitável levou a comunidade internacional a adotar o Princípio da Precaução como princípio ético orientador e jurídico motivador da ação humana. Nesses casos, os países devem seguir procedimentos para prevenir e evitar esses danos. Isto é, determinar o nível de risco aceitável por meio de avaliações científicas e políticas, caso a caso e por cada país (MINARE, 2005; BOREM 2005; ANDRADE; FALEIRO, 2009a).

Alguns conceitos importantes

Para facilitar a leitura, introduzimos abaixo alguns conceitos importantes que serão citados neste capítulo:

− **Análise de risco**: procedimento realizado para analisar a natureza e os efeitos adversos à saúde humana e animal ou ao ambiente. Consiste de três etapas: avaliação do risco, administração do risco e comunicação do risco.

− **Avaliação de risco**: combinação de procedimentos ou métodos, por meio dos quais se avaliam, caso a caso, os potenciais efeitos da liberação planejada do OGM e seus derivados sobre o ambiente e a saúde humana e animal.

− **Biossegurança**: matéria que estuda os riscos potenciais da biotecnologia para a saúde humana e animal, bem como para o ambiente. As Comissões de Biossegurança compete regulamentar e monitorar esses riscos.

− **Contenção**: em Biossegurança, conjunto de medidas e protocolos aplicados para minimizar o risco de organismos geneticamente modificados ao ambiente ou a saúde humana e animal.

− **Derivado de OGM de origem vegetal**: produto obtido de OGM de origem vegetal e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM.

− **Fluxo gênico horizontal**: quando a troca de informação genética se dá entre indivíduos de espécies diferentes, distantes geneticamente.

− **Fluxo gênico vertical**: quando a passagem da informação genética ocorre entre indivíduos da mesma espécie, produzindo descendentes férteis e viáveis.

− **Liberação controlada**: no contexto da Biotecnologia, a liberação intencional de organismos geneticamente modificados no meio ambiente.

− **Liberação planejada**: liberação no meio ambiente de OGM de origem vegetal ou seus derivados, para avaliações experimentais sob monitoramento, de acordo com as disposições da Resolução Normativa n° 6, de 6 de novembro de 2008.

− **Organismo Geneticamente Modificado de origem vegetal**: vegetal cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética.

− **Perigo:** agente nocivo capaz de causar algum efeito adverso.

− **Poluição genética**: dispersão descontrolada de genes para espécies ou indivíduos nos quais esses genes não estavam presentes.

Conceito associado a escape gênico a partir de OGMs.

− **Princípio da precaução**: estratégia pela qual qualquer possível risco associado com a introdução de uma tecnologia nova e evitado, até a completa compreensão do seu efeito a saúde e ao ambiente.

− **Protocolo de biossegurança**: conjunto de procedimentos aceitos internacionalmente para proteger a saúde humana e animal e o ambiente de potenciais riscos do uso da biotecnologia e de seus produtos; Protocolo de Cartagena.

− **Requerente**: qualquer pessoa jurídica com Certificado de Qualidade em Biosseguranca – CQB que se proponha a efetuar liberação planejada, de acordo com a Resolução Normativa n°6, de 6 de novembro de 2008.

− **Responsável Legal**: indivíduo sobre o qual recai a responsabilidade pela condução da liberação planejada, conforme as normas da CTNBio.

− **Risco**: probabilidade de ocorrência de efeito adverso.

− **Segurança alimentar**: significa garantir, a todos, condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo, assim, para uma existência digna, em um contexto

de desenvolvimento integral da pessoa humana (Conselho de Informações Sobre Biotecnologia; Comissão Técnica Nacional de Biosseguranca).

Fluxo gênico e recombinação

O fluxo gênico ou introgressão é a transferência de um gene ou genes de uma planta doadora para outra sexualmente compatível e genotipicamente diferente por meio da polinização, seguida de cruzamentos entre o híbrido dentro da população até a estabilidade do gene na população. Essa introgressão pode ocorrer entre espécies, variedades ou biótipos diferentes, desde que sejam compatíveis sexualmente.

É um processo natural que ocorre desde o início da agricultura, no entanto o advento da transgenia suscitou preocupações adicionais, pois o fluxo entre a planta transformada geneticamente e as espécies silvestres, ou mesmo as cultivares convencionais, poderia trazer alguma vantagem seletiva ou contaminar uma produção não transgênica (ANDRADE; FALEIRO; 2009b; SILVA et al., 2007).

No entanto, o fluxo gênico vai ocorrer se as plantas doadoras e receptoras crescerem perto o suficiente para haver a troca de pólen, pois, embora o pólen possa viajar longas distâncias, seja por meio do vento, insetos ou por outros animais polinizadores, sua viabilidade decresce com o tempo e as condições ambientais. Além disso, para ocorrer o fluxo gênico, é necessário que ambas as espécies/variedades estejam na época de floração e os estigmas estejam receptivos para o pólen (CERDEIRA; DUKE; 2006; ANDRADE; FALEIRO, 2009b).

Segundo Sanvido e colaboradores (2006), existe um consenso dentro da comunidade científica de que pode haver fluxo gênico entre as variedades transgênicas e as espécies selvagens compatíveis sexualmente.

Estudos no Canadá com canola demonstraram essa hipótese, porém também verificaram que o fluxo gênico ocorre na mesma proporção apresentada pelas cultivares não transgênicas. A inquietação que surge é saber se esse transgene poderia causar um impacto relevante na população selvagem. No caso da canola resistente a herbicida, cultivada há anos no Canadá, não foram encontradas evidências de que esse cultivo tenha espalhado resistência na população selvagem de canola. No caso específico de resistência à herbicidas, não é esperado que a introgressão dessa característica confira algum benefício de seleção, pois dificilmente esses genes teriam características seletivas dentro do ambiente natural. No entanto, a resistência a insetos poderia aumentar a adaptação as pragas naturais da população selvagem.

Entretanto, em ambientes naturais, após mais de 10 anos de plantio de OGMs, não foi observado nem a introgressão expressiva dentro das espécies silvestres compatíveis, nem a extinção de espécies selvagens pela introgressão de resistência de transgenes dentro da população (SANVIDO et al., 2006; ANDRADE; FALEIRO; 2009b).

Independente de o fluxo gênico causar ou não uma vantagem seletiva para espécies silvestres, pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver mecanismos para impedir ou minimizar esse risco. São elas: (i) a restrição geográfica dos cultivos transgênicos;

(ii) a construção de plantas transgênicas com genes letais ativados por um agente químico ou pelo ambiente para evitar a dispersão de transgenes (terminator); (iii) a transformação de organelas (mitocôndrias e cloroplastos) ou de linhagens macho-estéreis; (iv) o desenvolvimento de bionanomoléculas que permitem o biomonitoramento *in vivo* do fluxo gênico em tempo real; e (v) o manejo para coexistência entre cultivos transgênicos e não transgênicos (SILVA et al., 2007; CHAPMAN; BURKE; 2006). Muitas dessas tecnologias ainda estão em estudo, entre elas, as bionanomoléculas e a transformação de organelas e linhas macho-estéreis; outras causam muita controvérsia, como o uso de genes terminadores, ou suicidas. No entanto, algumas já estão em uso e apresentando bons resultados, permitindo, em alguns casos, a liberação de OGMs para plantios comerciais no Brasil e no mundo.

Biossegurança alimentar de OGMs

O termo Segurança Alimentar ("Food Security") surgiu na Europa, a partir da 1° Guerra Mundial, em razão da necessidade de formação de estoques estratégicos de alimentos. Na 2° Guerra Mundial, foi agregada a noção do direito humano a alimentação. Com o tempo, foram agregadas as preocupações com a qualidade do alimento, no que se referia à segurança dos aditivos alimentares, dos resíduos de agrotóxicos e da irradiação de alimentos. Iniciou-se então um processo de desenvolvimento e padronização de métodos rápidos e eficientes para detecção e quantificação de agentes biológicos e químicos, ou seja, a inocuidade dos alimentos ("Food Safety"). Atualmente, a preocupação se refere também a segurança dos produtos transgênicos ("Biosafety") (ANDRADE; FALEIRO, 2009c; LAJOLO; NUTTI, 2002).

As avaliações de produtos geneticamente modificados são realizadas por diferentes grupos, publicadas e submetidas à análise dos pares. O processo é bastante similar ao que ocorre com produtos farmacêuticos.

Isto é, assim como ocorre com as fábricas de fármacos que produzem os dados de segurança do produto e os submetem as agências reguladoras para revisão, as empresas que desenvolvem um OGM devem repassar todos os dados para as agências que regulam a liberação de produtos transgênicos. No caso do Brasil, as agências reguladoras são a CTNBio, e, em algumas situações, a Anvisa e o Ibama (LEMAUX, 2008).

Segundo a FAO/WHO (1996), as considerações em relação a segurança alimentar de OGMs incluem:

1) As consequências diretas de alteração nos níveis de expressão de genes existentes pela introdução dos novos genes ou modificações genéticas causadas por ele.

2) As consequências diretas (por exemplo, efeitos antinutricionais, tóxicos ou alergênicos) da presença nos alimentos da proteína codificada pelo gene introduzido.

3) As consequências indiretas dos efeitos de qualquer novo(s) produto(s), ou níveis alterados de produto(s) já existentes, no metabolismo do organismo levando a presença de novos compostos ou níveis alterados de compostos já existentes.

4) As consequências das mutações causadas no processo de introdução genética no organismo, tais como a interrupção de sequências codantes ou controle ou ativação de genes latentes, levando a presença de novos componentes ou níveis alterados de componentes existentes.

5) As consequências da transferência do gene para a flora gastrointestinal pela ingestão do alimento geneticamente modificado (AGM) e (ou) alimentos derivados deles.

6) Potencial efeito adverso na saúde associado ao microrganismo geneticamente modificado pelo alimento.

Considerações finais

A engenharia genética, o desenvolvimento de OGMs e o cultivo comercial desses organismos geram preocupações referentes à biossegurança ambiental e alimentar. Essas preocupações estão sendo alvo de trabalhos científicos que têm subsidiado a tomada de decisões sobre a liberação ou não do cultivo e utilização comercial dos OGMs, ponderando-se os riscos potenciais com os benefícios e efeitos positivos da tecnologia.

Pode-se dizer que existem diversos estudos que geraram dados substanciais a respeito do impacto ambiental de OGMs. Embora existam alguns dados controversos, os resultados obtidos até o momento não demonstram evidência científica de efeito no ambiente. Do ponto de vista alimentar, o nível de segurança de AGMs é muito alto, uma vez que esses alimentos são submetidos a uma bateria de testes relacionados a caracterização da proteína expressada, testes de digestibilidade *in vitro*, avaliação de toxicidade aguda oral em camundongos, avaliação de homologia estrutural da proteína com toxinas protéicas conhecidas, avaliação do potencial alergênico e equivalência nutricional.

Com base nesses testes, pode-se dizer que o risco que um alimento transgênico oferece pode ser considerado menor que o de outro tipo de alimento liberado para consumo humano que não passou por uma bateria de testes tão rigorosa.

É importante salientar que as análises caso a caso dos OGMs quanto à biosseguranca ambiental e alimentar devem continuar sendo feitas com todo critério técnico e científico. Nesse contexto, as ações de pesquisa e desenvolvimento assumem importância estratégica, uma vez que essas ações têm assumido uma importância cada vez maior nas tomadas de decisão sobre todos os assuntos relativos a transgênicos, principalmente gerando informações para subsidiar a liberação comercial ou não dos OGMs.

Glossário de termos em Biotecnologia

A

Ácidos nucléicos

Grandes moléculas, geralmente encontradas no núcleo das células e/ou citoplasma, formadas de unidades chamadas nucleotídeos. Os dois tipos de ácidos nucléicos são o DNA e o RNA.

Aeróbico

Que necessita de oxigênio para o crescimento.

Agrobactéria

Uma bactéria que contém um plasmídeo que é útil na transferência de material genético para plantas.

Alelo

Qualquer uma de possíveis formas alternativas de um gene.

Amino ácidos

Unidades constituintes das proteínas. Há 20 aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, e valina.

Amplificação

O processo de se conseguir várias cópias de um gene ou segmento cromossômico.

Anaeróbico

Que cresce na ausência de oxigênio.

Antibiótico

Substância química formada como um metabólico de bactérias ou fungos, usado para tratar infecções bacterianas. Podem ser produzidos naturalmente, usando microrganismos ou sintetizado quimicamente.

Anticorpo

Proteína produzida por humanos e animais superiores em resposta à presença de antígenos específicos.

Anticorpo monoclonal

Anticorpo purificado, altamente específico, que é derivado de somente um clone de células e reconhece apenas um antígeno.

Antígeno

Uma substância que, ao ser introduza no corpo, induz a resposta imune por um anticorpo específico.

Antisoro

Soro do sangue contendo anticorpos contra um antígeno. Antissoros são usados para conferir imunidade para muitas doenças.

Atenuado

Enfraquecido, com referência a vacinas, feitas de organismos patogênicos que foram tratados de modo a não ser hábeis para causar doenças.

Autoimunidade

Condição na qual o corpo desenvolve uma resposta imune contra seu próprio organismo ou tecidos.

B

Bacteriófago

Vírus que infecta bactérias. Também chamado fago.

Bactéria

Organismo microscópico unicelular sem membrana interna (não possui organelas). Alguns são utilizados em manufatura de comida, outros são parasitas de outros organismos e alguns decompositores.

Base nitrogenada

Uma das quatro unidades químicas do DNA que, de acordo com sua ordem e pareamento, representam os diferentes aminoácidos. As quatro bases são: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T). No RNA, a uracila substitui a timina.

Biblioteca (genômica ou cDNA)

Conjunto de genes ou fragmentos de DNA isolados e mantidos em vetores específicos (plasmídeos, fagos, etc...).

Bioensaio

Determinação da efetividade de um composto em animais, tecidos ou organismos, comparando com uma preparação padrão.

Biocatalítico

Em bioprocessamento, uma enzima ou microrganismo que ativa ou acelera uma reação química.

Biochip

Equipamento eletrônico que usa moléculas orgânicas para formar um semicondutor (atualmente também tem sido usado o termo para descrever conjuntos de fragmentos de DNA sintetizados em matriz sólida).

Biodegradável

Capaz de ser quebrado pela ação de microrganismos e enzimas.

Biomassa

A massa de material biológico (ex. micróbios ou plantas), comumente usada para referir para estoques de agricultura. Em microbiologia refere-se à massa de células de micróbios em estudos de crescimento.

Biosensor

Aparelho no qual sistemas de reconhecimento biológicos (enzimas, anticorpos), é acoplado a microeletrônicos para tornar possível a detecção de baixos níveis de substâncias como açúcares e proteínas em fluídos corpóreos, poluentes em água e gases no ar.

Biotecnologia

Desenvolvimento de produtos usando um processo biológico, o que pode ser realizado usando organismos intactos (leveduras, bactérias, etc...), manipulados geneticamente, ou pelo uso de substâncias naturais de microrganismos (enzimas).

C

Calo

Um conjunto de células não diferenciadas de uma planta que pode, em algumas espécies, ser induzido a formar uma planta inteira.

Carcinogênico

Agente causador de câncer.

Célula

A menor unidade estrutural de um organismo vivo que é hábil para crescer e reproduzir independentemente.

Célula germinativa

Célula reprodutiva (esperma ou óvulo). Também chamada gameta ou célula sexual.

Células somáticas

Células outras que não sexuais ou germinativas.

Cito-

Referente à célula.

Citoplasma

Material celular contido dentro de uma membrana celular e que circunda o núcleo.

Clonagem de DNA

Processo pelo qual fragmentos de DNA de alguma fonte podem ser isolados e amplificados muitas vezes pela inserção em plasmídeos ou bacteriófagos e crescimento de células os contendo.

Clone

Um grupo de genes ou organismos derivados de um único ancestral.

Código genético

Mecanismo pelo qual a informação genética é estocada nos organismos vivos. O código usa um conjunto de 3 bases (códons) para cada aminoácido que constitui as proteínas.

Códon

Uma sequência de três nucleotídeos que especificam um aminoácido ou representam um sinal de terminação.

Cromossomos

Estruturas nas células que contêm o DNA associado com proteínas. Os genes estão contidos nos cromossomos.

Cultura

Como um nome, significa o crescimento de microrganismos em meio preparado. Como verbo, o crescimento.

Cultura celular

Crescimento de células sob condições laboratoriais.

D

Demanda Biológica de Oxigênio (BOD)

A amostra de oxigênio usada para crescer microrganismos em água que contém matéria orgânica. Comumente utilizada como indicadora de níveis de poluição.

Diagnóstico

Processo usado para detectar uma doença ou uma condição médica. Sondas de DNA e anticorpos são utilizados em diagnósticos.

Diferenciação

O processo de mudanças bioquímicas e estruturais pelas quais as células tornam-se especializadas em forma e função.

Diplóide

Células contendo dois conjuntos de cromossomos “idênticos”.

DNA (ácido desoxiribonucléico)

A molécula que carrega a informação genética da maioria dos organismos. O DNA consiste de quatro bases (adenina, citosina, guanina e timina) e um arcabouço formado por açúcar e fosfatos, arranjados em duas fitas que formam uma dupla hélice.

DNA complementar (cDNA)

DNA sintetizado utilizando como molde o RNA mensageiro. Este tipo de DNA é usado para clonagem ou como sondas para localizar genes específicos em estudos de hibridização.

Dupla hélice

Termo usado para descrever a configuração da molécula de DNA. A hélice consiste de duas fitas de nucleotídeos, espiralizadas, ligadas uma a outra por pontes de hidrogênio entre as bases.

E

Endonuclease

Uma enzima capaz de clivar o DNA em pontos específicos, internamente, produzindo assim fragmentos de DNA.

Engenharia genética

A tecnologia usada para alterar o material genético das células vivas para torná-las capazes de produzir novas substâncias ou realizar determinadas funções.

Enzima

Uma proteína com atividade catalítica que acelera a velocidade de reações químicas. São necessárias para o crescimento celular e reprodução.

Enzima de Restrição

Uma enzima que cliva o DNA em sequências específicas.

***Escherichia coli* (*E. coli*)**

Uma bactéria que habita o trato intestinal da maioria dos vertebrados. A maioria dos trabalhos em biologia molecular a utilizam porque ela é geneticamente bem caracterizada.

Eucarioto

Uma célula ou organismo que contém um núcleo verdadeiro, com uma membrana bem definida circundando o núcleo. Todos os organismos, exceto bactérias, vírus e algas azuis são eucariotos.

Éxon

Em células eucarióticas, a parte do gene que é representada no RNA mensageiro e codifica uma proteína. Ver também íntron e "splicing".

Exonuclease

Uma enzima que quebra o DNA apenas nas extremidades da cadeia polinucleotídica, liberando assim um nucleotídeo por vez, em ordem sequencial.

Expressão

Em genética, a manifestação de uma característica que é especificada por um gene. Em doenças hereditárias, por exemplo, uma pessoa pode carregar um gene para uma doença, mas pode não ter a doença. Neste caso, o gene está presente, mas não está sendo expresso. Em biotecnologia industrial, o termo é frequentemente usado para descrever o processo de produção de uma proteína pela inserção de seu gene em um organismo hospedeira.

F

Fatores estimulantes de colônia

Grupo de linfocinas as quais induzem a maturação e proliferação de células brancas a partir de células primitivas presentes na medula.

Fenótipo

Características observáveis, resultantes da interação entre o genótipo e o ambiente.

Fermentação

Processo de crescimento de microrganismos para a produção de vários compostos químicos ou farmacêuticos. Micróbios são normalmente incubados sob condições específicas na presença de nutrientes em grandes tanques chamados fermentadores.

Fotossíntese

Estratégia utilizada pelas plantas para converter energia luminosa em energia química, a qual é então usada para dar suporte aos processos biológicos das plantas.

Fungo

Um organismo eucarioto que possui parede celular. Não podem realizar fotossíntese e se alimentam de matéria orgânica

Fusão

União da membrana de duas células, criando uma célula filha que contém o material nuclear das células parentais. Usada para fazer hibridomas.

G

Gene

Um segmento do cromossomo responsável pela codificação de uma proteína ou de RNA com função dentro da célula (ex. RNA transportador, ribossômico, etc...).

Gene estrutural

Um gene que codifica para uma proteína, tal qual uma enzima.

Gene regulatório

Um gene que atua no controle atividade de outros genes.

Genética Molecular

Estudo de como os genes funcionam e controlam o funcionamento celular.

Genoma

O material hereditário total de uma célula, compreendendo todo o conjunto de cromossomos encontrado no núcleo de uma espécie.

Genótipo

Características genéticas de um indíviduo.

Germoplasma

A variabilidade genética total, representada por células germinativas ou sementes, avaliável para uma população de organismos em particular.

H

Haplóide

Uma célula que possui a metade do número usual de cromossomos ou apenas um conjunto de cromossomos.

Hereditariedade

Transferência da informação genética de pais para a sua progênie.

Hibridização

Produção de uma prole de híbridos a partir de parentais não similares. O processo pode ser usado para produzir plantas híbridas (pelo cruzamento de duas variedades diferentes) ou hibridomas (células híbridas formadas pela fusão de duas células diferentes, usadas para produzir anticorpos). O termo também é usado para se referir à ligação de fitas complementares de DNA ou RNA.

Hibridoma

Célula produzida pela fusão de duas células de diferentes origens. Na tecnologia de anticorpos monoclonais, hibridomas são formados pela fusão de uma célula imortal (que se divide continuamente) e uma célula que produz um anticorpo.

Homólogo

Correspondente em estrutura, posição ou origem (principalmente esta última).

Hormônio

Um composto, podendo ser um peptídeo, que atua como um mensageiro, liberando instruções para que se comece ou pare certas atividades fisiológicas. Hormônios são sintetizados em um tipo de célula e então liberados para atuar em outros tipos celulares.

Hormônio de Crescimento (Somatotropina)

Uma proteína produzida na glândula pituitária (hipófise) e que é envolvida em crescimento celular. Hormônio de crescimento humano é usado para tratar nanismo. Vários hormônios de crescimento animais são utilizados para incrementar a produção de leite bem como para produzir um tipo de carne com menor teor de gordura.

Hospedeiro

Uma célula ou organismo usado para crescimento de um vírus, plasmídeo, ou outra forma de DNA exógeno, ou para produção de substâncias clonadas.

I

Imunidade

Não susceptibilidade a doenças ou efeitos tóxicos de um material antigênico.

Imunidade ativa

Um tipo de imunidade adquirida para uma doença ou por ter portado a doença ou ter recebido uma vacina contra ela.

Imunoensaio

Técnica para identificar substâncias através de anticorpos.

Imunodiagnóstico

O uso de anticorpos específicos para dosar uma substância. Esta ferramenta é útil para diagnóstico de doenças infecciosas e a presença de substâncias estrangeiras em uma variedade de fluídos animais (sangue, urina, etc...). Esta sendo investigado o uso para localizar células tumorais no corpo.

Imunogênico

Qualquer substância que pode estimular uma resposta imune.

Imunoglobulina

Nome geral para proteínas que funcionam como anticorpos.

Imunologia

Estudo de todo fenômeno relacionado com a resposta do corpo a um antígeno apresentado (ex. imunidade, sensibilidade e alergia).

Imunotoxina

Anticorpos monoclonais que tem uma molécula tóxica agregada. A molécula é direcionada contra uma célula tumoral e a toxina é responsável pela morte da célula.

Interferon

Uma classe de proteínas importantes na resposta imune. Interferons inibem infecções virais e podem ter propriedades anti-câncer.

Íntron

Em eucariotos, uma sequência de DNA que é contida no gene, mas não codifica para proteína. É retirado do RNA recém sintetizado pelo mecanismo de "Splicing".

In vitro

Literalmente, "in vidro". Realizado em um tubo de teste ou outro recipiente de laboratório.

In vivo

No organismo vivo.

L

Leucócito

Célula branca do sangue, linfa e tecidos que é um componente importante na resposta imune.

Ligase

Uma enzima que liga segmentos de DNA ou RNA, sendo chamadas DNA ligases e RNA ligases respectivamente.

Ligação (Linkage)

A tendência de certos genes de ser herdados juntos devido a uma proximidade física no cromossomo.

Linfócitos B (B-cells)

Uma classe de linfócitos liberados da medula, a qual produz anticorpos.

Linhagem celular

Células que crescem e replicam continuamente fora do organismo vivo.

Linfocina

Uma classe de proteínas solúveis, produzidas por células brancas do sangue, que desempenham um papel na resposta imune.

Lise

Quebra de células em partes.

M

Mapeamento Gênico

Determinação da posição relativa de um gene no cromossomo.

Meio de cultura

Qualquer sistema de nutrientes para o cultivo de bactérias ou outras células; usualmente é uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos.

Meiose

Processo de divisão da célula no qual a célula filha possui metade do número de

cromossomos da parental. Células sexuais são formadas por este processo.

mRNA (RNA mensageiro)

Ácido, nucléico, fita simples, que carrega a instrução para o ribossomo sintetizar uma proteína em particular.

Metabolismo

Todas as atividades bioquímicas realizadas por um organismo para mantê-lo vivo.

Micróbios herbicidas/pesticidas

Microrganismos que são tóxicos para plantas/insetos específicos. Devido a sua especificidade e toxicidade limitada, estes organismos podem ser preferidos aos químicos para controle de pestes.

Microbiologia

Estudo de organismos vivos que só podem ser vistos com o uso de um microscópio.

Microrganismo

Qualquer organismo que só pode ser visto com ajuda de um microscópio. Também chamado de micróbio.

Mieloma

Um tipo de célula tumoral que é usada na tecnologia de anticorpos monoclonais para formar hibridomas.

Mitose

Processo de reprodução da célula pelo qual as células filhas são idênticas em número cromossômico às parentais.

Mutagênico

Substância que induz mutações.

Mutante

Uma célula que manifesta novas características devido a modificações no DNA.

Mutação

Uma troca repentina no material genético de uma célula.

N

Nuclease

Uma enzima que, pela clivagem de ligações químicas, quebra o DNA em seus nucleotídeos constituintes.

Nucleotídeos

Os blocos constituintes dos ácidos nucléicos. Cada nucleotídeo é composto de açúcar, fosfato e uma das quatro bases nitrogenadas. A sequência de bases dentro de um ácido nucléico determina qual proteína será sintetizada.

Núcleo

A estrutura dentro das células eucarióticas, circundada por uma membrana, que contém os cromossomos de um organismo.

Número de cópias

Geralmente refere-se ao número de moléculas de um plasmídeo em comparação com o cromossomo.

O

Oligonucleotídeo

Um polímero consistindo de um pequeno número de nucleotídeos.

Oncogene

Gene capaz de causar câncer.

Operador

Uma região do cromossomo, adjacente ao operon, onde uma proteína repressora liga para prevenir a transcrição do operon.

Operon

Sequência de genes responsáveis pela síntese de enzimas necessárias para a biossíntese ou utilização de determinadas moléculas. Um operon é controlado por uma sequência operadora e um gene repressor.

P

Par de bases

Duas bases em diferentes fitas do DNA que se pareiam entre si. Adenina sempre pareia com tima e uracila e guanina com citosina.

Patógeno

Organismo causador de doença.

Peptídeo

Dois ou mais aminoácidos ligados por uma ligação peptídica.

Plasma

A fração fluídica do sangue (não celular).

Plasmídeo

Uma forma de DNA circular que carrega certos genes e é capaz de replicar autonomamente em uma célula hospedeira.

Policlonal

Derivado de vários tipos de células.

Polímero

Uma molécula longa de unidades repetidas.

Polimerase

Termo geral para descrever enzimas que realizam a síntese de ácidos nucléicos.

Polipeptídeo

Cadeia longa de aminoácidos ligados por ligações peptídicas.

Procarioto

Um organismo (bactéria, algas azuis) no qual o DNA não está incluso dentro de uma membrana nuclear.

Processamento "Downstream"

Os estágios de processamento realizados após a fermentação ou bioconversão. Inclui separação, purificação e empacotamento do produto.

Promotor

Uma sequência de DNA que é localizada antes do início de um gene e que controla a sua expressão. Promotores são requeridos para a ligação da RNA polimerase e consequente início da transcrição.

Proteína

Uma molécula composta de aminoácidos. Existem muitos tipos de proteínas, todas desenvolvem um número diferente de funções essenciais para o crescimento da célula.

Protoplasto

Uma célula (fungo ou planta) que teve sua parede celular removida, geralmente por tratamentos enzimáticos.

R

Radioimunoensaio

Um teste diagnóstico que usa anticorpos para detectar traços de uma substância. Estes testes são úteis em pesquisa bioquímica para o estudo de drogas interagindo com seus receptores.

Recombinante, DNA (rDNA)

O DNA formado pela combinação de segmentos de DNA de diferentes tipos de organismos.

Replicação

Reprodução ou duplicação de uma cópia exata de uma fita de DNA.

Repressor

Uma proteína que liga a um operador adjacente a um gene estrutural, inibindo a transcrição deste gene.

Retrovirus

Vírus de RNA que contém a enzima transcriptase reversa. Esta enzima converte o RNA viral em DNA, o qual se combina com o DNA da célula e promove a síntese de mais partículas virais e RNA para os novos vírus.

Ribossomo

Um componente celular, contendo proteína e RNA, envolvido (e essencial) na síntese de proteínas.

Ribozima

Uma enzima feita de RNA ao invés de proteína. Ribozimas desenhadas podem cortar as moléculas de RNA em pontos específicos são conhecidas como "tesouras gênicas".

RNA (ácido ribonucléico)

Uma molécula similar ao DNA, porém simples fita, que funciona primariamente para decodificar instruções para a síntese de proteínas contidas nos genes.

S

Sequência de DNA

A ordem de bases na molécula de DNA.

Sequenciamento de DNA

Determinação da sequência de bases do DNA.

Sistema vetor-hospedeiro

Combinação de uma célula que recebe o DNA (hospedeira) e uma substância transportadora de DNA (vetor) usada para introduzir DNA exógeno em uma célula.

Sistema imune

A agregação de células, substâncias biológicas (anticorpos), e atividades celulares que juntos dão resistência a um organismo.

Sonda de DNA

DNA marcado com isótopo radioativo, corante ou enzima, e que é utilizado para localizar uma sequência particular de nucleotídeos ou um gene na molécula de DNA.

Splicing

Remoção dos íntron e ligação de éxons para formar uma sequência contígua no RNA.

Substrato

Molécula ou material que sofre ação de uma enzima.

Supressor (gene)

Um gene que pode reverter o efeito de uma mutação em outros genes.

T

Terapia gênica

A substituição de um gene defeituoso em um organismo que sofre de uma doença genética. Técnicas de DNA recombinante são utilizadas para isolar o gene e inseri-lo em humanos.

Template

Uma molécula que serve como molde para síntese de outra.

Terapêuticos

Compostos que são usados para tratar doenças específicas.

T-cells (linfócitos T)

Glóbulos brancos que são produzidos na medula, mas maturados no timo. Eles são importantes nas defesas do corpo contra certas bactérias e fungos; ajudam os linfócitos B a fazer anticorpos e ajudam no reconhecimento e rejeição de tecidos estranhos. Linfócitos T podem ser importantes na defesa contra o câncer.

Toxina

Uma substância tóxica produzida por certos microrganismos.

Transcrição

Síntese do RNA mensageiro (ou qualquer outro) utilizando como molde o DNA.

tRNA (RNA transportador)

Molécula de RNA que carrega aminoácidos para sítios nos ribossomos para síntese das proteínas.

Transformação

Alteração na estrutura genética de um organismo pela incorporação de um DNA exógeno.

Transgênico (organismo)

Um organismo formado pela inserção de um material genético na linhagem germinativa de organismos. Técnicas de DNA recombinante são comumente utilizadas para produzir organismos transgênicos.

Tradução

Processo pelo qual a informação contida no RNA mensageiro é usada para dirigir a síntese de uma proteína.

V

Vacina

Uma preparação que contém um antígeno consistindo no organismo inteiro (morto ou atenuado) ou partes deste organismo, usado para causar imunidade contra uma doença que este organismo causa. Vacinas podem ser naturais, sintéticas ou derivadas da tecnologia do DNA recombinante.

Vetor

O agente (plasmídeo ou vírus) usado para transferir DNA para uma célula.

Virion

Uma partícula viral elementar consistindo de material genético e uma capa protéica.

Virulência

Habilidade de infectar e causar doença.

Vírus

Um organismo sub-microscópico que contém informação genética mas não consegue se reproduzir autonomamente. Para replicar, ele deve invadir uma célula e usar parte da sua maquinaria reprodutiva.

W

Wild type (tipo selvagem)

A forma de um organismo que ocorre mais frequentemente na natureza.

Y

Levedura

Termo geral que descreve fungos unicelulares que se reproduzem por brotamento. Algumas leveduras podem fermentar carboidratos (amido (amido e açúcar),sendo muito importantes na fabricação de pães e outros alimentos.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, S. R. M. **Biossegurança ambiental de OGMs.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2006, 32 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 168).

ANDRADE, S. R. M. **Biossegurança de alimentos transgênicos.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2004. 22 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 130).

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).

ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados 2003. 28 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 102).

BOREM, A. **Melhoramento de plantas.** 2. ed. Vicosa: Editora UFV, 1998, 453 p.

BOREM, A.; GIUDICE, M. P. **Biotecnologia e Meio Ambiente.** 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2008. v. 1. 510 p.

BOREM, A.; SANTOS, F. R. **Entendendo a Biotecnologia.** Visconde do Rio Branco: Suprema, 2008. v. 1. 342 p.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasilia, DF: Embrapa SPI/Embrapa – Cenargen, 1998. 309 p**.**

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 183 p.

FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Pre-melhoramento, melhoramento e pos-melhoramento**: estrategias e desafios.

FERRI, E.; BARBUTO, M.; BAIN, O.; GALIMBERTI, A.; SHIGEHIKO, U.; GUERRERO, R. A.; FERTE, H.; BANDI, C.; MATIN, C.; CASIRAGHI, M. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). **Frontiers in Zoology,** v. 6, p. 1-26, 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech, The Netherlands: Springer, 2008. 501 p.

O'FARREL, P.H. High Resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. 184 p. SASSON, A. **Plant and agricultural biotechnology:** achievements, prospects and perceptions. Monterrey, UNU-IAS/ Coordination of Science and Technology of the State of Nuevo Leon, 2006, 444 p.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SASSON, A. **Plant and Agricultural Biotechnology:** Achievements, Prospects and Perceptions. México: Ciencia y Tecnología, 2006. 444 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasilia, DF: Embrapa SPI/Embrapa – CNPH, 1999. v. 2. 354 p.

Hino Nacional

Ouviram do Ipiranga as margens plácidas
De um povo heróico o brado retumbante,
E o sol da liberdade, em raios fúlgidos,
Brilhou no céu da pátria nesse instante.

Se o penhor dessa igualdade
Conseguimos conquistar com braço forte,
Em teu seio, ó liberdade,
Desafia o nosso peito a própria morte!

Ó Pátria amada,
Idolatrada,
Salve! Salve!

Brasil, um sonho intenso, um raio vívido
De amor e de esperança à terra desce,
Se em teu formoso céu, risonho e límpido,
A imagem do Cruzeiro resplandece.

Gigante pela própria natureza,
És belo, és forte, impávido colosso,
E o teu futuro espelha essa grandeza.

Terra adorada,
Entre outras mil,
És tu, Brasil,
Ó Pátria amada!
Dos filhos deste solo és mãe gentil,
Pátria amada,Brasil!

Deitado eternamente em berço esplêndido,
Ao som do mar e à luz do céu profundo,
Fulguras, ó Brasil, florão da América,
Iluminado ao sol do Novo Mundo!

Do que a terra, mais garrida,
Teus risonhos, lindos campos têm mais flores;
"Nossos bosques têm mais vida",
"Nossa vida" no teu seio "mais amores."

Ó Pátria amada,
Idolatrada,
Salve! Salve!

Brasil, de amor eterno seja símbolo
O lábaro que ostentas estrelado,
E diga o verde-louro dessa flâmula
- "Paz no futuro e glória no passado."

Mas, se ergues da justiça a clava forte,
Verás que um filho teu não foge à luta,
Nem teme, quem te adora, a própria morte.

Terra adorada,
Entre outras mil,
És tu, Brasil,
Ó Pátria amada!
Dos filhos deste solo és mãe gentil,
Pátria amada, Brasil!

Hino do Estado do Ceará

Poesia de Thomaz Lopes
Música de Alberto Nepomuceno
Terra do sol, do amor, terra da luz!
Soa o clarim que tua glória conta!
Terra, o teu nome a fama aos céus remonta
Em clarão que seduz!
Nome que brilha esplêndido luzeiro
Nos fulvos braços de ouro do cruzeiro!

Mudem-se em flor as pedras dos caminhos!
Chuvas de prata rolem das estrelas...
E despertando, deslumbrada, ao vê-las
Ressoa a voz dos ninhos...
Há de florar nas rosas e nos cravos
Rubros o sangue ardente dos escravos.
Seja teu verbo a voz do coração,
Verbo de paz e amor do Sul ao Norte!
Ruja teu peito em luta contra a morte,
Acordando a amplidão.
Peito que deu alívio a quem sofria
E foi o sol iluminando o dia!

Tua jangada afoita enfune o pano!
Vento feliz conduza a vela ousada!
Que importa que no seu barco seja um nada
Na vastidão do oceano,
Se à proa vão heróis e marinheiros
E vão no peito corações guerreiros?

Se, nós te amamos, em aventuras e mágoas!
Porque esse chão que embebe a água dos rios
Há de florar em meses, nos estios
E bosques, pelas águas!
Selvas e rios, serras e florestas
Brotem no solo em rumorosas festas!
Abra-se ao vento o teu pendão natal
Sobre as revoltas águas dos teus mares!
E desfraldado diga aos céus e aos mares
A vitória imortal!
Que foi de sangue, em guerras leais e francas,
E foi na paz da cor das hóstias brancas!

GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ

Secretaria da Educação