

Biologia molecular e biotecnologia

Biologia molecular e biotecnologia

Ana Claudia Bensuaski de Paula Zurron

© 2016 por Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer outro tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Presidente

Rodrigo Galindo

Vice-Presidente Acadêmico de Graduação

Mário Ghio Júnior

Conselho Acadêmico

Dieter S. S. Paiva Camila Cardoso Rotella Emanuel Santana Alberto S. Santana Regina Cláudia da Silva Fiorin Cristiane Lisandra Danna Danielly Nunes Andrade Noé

Parecerista

Rafaela Benatti de Oliveira

Editoração

Emanuel Santana Cristiane Lisandra Danna André Augusto de Andrade Ramos Daniel Roggeri Rosa Adilson Braga Fontes Diogo Ribeiro Garcia eGTB Editora

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Zurron, Ana Claudia Bensuaski de Paula
Z96b Biologia molecular e biotecnologia / Ana Claudia
Bensuaski de Paula Zurron. - Londrina : Editora e
Distribuidora Educacional S.A., 2016.
224 p.

ISBN 978-85-8482-387-1

1. Biotecnologia. 2. Biologia molecular. I. Título.

CDD 570

2016
Editora e Distribuidora Educacional S.A.
Avenida Paris, 675 — Parque Residencial João Piza
CEP: 86041-100 — Londrina — PR
e-mail: editora.educacional@kroton.com.br
Homepage: http://www.kroton.com.br/

Sumário

Unidade 1 Análise de ácidos nucleicos	7
Seção 1.1 - Fundamentos da biologia molecular	9
	21
Seção 1.2 - Replicação do DNA e transcrição e processamento do RNA	33
Seção 1.3 - Técnicas utilizadas para extração de DNA	45
Seção 1.4 - Evolução da biologia molecular	43
Unidade 2 Análise de proteínas	59
Seção 2.1 - Código Genético	61
Seção 2.2 - Síntese de proteínas.	73
Seção 2.3 - Conceitos e funções das técnicas de análise de proteínas	
Seção 2.4 - Técnicas de análise para detecção de ácidos nucleicos	99
Unidade 3 metodologias de análise em biologia molecular	113
Seção 3.2 - As técnicas moleculares: Ácidos nucléicos, genômica e	113
proteômica	127
Seção 3.3 - Técnicas de análise — Eletroforese	141
Seção 3.4 - Técnicas de análise: PCR e técnicas de hibridização	153
Unidade 4 Biotecnologia	169
Seção 4.1 - Biotecnologia e suas definições	171
Seção 4.2 - Aplicações biotecnológicas atuais	183
Seção 4.3 - Avanços científicos proporcionados pela biotecnologia	197
Seção 4.4 - Perspectivas da biotecnologia	209

Palavras do autor

Caro aluno, vamos ingressar nesta nova proposta de estudo e entender a importância da Biologia Molecular e da Biotecnologia. Dessa forma, você irá aprender sobre diferentes assuntos importantes a respeito dessa disciplina que serão fundamentais para a sua vida profissional. Em sua rotina diária, podemos nos deparar com situações que vamos trabalhar ao longo deste livro, utilizando sem perceber os conceitos apresentados, facilitando o aprendizado.

Neste livro você terá acesso a todas as informações relacionadas à Biologia Molecular e Biotecnologia, por meio da divisão dos vários assuntos em quatro unidades:

No conteúdo relacionado a Análise de Ácidos Nucleicos, você estudará a estrutura e as informações genéticas do DNA e ainda a importância e a função das enzimas de restrição e da enzima DNA ligase. Verá também, como acontece a clonagem de DNA e quais as características dessa técnica, a replicação do DNA, transcrição e processamento do RNA. Além disso, você estudará também a transformação do RNA mensageiro em cDNA (DNA complementar), os métodos de extração e análise laboratorial de DNA, a importância do Projeto Genoma, assim como conhecimentos sobre o sequenciamento de DNA.

No conteúdo que envolve a Análise de Proteínas, você irá entender o código genético e a síntese proteica, sistemas de expressão de proteínas in vitro. A purificação de proteínas e as aplicações das proteínas recombinantes. Neste conteúdo, também, será verificado como aplicar as técnicas de coloração não radioativas para detecção de ácidos nucleicos e a importância das mutações.

No conteúdo de Metodologias de Análise em Biologia Molecular você aprenderá a importância da caracterização e utilização dos métodos/técnicas moleculares, quais os principais marcadores genéticos no estudo do DNA, e a interação dos ácidos nucleicos e proteínas na análise genética, o uso de técnicas da eletroforese, PCR e as técnicas de hibridização nos estudos de mecanismos fisiológicos e patológicos. Também serão verificadas as aplicações da biotecnologia, envolvendo agentes biológicos e o cultivo in vitro de células animais, o uso dos marcadores moleculares e os organismos geneticamente modificados. Além da importância das células-tronco na pesquisa e tratamento de doenças.

Por fim, veremos a bioinformática na identificação de novos produtos biotecnológicos, envolvendo a saúde e o meio ambiente.

Em cada aula, você terá uma situação-problema para resolver, despertando seu interesse e sua criatividade nos assuntos abordados, trabalhando habilidades e atividades que serão fundamentais para a sua formação profissional. Através do autoestudo, você terá contato com conceitos que possibilitarão resolver problemas que serão enfrentados no seu dia a dia.

Vamos iniciar? Bons estudos!

ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Convite ao estudo

Nesta unidade, vamos trabalhar introduzindo o tema de Biologia Molecular, a estrutura e as informações genéticas do DNA; a função e a importância das enzimas de restrição e da enzima DNA ligase, assim como também assuntos relacionados à clonagem de DNA e suas características.

A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia. A competência técnica está relacionada em conhecer os procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA, as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas e os fundamentos e aplicações da Biotecnologia.

Nesta disciplina, os objetivos são: entender a estrutura e as informações genéticas do DNA, incluindo a replicação do DNA, transcrição e processamento do RNA, o código genético e a síntese de proteínas, as técnicas de análise de ácidos nucleicos e a evolução da Biologia Molecular. Além da Biotecnologia e o avanço científico, visando perspectivas atuais.

Clara está grávida e feliz, no entanto, ansiosa para saber se será mãe de um menino ou de uma menina. Assim, ela procurou uma clínica que faz o exame de determinação de sexo do seu bebê. Após descobrir que terá uma menina, ela se sentiu realizada, pois sempre quis ser mãe de uma garotinha.

Em cada seção desta unidade você vai acompanhar a gravidez de Clara e, com a ajuda da Biologia Molecular e da Biotecnologia, você irá entender e resolver as situações-problema com o auxílio de materiais pedagógicos como: o livro didático, a web aula e as leituras que serão sugeridas.

Preparado? Então vamos começar. Bons estudos!

Seção 1.1

Fundamentos da biologia molecular

Diálogo aberto

Clara está grávida e ansiosa para saber se será mãe de um menino ou de uma menina. Assim, ela procura uma clínica que faz o exame de determinação de sexo do seu bebê. Após descobrir que terá uma menina, ela se sentiu realizada, pois sempre quis ser mãe de uma garotinha.

Clara está no oitavo mês de gestação e o pai de sua filha, nesse momento, resolveu argumentar que não seria o pai genético da criança. Clara ficou muito nervosa e não passou bem nos últimos dias. Assim, falou para seu marido que realizaria o teste de paternidade para tirar sua dúvida. Com essa situação, Clara teve alterações em sua pressão arterial devido à ansiedade e preocupação pela qual está passando na fase final de sua gravidez. Com base nessas informações, o teste de paternidade que deverá ser realizado envolverá temas da Biologia Molecular? Como deve ser feito esse teste para saber se o marido de Clara está dizendo a verdade?

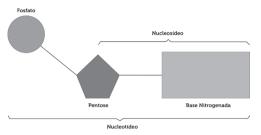
Todos os conteúdos que serão abordados no item "Não pode faltar" vão auxiliar você a pensar na importância da Biologia Molecular no caso do teste de paternidade, e também vão ajudar você a entender a solução do problema enfrentado por Clara.

Não pode faltar

O aprendizado da Biologia Molecular consiste principalmente em estudar as interações entre os diferentes sistemas celulares, partindo da relação entre os ácidos nucleicos conhecidos como DNA e RNA, assim como também a síntese de proteínas.

Os ácidos nucleicos são grandes moléculas ou macromoléculas, formadas por unidades monoméricas um pouco menores, conhecidas como nucleotídeos. Cada nucleotídeo, por sua vez, é formado por três partes:

Figura 1.1 | Esquema de um Nucleotídeo:



Fonte: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica14.php>. Acesso em: 30 out. 2015.

- Um açúcar do grupo das pentoses (monossacarídeos com cinco átomos de carbono);
- Um radical "fosfato", derivado da molécula do ácido ortofosfórico (H3PO4);
- Uma base orgânica nitrogenada.

Os ácidos nucleicos DNA (ácido

desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) estão presentes e guardam inúmeras informações genéticas as quais participam da realização do trabalho celular.

Os ácidos nucleicos estão nos cromossomos do núcleo celular. Cada cromossomo é formado por uma molécula de dupla hélice de DNA, que se apresenta condensada com proteínas. A dupla hélice dá duas voltas enrolando-se nas **histonas**, que são proteínas básicas. Assim, o complexo formado por DNA e proteína é conhecido por **nucleossomo**, formando uma fibra que apresenta um aspecto de "colar".

Sabe-se que as células conservam o DNA compactado, ou seja, "enrolado em espiral" na maior parte do tempo; isso mantém um controle na expressão de um gene. Também quando as células entram no processo de divisão celular, o DNA presente nos cromossomos condensa-se em níveis ainda maiores. Entretanto, quando um gene é ativado, o DNA desenrola-se para permitir que o RNA inicie a **transcrição**, para que posteriormente ocorra a síntese de proteínas. Sabese, ainda, que é pela associação dos diferentes nucleotídeos que se formam as macromoléculas dos dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido ribonucleico (RNA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA). Eles foram assim chamados justamente em função dos açúcares presentes em suas moléculas: O RNA contém o açúcar ribose e o DNA contém o açúcar desoxirribose.

Outra diferença importante entre as moléculas de DNA e de RNA diz respeito à constituição das bases nitrogenadas, que pertencem a dois grupos:

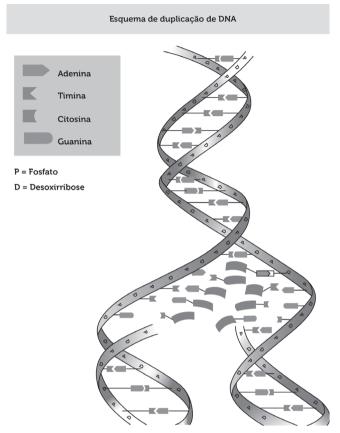
- As bases conhecidas como púricas: adenina (A) e guanina (G);
- As bases conhecidas como pirimídicas: timina (T), citosina (C) e uracila (U).

Quando estudamos o DNA, as bases nitrogenadas são então a citosina, a guanina, a adenina e a timina. No caso do RNA, a alteração ocorre no lugar da timina, encontrando-se a uracila.

De três seus componentes aue compõem 0 ácido nucleico, como açúcar, radical fosfato e base orgânica nitrogenada, apenas o radical fosfato não varia no nucleotídeo. Os açúcares e as bases nitrogenadas são variáveis.

molécula de DNA que compõe material hereditário (cromossomo) é longa e contém milhares de genes. Quando extraído das células, o DNA apresenta-se muito frágil, podendo se romper. Se a quebra acontecer casualmente, isso pode separar um arquivo em dois ou mais fragmentos de DNA diferentes.

Figura 1.2 | A molécula de DNA



Enzimas de restrição

A descoberta das enzimas de restrição ou **endonucleases** foi um grande marco para o desenvolvimento da Engenharia Genética. Assim, a obtenção dos fragmentos de DNA são usados para criar *in vitro* (no laboratório) novas moléculas, recortando e colando diferentes pedaços de informações genéticas.

Essas enzimas são verdadeiras tesouras moleculares, pois cortam o DNA em pontos específicos, permitindo defender as células de organismos invasores. Também conhecidas como endonucleases, as enzimas de restrição têm a função de cortar a dupla hélice do DNA de forma bastante precisa. Primeiramente, se reconhece uma sequência específica no DNA, que possui um número de 4 a 6 bases nitrogenadas e, então, as enzimas de restrição cortam cada cadeia em um dado ponto da molécula. O local do "corte" de uma enzima é conhecido como sítio-alvo. Você pode perguntar por que essa enzima não atua no DNA da própria

bactéria. Isso não ocorre devido à existência de outras enzimas protetoras, que impedem a ação das enzimas de restrição no material genético da bactéria.

Uma das primeiras enzimas de restrição a ser isolada foi a enzima produzida pela bactéria *Escherichia coli* conhecida por *Eco*RI. Essa enzima reconhece apenas a sequência de bases nitrogenadas conhecida por GAATTC atuando sempre entre a quanina (G) e a adenosina (A).

Cada molécula de DNA pode apresentar repetições da sequência GAATTC ao longo de toda sua extensão. Portanto, quando a fita de DNA entra em contato com a enzima *EcoRI*, pode ser clivada ou "cortada" em diversos lugares, criando pedaços de tamanhos diferentes.

Existem três tipos de enzimas de restrição, sendo assim as bases de reconhecimento da enzima exibem a mesma leitura nos dois sentidos, por exemplo: a enzima de restrição *EcoRI* reconhece a sequência de bases nitrogenadas:

Sequência da fita de DNA acontece no sentido 5´ para 3´ devido às ligações entre o grupo 3´ do fosfato e o carbono 5´ da pentose.

A leitura da sequência genética acontece na direção 5´ para 3´, sendo assim essa leitura de pares de bases acontece da esquerda para a direita e é exatamente igual à da cadeia inferior quando lida da direita para a esquerda. Isso acontece porque temos livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose em uma extremidade e, em outra, a hidroxila livre do carbono-3 da última pentose. Esse tipo de sequência de DNA é chamada **sequência palindrômica**.

Não se sabe por que as enzimas de restrição agem dessa forma ou em sequências desse tipo e cortam o DNA dessa maneira, mas isso facilita o estudo de diversas pesquisas. As pontas do DNA cortado por essas enzimas de restrição apresentam determinadas "caudas" como o mesmo número de bases que estão livres. Devido à estrutura helicoidal, as "pontas" do DNA têm a tendência de se arranjar, pois são complementares (pares de bases nitrogenadas se complementam). Vamos nos lembrar do pareamento de bases do DNA: verificamos que a sequência _T_T_A_A, produzida em uma das pontas, se pareia ou se liga com a sequência _A_A_T_T que aparece na outra ponta da molécula.

DNA Ligase

Agora que aprendemos sobre a sequência do pareamento de bases do DNA, vamos entender a ação da enzima DNA ligase. Como o próprio nome diz, essa enzima será a responsável pela ligação entre o pareamento dessas bases complementares.

Ou seja, após a reestruturação da dupla hélice do DNA, com o devido pareamento de bases nitrogenadas, é necessária a ação da enzima DNA ligase para que as ligações químicas se recomponham entre as duas cadeias de DNA.

Clonagem de DNA e suas características

A clonagem do DNA na Biologia Molecular significa a formação de um organismo geneticamente igual a outro. A clonagem de genes é o processo de amplificar ou aumentar muitas vezes um gene particular, incorporando esse material a um outro organismo como uma bactéria, consequentemente clonando a bactéria.

Por que clonar?

A clonagem acontece para que se estabeleça o sequenciamento de DNA; também para separar fragmentos de DNA em clones independentes e, ainda, para estudar a transcrição e a tradução de um gene e realizar estudos de expressão funcional. Por fim, para sintetizar proteínas e produção de anticorpos para uso terapêutico.

Alguns avanços tecnológicos contribuíram para a técnica de clonagem como, por exemplo, a identificação de pequenas moléculas de DNA circular, conhecidas como plasmídeos; esses agentes carregam genes de resistência bacteriana a antibióticos.

No entanto, para clonar é necessário um **vetor** (que é uma molécula de DNA), como os plasmídeos e fagos.

Plasmídeos

- São pequenas moléculas circulares de DNA que possuem dupla fita e não estão incorporadas ao genoma das bactérias;
- Todos os plasmídeos usados como vetor devem ter um local de origem de replicação ou uma região conhecida como "REPLICATOR", ou seja, a partir dali começa a replicação do material genético;
- Deve-se ter ainda um marcador de seletividade e o sítio de clonagem, ou seja, uma sequência de nucleotídeos ligada ao sítio de interação com as enzimas de restrição, e que é adicionada ao vetor através de técnicas da engenharia genética. Além disso, a posterior a posterior ligação de fragmentos de restrição com as extremidades coesivas, que aparecem pela ação de enzimas conhecidas como ligases são normalmente usadas em laboratórios.



Assimile

Antes de começar a abordar mais algum conteúdo, é importante que você pare para refletir em tudo o que foi discutido até agora. Está claro para você a importância da Biologia Molecular no estudo de diversas patologias e nos diagnósticos que poderemos vir a sanar com o aprofundamento deste conteúdo? Se estiver tudo bem, ótimo sinal, podemos então prosseguir? Vamos esclarecer o conceito de organismos transgênicos que será visto mais adiante quando relacionarmos nossos conceitos à Biotecnologia.

Até agora falamos sobre o significado de algumas palavras importantes no campo da biologia molecular, como ácidos nucleicos DNA e RNA, enzimas de restrição, que são as tesouras moleculares, a enzima DNA ligase que faz a ligação entre os pares de base e as fitas de DNA ora cortadas. Além da clonagem de DNA e suas características e, dentro da clonagem, o esclarecimento do termo transgênico. Os organismos transgênicos são aqueles que carregam um gene exógeno (aquele que é de fora) incorporado de uma forma estável em seu genoma. Assim, para estudar o diabetes, por exemplo, você pode incorporar um gene envolvido na patologia do diabetes no material genético de um camundongo saudável, tendo como resultado um animal diabético devido à incorporação artificial desse material. Nesse caso você estudará os mecanismos da referida patologia e poderá trazer importantes resultados para a pesquisa sobre a doença diabetes melito.



Reflita

Antes de continuarmos nosso estudo envolvendo os métodos da Biologia Molecular e os assuntos relacionados à Biotecnologia, é importante que você pare para pensar em seu dia a dia e observe a importância do conhecimento genético e molecular em nossa vida, em nossa alimentação, saúde, e patologias que ainda não foram totalmente esclarecidas. Podemos então pensar que em várias situações que vivemos diariamente sempre iremos nos deparar com questões que, para serem resolvidas, precisam do conhecimento molecular. Hoje, com o avanço científico e tecnológico, sabemos que a maioria das respostas para nossas dúvidas está no gene, fazendo valer a pena nossos esforços e empenho neste conteúdo. O Prêmio Nobel da Química de 2015 foi para o estudo do DNA na reparação de danos que causam doenças no organismo humano. Leia o artigo referente ao assunto. Disponível em: http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2015/10/1691102-nobel-de-quimica-vai-para-estudos-dos-mecanismos-de-reparacao-do-dna.shtml>. Acesso em: 8 out. 2015.



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto, você pode ainda ler o artigo que aborda a importância do estudo da Biologia Molecular. Hoje a referida área apresenta um caminho essencial de grande potencial para a busca da cura de doenças, usando ferramentas de pesquisa e vasto conhecimento do material genético.

PINHO, M.S.L. Pesquisa em biologia molecular: como fazer? **Rev. Bras. Coloproct**, v. 26, n. 3, p. 331-6, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbc/v26n3/a16v26n3.pdf>. Acesso em: 7 out. 2015.

Quais são os tipos de clonagem?

Se fôssemos parar para pensar, quais são os tipos de clonagem que podemos encontrar?

Existem vários tipos de clonagem, como a natural, induzida, reprodutiva e terapêutica. Em seguida vamos abordar cada um desses tipos.



Exemplificando

A clonagem para obtenção de um organismo geneticamente idêntico pode ser natural, induzida, reprodutiva, terapêutica, embrionária.



Faça você mesmo

Antes de prosseguir o seu estudo, pense na diferença entre os tipos de clonagem. Leia e analise os tipos de clonagem elencados no texto indicado. VARELLA, D. Clonagem humana. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 263-5, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 8 out. 2015.

Análise de ácidos nucleicos

15

Sem medo de errar



Atenção!

Para visualizar o contexto da importância da Biologia Molecular, você pode ler materiais ligados aos testes de paternidade de um pai já falecido, que fala a respeito de novos testes de DNA que trabalham na investigação de paternidade. JOBIM, M.R. et al. Novos testes de DNA na investigação de paternidade com suposto pai falecido. **RT/Fasc. Civ**, ano 97, v. 874, p. 55-69, ago. 2008. Disponível em: http://www.cdg.org.br/vs-arquivos/banner/artigo-doc-1478.pdf>. Acesso em: 7 out. 2015.



Lembre-se

O DNA humano sempre está disponível em quantidade suficiente para análise em todas as células nucleadas de sangue e tecidos, já em menor concentração no líquido amniótico placentário e no soro e plasma conservado.

A realização do teste de paternidade apontou que o marido de Clara é mesmo o pai biológico de sua filha. Assim, os resultados trouxeram uma confiabilidade de 99,999% de certeza nesta afirmação. O exame em DNA, para definir determinada paternidade, é comparativo. Metade do DNA vem da mãe e a outra metade vem do pai biológico. Após realizar o teste de paternidade pelo método do PCR (reação em cadeia da enzima polimerase), é feita a comparação do material dos pais com o DNA do(a) filho(a). O primeiro passo é sempre tentar excluir a paternidade com as informações obtidas no laboratório; multiplicar muitas vezes as regiões do DNA. Quando são diagnosticadas quatro ou mais discrepâncias, a paternidade deve ser excluída.

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha em mente como deve ser a relação dos testes e métodos da Biologia Molecular na relevância da determinação da paternidade explicada durante a aula e as leituras que você realizou.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com as de seus colegas.

Biologia Molecular e a vida		
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Entender a estrutura e as informações genéticas do DNA, assim como a ação de enzimas envolvidas na quebra e ligação de pares de bases estruturais do material genético. Compreender a clonagem de DNA e suas características.	
3. Conteúdos relacionados	A Biologia Molecular, estrutura e informações genéticas do DNA, enzimas de restrição e DNA ligase, clonagem de DNA e suas características.	
4. Descrição da SP	Clara está no oitavo mês de gestação e o pai de sua filha, nesse momento, resolveu argumentar que ele não seria o pai genético da criança. Clara ficou muito nervosa e não passou bem nos últimos dias. Assim, falou para seu marido que realizaria o teste de paternidade para tirar sua dúvida. Com essa situação, Clara teve alterações em sua pressão arterial pela ansiedade e preocupação pela qual está passando na fase final de sua gravidez, entrando em um período de repouso devido à pré-eclâmpsia (aumento da pressão arterial, causando risco à própria vida e à vida do bebê).	
5. Resolução da SP:	A realização do teste de paternidade apontou que o marido de Clara é mesmo o pai biológico de sua filha. Assim os resultados trouxeram uma confiabilidade de 99,999% de certeza nessa afirmação. O teste foi feito com o PCR e é extremamente confiável.	



Faça você mesmo

Com os conceitos essenciais da Biologia Molecular, faça uma pesquisa de outros métodos que podem determinar o teste de paternidade comumente utilizado em laboratórios. Procure ver as diferenças entre eles.

Faça valer a pena!

- **1.** O aprendizado da Biologia Molecular envolve interações entre os diferentes sistemas celulares, partindo da relação entre os ácidos nucleicos (DNA e RNA), assim como também a síntese de proteínas. Dessa forma podemos afirmar que:
- I- Os ácidos nucleicos são macromoléculas, formadas por unidades chamadas nucleotídeos.
- II- Cada nucleotídeo é formado por açúcar do grupo das pentoses, um radical "fosfato", uma base orgânica nitrogenada.
- III- Os ácidos nucleicos e RNA estão presentes em metade das células do organismo e guardam informações genéticas para a realização do trabalho celular.
- IV- Os ácidos nucleicos estão no citoplasma da célula.

Assim é correto afirmar que:

- a) As alternativas I e II estão corretas.
- b) As alternativas I e III estão corretas.
- c) A alternativa I está correta.
- d) A alternativa III está correta.
- e) As alternativas III e IV estão corretas.

2. Cada cromossomo é formado por uma molécula de dupla hélice d
DNA que se apresenta condensada com proteínas. A dupla hélice d
duas voltas enrolando-se nas, que são proteínas básica
Assim, o complexo formado por DNA e proteína é conhecido po
, formando uma fibra que apresenta um aspecto d
"colar". Ainda as células conservam, ou seja, "enrolad
em espiral" mantendo o controle na expressão de um gene.

De acordo com a afirmativa acima, qual a alternativa correta:

- a) Histonas, ribossomo, DNA condensado.
- b) Aminoácidos, lisossomo, DNA compactado.
- c) Histonas, nucleossomo, DNA compactado.
- d) Aminoácidos, nucleossomo, DNA condensado.

- e) Histonas, ribossomo, DNA compactado.
- **3.** Quando as células entram no processo de divisão celular, o DNA presente nos cromossomos condensa-se em níveis ainda maiores. O que acontece na síntese de proteínas?
- I- O material genético continua condensado.
- II- O material genético desaparece.
- III- O material genético sai do núcleo indo para o citoplasma.
- IV- O material genético se desenrola para realizar transcrição.

Assim, é correto afirmar que:

- a) A alternativa I é verdadeira.
- b) As alternativas I e II são verdadeiras.
- c) A alternativa III é verdadeira.
- d) A alternativa IV é verdadeira.
- e) As alternativas III e IV são verdadeiras.

Análise de ácidos nucleicos

19

Seção 1.2

Replicação do DNA e transcrição e processamento do RNA

Diálogo aberto

Clara está grávida e ansiosa para saber se será mãe de um menino ou de uma menina. Assim, ela procura uma clínica que faz o exame de determinação de sexo do seu bebê. Após o exame, descobre que será mãe de uma menina, sentindo-se realizada. Durante todo o período de sua gestação, são necessários um acompanhamento e a realização de exames de sangue para verificação das condições da quantidade de sua hemoglobina circulante em seu organismo. Por ser filha de mãe portadora de talassemia, esse acompanhamento é necessário. A talassemia é uma doença hereditária que pode causar anemia. Como Clara está grávida, sua alimentação deve ser bem elaborada e observada para que o problema com a anemia não venha afetar o transporte de oxigênio de suas células e consequentemente da nutricão fetal. Com essa situação, Clara deve fazer o acompanhamento nutricional juntamente com a realização de exames de sanque e a determinação de concentração de proteínas (hemoglobinas) pela técnica de eletroforese. Com base nessas informações, o teste da eletroforese leva você a envolver temas da Biologia Molecular? Qual a importância da realização de exames que envolvem a detecção de proteínas por técnicas de Biologia Molecular?

Todos os conteúdos que serão abordados no item "Não pode faltar" vão auxiliar você a pensar na importância da Biologia Molecular no caso do diagnóstico e tratamento da talassemia, ajudando você a entender a solução do problema enfrentado por Clara.

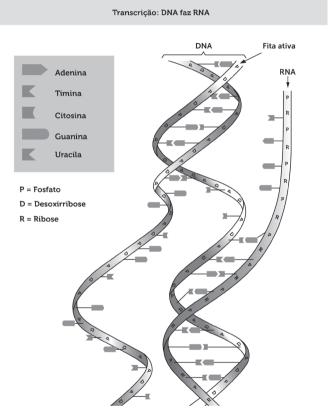
Não pode faltar

Sabemos que dentro do núcleo encontra-se o material genético responsável pela reprodução celular e garantia da vida. Mais que isso, para que tenhamos a continuidade da vida torna-se necessário que façamos cópias de nós mesmos. Essa qualidade de "copiar" está associada ao material hereditário, o DNA. Mas,

vamos pensar de que modo os organismos fazem essas cópias? As cópias do material hereditário são feitas através da duplicação do DNA, ou seja, de um processo molecular conhecido como replicação. Assim, a replicação é exatamente o processo de duplicação de uma molécula de DNA de dupla hélice. O que sabemos, e é de grande importância, é que essa replicação é semiconservativa, ou seja, a reprodução ou a cópia da molécula de DNA conserva uma das cadeias que vem da "molécula-mãe", produzindo uma nova cadeia complementar àquela que lhe serviu de molde. Este modelo foi proposto no ano de 1953 pelos pesquisadores Watson e Crick que propuseram então o modelo semiconservativo para o DNA.

No entanto, o DNA não se replica sozinho, você sabia disso? Para que inicie o processo de replicação, faz-se necessária a atuação de uma enzima conhecida como helicase, que vai deslizando e abrindo molécula de DNA. formando duas cadeias que se apresentam separadas; outra enzima chamada polimerase vai ligando os novos grupos denucleotídeos formados por complementaridade de bases à cadeia de DNA que se pareia com OS nucleotídeos da molécula-mãe Dessa maneira, de uma cadeia original de DNA formamse duas, sendo uma nova e a outra idêntica à molécula-mãe.

Figura 1.2 | Duplicação do DNA



Fonte: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/AcNucleico5.php. Acesso em: 30 out. 2015.

Assim, a replicação do DNA é considerada um processo de "autoduplicação" do material genético, mantendo o padrão de herança ao longo das gerações. Um exemplo experimental muito usado em pesquisa científica é a técnica de PCR ou a técnica da reação em cadeia da enzima polimerase. Neste caso, pesquisadores extraem o DNA do tecido humano ou de animais e replicam esse material genético por milhões de vezes , em laboratório. O fato de ter em mãos o material genético

disponível para estudo favorece o avanço de pesquisa científica.

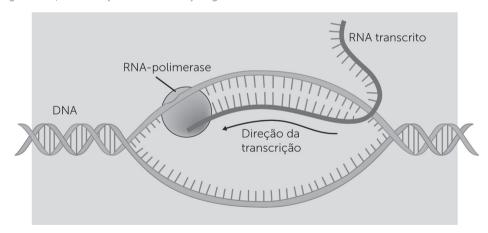
Ainda com relação à replicação do DNA, nem sempre a cópia desse material genético é fiel e segue as regras de replicação como deveria ser. O que pode acontecer caso ocorra algum erro na replicação desse material?

Desta forma, foi descoberto ao longo do tempo que erros no processo de replicação podem ocorrer, e se esses erros não forem corrigidos eles podem se transformar em mutações. As mutações são modificações que ocorrem no material genético, fazendo uma leitura errônea do pareamento de bases dos nucleotídeos; esse erro pode levar ao aparecimento de doenças, incluindo o câncer.

Diante desse cenário, quem estaria trabalhando para corrigir esses erros?

Como o DNA sofre continuamente danos causados por agentes físicos e químicos vindos do ambiente, as células possuem um mecanismo natural eficiente que trata da reparação desses danos moleculares, que trabalham no sentido de consertar ou corrigir pequenas modificações no pareamento dos nucleotídeos que são formados na duplicação do material genético. Sabendo, assim, que o DNA sofre continuamente danos causados por agentes externos e que as células tentam reparar esses danos, muitas vezes, alguns erros inatos ou adquiridos permanecem e se perpetuam na forma de mutação.





Fonte: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/AcNucleico5.php>. Acesso em: 30 out. 2015.

A transcrição do DNA é conceituada como sendo o mecanismo molecular baseado na formação de RNA a partir de uma molécula molde de DNA. Assim, o DNA de dupla fita original se separa, e uma das fitas serve de "molde" para o RNA, enquanto a outra fica inativa, ou se conserva como original. O RNA que transporta a informação genética contida no DNA nuclear para o citoplasma é chamado de RNA

m (mensageiro), pois este carrega as informações contidas em seu "computador central", levando então ao citoplasma essas informações contidas no núcleo. Os outros dois tipos de RNAs encontram-se no citoplasma: RNA r (ribossômico) e RNA t (transportador). O RNA r está envolvido na realização da síntese de proteínas e o RNA t está relacionado ao carregamento de aminoácidos do citoplasma que devem se juntar a uma cadeia de aminoácidos ou polipeptídica.

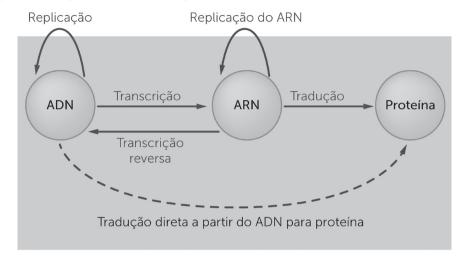
Na etapa de alongamento, a enzima RNA polimerase se desloca pela molécula de DNA, desenrolando sua hélice e produzindo uma molécula de RNA, cada vez mais alongada. O DNA por sua vez já transcrito volta a se enrolar novamente recompondo a sua dupla hélice, pela ação da enzima helicase. Esse processo é chamado de fase de elongação. O processo de união da nova molécula formada é iniciado quando a enzima DNA polimerase se liga a uma das extremidades do DNA que é excessivamente específica. Essa região tem uma sequência única de pares de bases, em que a transcrição se inicia, sendo conhecida como "promotor".

No final, quando acontece a síntese de proteínas, a enzima RNA polimerase segue pela extensão da cadeia, transcrevendo o DNA em RNA até uma determinada sequência de finalização que contenha pares de bases específicas, determinando o final da transcrição. Assim, quando a enzima RNA polimerase encontra a sequência de finalização, o RNA para de ser transcrito. A partir daí, libera-se a molécula de RNA e imediatamente a molécula de DNA se enrola completamente. A sequência de DNA que contém os genes sinalizadores do término é chamada de região terminalizadora.

Diante da importância da replicação e da transcrição estudada, o que seria então o DNA complementar (cDNA)?

Foi discutido por diferentes pensadores e proposto por Crick em 1957 que o conhecido "Dogma Central da Biologia Molecular" seria aquele em que o fluxo de informação genética na célula é **unidirecional**, sendo dessa forma determinado que o DNA é transcrito em RNA, traduzido em proteína. No entanto, existe uma exceção que aparece para modificar a sequência unidirecional do dogma central da Biologia Molecular, que é a ação da enzima transcriptase reversa. A enzima transcriptase reversa faz então com que em alguns vírus que possuem como material genético o RNA, em vez de DNA, sua molécula original de RNA seja copiada e revertida em DNA, modificando esse processo.

Figura 1.4 | Dogma Central da Biologia Molecular



Geral Especial - - Especial (tubo de ensaio)

Fonte: http://creationwiki.org/pt/Ficheiro:Dogma_central_automato.png. Acesso em: 30 out. 2015.



Assimile

É importante que você tenha entendido a replicação do material genético, tanto quando tratamos do DNA quanto do RNA, assim como também quando acontecem a transcrição e a regulação do gene. Antes de começar a abordar mais algum conteúdo, é importante que você pare para refletir em tudo o que foi discutido até agora. Vamos esclarecer então, o conceito da técnica de eletroforese que será estudada com detalhe um pouco mais adiante, mas que no momento favorece o entendimento do estudo de uma patologia relatada na situação-problema abordada nesta seção.

A técnica de eletroforese

A técnica de eletroforese é utilizada na investigação de enzimas, hemoglobinas, DNA e proteínas. Com os testes de eletroforese, você poderá identificar detalhes de determinada patologia, favorecendo seu diagnóstico e avançando na elucidação de mecanismos de ação em diferentes campos de estudo.

Assim, a explicação físico-química da eletroforese envolve a separação de componentes do sangue, urina, liquor, dentre outros, em que aplica-se uma

corrente elétrica nesses conteúdos orgânicos. Quanto maior for a corrente, maior será a velocidade com que se move determinada substância, com relação à outra que tiver, por exemplo, um maior número de cargas elétricas negativas ou positivas nos aminoácidos que formam suas moléculas de proteínas ou de enzimas. Isso significa que se os componentes com cargas elétricas estiverem equilibrados permanecerão estáticos, parados no local. No entanto, aqueles componentes que estiverem carregados eletricamente irão se mover em direção ao eletrodo com a carga elétrica oposta. A técnica trabalha com conhecimentos da química de proteínas e de fatores físicos que estão envolvidos na movimentação dessas moléculas do campo elétrico.

Separando fragmentos de DNA: eletroforese em gel

Os fragmentos de DNA apresentam tamanhos diferentes. A técnica de separação dos fragmentos de DNA comumente utilizada é a eletroforese através de géis de agarose. A agarose é formada por um polissacarídeo como o ágar e a pectina, que se dissolve facilmente em água fervente, e quando esfria se solidifica em composição semelhante à de uma gelatina. Para realizar um teste de eletroforese, prepara-se um gel de agarose, em que o material genético (DNA) é colocado em pequenos poços de gel com o auxílio de uma pipeta volumétrica e, em seguida, uma corrente elétrica é aplicada através do gel. Como o DNA é carregado negativamente, ele é atraído pelo eletrodo positivo. No entanto, para chegar ao eletrodo positivo, o DNA deve migrar através do gel de agarose. Por sua vez, os fragmentos de DNA menores irão migrar mais rapidamente através de um gel de agarose do que os fragmentos maiores de DNA. A migração desses fragmentos de DNA estão relacionados ao tamanho ou ao peso molecular do fragmento.



Reflita

E agora? O que se faz com esses fragmentos de DNA obtidos com testes de eletroforese? Como interpretar esse resultado? Sabe-se que cada fragmento de DNA que foi separado do material genético como um todo possui um ou mais genes. Assim, o que você consegue interpretar com a análise desse material? É possível pensar nas patologias que podem ser diagnosticadas diariamente. Muitas questões podem ser diagnosticadas com essa técnica, fazendo uso desse conhecimento molecular. Continuamos afirmando que a maioria das respostas para nossas dúvidas está no gene, sendo de grande valia o estudo da Biologia Molecular. Leia o artigo abaixo que ilustra o diagnóstico de uma doença que está relacionada à deficiência no transporte de oxigênio nas células. BONINI-DOMINGOS, C.R. et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**,

v. 22, n. 3, p. 388-94, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v22n3/13413.pdf>. Acesso em: 30 nov. 15.



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto da importância dos ácidos nucleicos, leia o artigo que aborda uma interessante colocação sobre a função do RNA para o organismo. Hoje sabe-se que o RNA apresenta diferentes funções incluindo a de ser uma grande promessa da inovação em fármacos: em que o RNA interferência sai do laboratório para a clínica.

MENCK, C.F.M. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 99-108, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/a07v2470.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2015.



Exemplificando

Como falamos sobre a replicação do DNA para estudo de diversas patologias, imagine a replicação do material genético vista na metodologia do PCR (reação de cadeia da enzima polimerase), em que acontece a amplificação de milhões de vezes deste DNA que foi extraído de um determinado tecido. Leia o texto de VIEIRA, D.P. **Técnicas de PCR**: aplicações e padronização de reações. Disponível em: http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20">http://w



Faça você mesmo

Antes de prosseguir o seu estudo, pense na diferença entre a técnica da eletroforese e a técnica de reação da cadeia da enzima polimerase. Relate os objetivos de cada técnica e a importância de seu uso no diagnóstico e tratamento de diferentes patologias.

Sem medo de errar



Atenção!

Para visualizar o contexto da importância da Biologia Molecular, em especial o estudo da talassemia por eletroforese, leia o artigo que trata de um tipo de diagnóstico laboratorial de hemoglobinas fetais (HbF). ZAMARO, P.J.A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 261-6, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v38n4/a03v38n4.pdf>. Acesso em: 30 out. 2015.



Lembre-se

A hemoglobina é uma proteína associada a grupos heme, complexo formado por um átomo de ferro. É necessário um programa para identificar hemoglobinas anormais fazendo uso de metodologia adequada para se obter o correto diagnóstico.

A realização de testes de Biologia Molecular ajuda no diagnóstico de patologias, favorecendo o diagnóstico de um tipo de anemia que é a talassemia. Após realizar o teste pelo método da eletroforese, Clara tomará diversos cuidados para que esse problema não interfira na gestação de sua filha. A talassemia também compromete a oxigenação de células e tecidos, preocupando a mãe que transporta pela placenta toda a alimentação necessária à filha, incluindo o oxigênio, essencial à vida.

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha em mente como deve ser a relação dos testes e métodos da Biologia Molecular que estão envolvidos no diagnóstico da talassemia materna e, ainda, aproveitar o conteúdo das leituras que você realizou.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com as de seus colegas.

A talassemia detectada por eletroforese		
1. Competência geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Compreender os conceitos dos mecanismos de replicação do DNA, a transcrição e o processamento do RNA e, ainda, como acontece a transformação de RNA mensageiro (mRNA) em DNA complementar (cDNA). Além de introduzir os conceitos da técnica da eletroforese.	
3. Conteúdos relacionados	Conceitos dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de replicação do DNA, transcrição e processamento do RNA e transformação do RNA mensageiro em cDNA.	
4. Descrição da SP	Clara será mãe de uma menina e durante todo o período de sua gestação realizou exames de sangue para verificação da quantidade de sua hemoglobina em seu organismo. Após detectar que também possui genes para talassemia, Clara desconfia que sua filha possa ter o mesmo problema genético. Além do controle durante todo o período gestacional, Clara deverá posteriormente realizar exames em sua filha, pois sabese que a proteína hemoglobina Fetal (Hb Fetal), que carrega o oxigênio no organismo do feto, é identificada no período entre o nascimento até o bebê atingir o sexto mês de idade, quando a concentração de Hb Fetal normalmente diminui, exceto quando a criança apresenta alguma patologia. Assim, aguarda-se o nascimento da filha de Clara para verificação deste controle, continuando com o acompanhamento nutricional da mãe e com a realização de exames de sangue pela técnica de eletroforese.	
5. Resolução da SP:	A realização do teste de Biologia Molecular para detectar e tratar doenças de origem genética é uma prática comum. Detectouse a talassemia em Clara e segue-se o acompanhamento de novos exames no bebê após o nascimento e até chegar aos 6 meses de idade. A partir daí, será determinado se a menina também é portadora de talassemia.	



Faça você mesmo

Faça um estudo a respeito da possibilidade da filha de Clara ter o mesmo problema genético de sua mãe e de sua avó. Verifique se existe outro tipo de origem da talassemia, e se sim, qual a diferença entre aquela transmitida por fatores genéticos e a adquirida durante a vida?

Faça valer a pena!

- **1.** Nesta unidade você aprendeu sobre a replicação do DNA, a transcrição e o processamento do RNA. Assim podemos afirmar que:
- I- Como o DNA é capaz de se duplicar, originam-se novas moléculas de DNA.
- II- Quando há a transcrição do RNA, acontece o processo de formação de uma molécula de RNA a partir de uma molécula molde de DNA.
- III- Quando há a transcrição do material genético, pequenas porções do DNA são preservadas, garantindo um primeiro passo para a regulação de um gene.
- IV- A transformação de uma molécula de RNA mensageiro em DNA complementar acontece com o processo de obtenção de RNA durante a tradução com a obtenção de determinada proteína.

Assim pode-se afirmar que:

- a) As alternativas I, II, IV estão corretas.
- b) As alternativas I, III, IV estão corretas.
- c) As alternativas I, II, III estão corretas.
- d) As alternativas III, IV estão corretas.
- e) As alternativas I, II, III, IV estão corretas.

Na técnica de eletr	roforese há a separação :	dos fragmentos de
de acordo com s	sua	e,
possibilitando o estu	ido de diversas patologia	as. Segundo os conceitos de
Biologia Molecular a	respeito da técnica de	eletroforese, é certo afirmar
que a alternativa que	e completa a frase corre	tamente seria:

- a) DNA, carga elétrica, peso molecular.
- b) RNA, carga molecular, peso molecular.
- c) RNA, carga molecular, peso atômico.
- d) DNA, carga elétrica, peso iônico.
- e) RNA, carga molecular, peso iônico.
- **3.** Clara sabe que será mãe de uma menina e durante todo o período de sua gestação faz acompanhamento e a realização de exames de sangue para verificação das condições da quantidade de sua hemoglobina circulante em seu organismo. Isso acontece porque:
- I- Clara é gestante e é comum realizar dosagens de hemoglobina circulante, assim como também hemograma completo.
- II- Clara é filha de mãe portadora de talassemia e esse acompanhamento é necessário.
- III- A talassemia é uma doença hereditária que pode causar anemia e, por haver indícios genéticos em família, realizam-se testes sanguíneos.
- IV- Como Clara está grávida, sua alimentação deve ser elaborada e acompanhada para que o problema com a anemia não venha afetar o transporte de oxigênio de suas células e consequentemente da nutrição fetal.

Diante dos diferentes fatores apresentados, pode-se afirmar que:

- a) As alternativas I, II estão corretas.
- b) As alternativas III, IV estão corretas.
- c) As alternativas I, III estão corretas.
- d) As alternativas II, IV estão corretas.
- e) As alternativas I, II, III, IV estão corretas.

Seção 1.3

Técnicas utilizadas para extração de DNA

Diálogo aberto

Clara será mãe de uma menina e durante toda a gestação realizou exames de sangue, descobrindo ser portadora de talassemia. A talassemia pode causar anemia e como Clara está grávida, não sabe se este fato estaria afetando o suporte nutricional de seu bebê, já que o período final da gravidez é justamente quando a criança ganha peso. Assim, Clara fez o acompanhamento do pré-natal juntamente com o acompanhamento nutricional, realizando exames de sangue e verificando sempre a quantidade de hemoglobinas (Hb) que está disponível em sua circulação. Para determinação desses dados laboratoriais, o médico solicitou que o teste fosse feito por eletroforese, determinando a veracidade da presença da talassemia. Porém, sabe-se que várias outras técnicas de Biologia Molecular podem ser usadas para determinar o diagnóstico desta e de outras patologias ou para determinar características genéticas específicas. Você sabia que as mais variadas técnicas de Biologia Molecular comumente usadas têm como matéria-prima o DNA? No entanto, como acontece a extração do material genético essencial para a reprodução celular?

A filha de Clara nasceu e chama-se Luana. A criança é forte, sadia e logo em seguida irá realizar os testes necessários para verificação se é portadora da talassemia como sua mãe. Para isso, já no hospital, amostras de sangue da criança foram coletadas para que se realizassem os testes de recém-nascido (conhecido como teste do pezinho) para determinação da talassemia. Além do teste realizado por eletroforese, Clara solicitou que fosse realizado também por outro método, para que se confirmasse o diagnóstico. O exame de Luana será por PCR em tempo real, ou *real time*. Qual seria a diferença de um PCR tradicional e aquele do PCR em tempo real?

As diferentes técnicas que estamos aprendendo e sua importância são essenciais para o diagnóstico de patologias, determinação genética e avanço na pesquisa científica.

Vamos lá! Tornaremos esse conteúdo mais prático para que se esclareçam as técnicas que vêm sendo utilizadas ultimamente em diferentes modalidades médicas e científicas

Não pode faltar

Hoje em dia, existem muitas técnicas de análise do DNA, tornando os processos de diagnóstico e análise do material genético cada vez mais simples e eficientes. Para que apliquemos as técnicas que estamos estudando, o DNA deve sempre ser isolado de vírus, bactérias, células animais e vegetais. A etapa de extração e purificação de ácidos nucleicos a partir das variadas amostras experimentais é de fundamental importância para se obter resultados eficientes de amplificação nos protocolos práticos que trabalham os dados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), por exemplo. Essa técnica é muito usada em estudos moleculares, devido à facilidade com que se é possível amplificar em laboratório as regiões específicas do genoma de diferentes organismos.

Sabe-se que a conformação estrutural do DNA tem forma original de dupla fita, apresentando resistência e estabilidade em sua molécula, mantendo o material inalterado em diferentes condições orgânicas. No entanto, alguns cuidados são aconselháveis, para que seja evitada a degradação das amostras obtidas em laboratório. A extração de DNA inclui dois procedimentos principais que são: a quebra ou lise das células presentes na amostra a ser estudada e a própria purificação do DNA.

Após a lise das células, o DNA é separado das diferentes estruturas celulares e proteínas, sendo precipitado e suspenso em soluções-tampão adequadas para tal técnica. As amostras de DNA são concentradas e purificadas com a finalidade de se obter melhores resultados nas amplificações. Quanto mais puro o material genético obtido, mais precisas serão a avaliação e a quantificação desse material.

Obtenção de amostras para extração de DNA

As amostras obtidas para serem testadas em laboratório são muito sensíveis e podem degradar com relativa facilidade. Assim, esse material deve ser guardado de forma adequada até o momento de ser submetido à extração do DNA. Amostras de sangue e de outros tecidos animais devem ser refrigeradas até chegarem ao laboratório para realização dos testes.

Para que se realizem os testes de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras devem ser mantidas sob baixas temperaturas, variando de -20°C a -80°C, dependendo do tempo de armazenamento. Para utilização de amostras conservadas em estoque (amostra em grande volume), é interessante que se realize o fracionamento em pequenas alíquotas, ou seja, separar uma "amostra maior" em pequenas amostras, para que o material não sofra descongelamentos sucessivos. O fato de congelar e descongelar diversas vezes sua amostra contribui para a oxidação do tecido e para a degradação do DNA, perdendo o material. O manuseio dessas amostras deve

ser feito com o uso de luvas, para que os ácidos nucleicos não sejam degradados por enzimas denominadas "nucleases", que estão presentes no corpo humano, principalmente nas mãos das pessoas.

Alguns cuidados devem ser tomados durante e após a extração do material genético como o DNA, separando um espaço isolado somente para essa finalidade. Salas e ambientes separados e climatizados para a extração do DNA são essenciais, sendo que as extrações devem ser trabalhadas em Eppendorfs, pequenos tubos de material plástico (polipropileno) esterilizados ou preferencialmente novos (não deve ser usado material reciclado), para que as amostras não apresentem contaminações durante suas análises. Ultimamente, os laboratórios procuram comprar Eppendorfs RNASE e DNASE free, para não correrem o risco de degradação do material genético.

Digestão da amostra

As amostras de tecidos que são submetidas à extração de DNA passam pelo processo de fragmentação e digestão enzimática das proteínas. Para isso, as amostras são homogeneizadas ou quebradas e submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido e rapidamente devem ser "amassadas ou trituradas" manualmente (utilizando-se um bastão). Essa fase é importante para que ocorra o rompimento das paredes celulares e membranas plasmáticas, cujo material obtido seria uma mistura de componentes celulares como: DNA, RNA, proteínas, carboidratos e lipídios. Pequenas quantidades da amostra (200 mg até 1 g) são adicionadas a uma solução-tampão de digestão (na quantidade proporcional de 1,2 mL de solução-tampão para cada 100 mg de tecido) e colocadas em condições de banhomaria, em temperatura próxima a 50°C, para que aconteça a digestão. O tempo de incubação pode variar entre 8 e 12 horas, ou até que a amostra encontre-se totalmente digerida. Esse fato acontece quando a amostra apresenta um aspecto viscoso. Assim, essa parte experimental dura mais do que um dia, devendo o profissional se preparar para gastar esse tempo nos referidos testes.

O passo seguinte está relacionado à purificação dos ácidos nucleicos, dos quais pode-se extrair tanto DNA quanto RNA, conforme necessidade.

Extração do DNA com fenol – purificação do DNA por meio de precipitação com etanol

O método mais utilizado para que ocorra a purificação do DNA é a extração com fenol provocando a desnaturação de proteínas de modo eficiente. O fenol não é solúvel em água, fazendo com que, quando agitado com o devido extrato a ser testado, origine duas camadas, sendo que as proteínas desnaturadas se precipitam na interface do tubo. Após a extração de proteínas, os ácidos nucleicos são precipitados, concentrando a amostra e eliminando todo o fenol que posteriormente poderia desnaturar as proteínas nos próximos passos.

Dessa forma, para extrair o DNA de plantas e animais, usa-se primeiramente o fenol, no qual há a separação da camada aquosa (que contém DNA e RNA), uma interface (que é a proteína) e a camada de fenol bem abaixo da proteica. Em seguida, após obter-se as três camadas, adiciona-se etanol + solução salina obtendo uma configuração homogênea, seguida por centrifugação. Após a centrifugação consegue-se o DNA precipitado, que é então quantificado.

Leitura da concentração de DNA das amostras

As variadas amostras de DNA obtidas e analisadas em laboratório podem ser avaliadas com relação à sua concentração e pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) com a leitura em espectrofotômetro. O DNA consegue absorver luz em comprimento de onda de 260 nm, no entanto, a leitura das proteínas ocorre em 280 nm. As amostras de DNA são preparadas em diluições diversas, também lidas em espectrofotômetro.

A relação entre a quantidade de DNA e de proteína é usada como parâmetro para avaliar a qualidade do DNA extraído. Assim, quando valores dessa relação são inferiores a 1,8 apresentam contaminação com proteínas. O DNA é facilmente quantificado e analisado quanto à sua qualidade, pela análise de gel de agarose 1%.

A técnica de PCR tradicional e PCR em tempo real ou real time

A PCR faz com que determinada região de um determinado gene seja multiplicada por milhões de vezes, facilitando a análise genética e o diagnóstico de diferentes patologias. A alta sensibilidade, a especificidade e a facilidade de execução dessa técnica, analisando um grande número de amostras ao mesmo tempo, faz uma grande diferença no estudo e diagnóstico de patologias diversas.

Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase

Para que se possa amplificar um segmento de DNA, temos que entender os componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas, como vimos em aulas anteriores. Desta forma, é montada uma solução *master mix* em gelo durante todo o procedimento. Faz parte da reação da cadeia da polimerase (PCR) o material genético DNA extraído, que possui a porção que será amplificada. Além disso, os nucleotídeos, conhecidos como dNTPS de acordo com as bases: A, T, C, G (dATPs, dTTPs, dCTPs e dGTPs), são necessários para que ocorra a síntese de novas moléculas de DNA. A enzima DNA-polimerase DNA-polimerase, que é responsável pelo início e abertura da dupla fita de DNA, favorece a síntese das novas moléculas do material genético (também conhecida como Taq DNA polimerase). O sal cloreto de magnésio, que faz com que a reação aconteça, é um cofator da reação e essencial para a ação da enzima Taq polimerase. Além disso, dois iniciadores ou *primers*, que são pequenas sequências já conhecidas de DNA

(oligonucleotídeos), são complementares à região-alvo de amplificação. Os *primers* são produzidos ou sintetizados em laboratórios especializados, sob encomenda, sendo essenciais para que se inicie a reação. A água a ser empregada no *master mix* da amostra deve ser a ultrapura, que é aquela com baixa condutividade elétrica.

Para que ocorra a amplificação do material genético, com a síntese de novas moléculas de DNA, deve-se adequar a temperatura e o tempo em que as amostras devem apresentar nessa reação. Cada ciclo da PCR mostra três fases: desnaturação, anelamento e extensão. Essas fases ocorrem em diferentes temperaturas e são programadas de maneira adequada no termociclador (aparelho no qual a reação acontece), em que as amostras são incubadas. No momento de preparar o programa para a amplificação, deve-se determinar a temperatura e o tempo de cada uma das referidas fases e, ainda, o número de repetições dos ciclos. Na etapa de desnaturação, o DNA perde a estrutura de dupla hélice devido à elevação da temperatura para 94°C ou 95°C. A desnaturação faz com que os primers, que são as sequências de bases nitrogenadas, se liquem à região complementar do DNA. Dessa forma, o DNA genômico permanece desnaturado por todos os ciclos subsequentes, pois as fitas complementares estão em baixas concentrações. impedindo a sua união. Já os oligonucleotídeos ou primers, ao contrário, estão em altas concentrações no mix, favorecendo o anelamento ou o encontro das regiões complementares.

Outra fase que ocorre após a desnaturação é o anelamento dos *primers*. Uma vez que o DNA é desnaturado, a temperatura da reação é reduzida, assim cada *primer* se encaixa em sua sequência específica, sempre complementar à região-alvo da amplificação. A temperatura de anelamento vai depender, dentre outros fatores, do tamanho do *primer* e da determinada sequência de nucleotídeos.

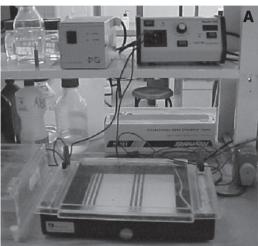
Na fase de extensão, a temperatura se eleva próximo de 72°C, para que a enzima DNA polimerase (Taq DNA polimerase) se alinhe e juntamente com os *primers*, que se anelaram na presença do íon magnésio, seja iniciada a síntese da nova fita a partir dos *primers* ou iniciadores. Após o término de um ciclo (desnaturação, anelamento e extensão), o processo da reação da cadeia da enzima polimerase se repete muitas vezes (40 vezes, em média), até que se obtenha a quantidade do DNA desejado.

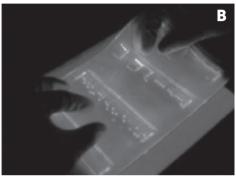
A eletroforese em gel de agarose para os resultados da PCR

Para a eletroforese evidenciar os resultados da PCR, prepara-se um gel de agarose em que o DNA é colocado em pequenos poços do referido gel e, então, uma corrente elétrica é aplicada. Como o DNA é carregado negativamente, ele é atraído pelo lado positivo, no entanto, para chegar ao lado positivo do gel, o DNA deve migrar através do gel de agarose. Os fragmentos menores de DNA migram mais rapidamente quando comparados aos fragmentos de DNA maiores. Após a

corrida do gel de eletroforese, os fragmentos de DNA são corados com o brometo de etídeo que, por sua vez, têm afinidade pelo DNA e torna-se visível em contato com a luz ultravioleta. Dessa forma, localizam-se as bandas que correspondem ao DNA. Os fragmentos de DNA podem ser isolados e purificados a partir dos géis de agarose (A) e revelados em brometo de etídeo (B).

Figura 1.5 | Eletroforese em gel de agarose





O método de eletroforese e o gel de agarose (A) e a revelação do gel com brometo de etídeo (B) usado para detecção de ácidos nucleicos como DNA e RNA.

Fonte: http://pt.slideshare.net/AdrianaDantas2/eletroforese?related=2. Acesso em: 6 nov. 2015.

Sabemos que a reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) é uma técnica fundamental em todos os laboratórios de Biologia Molecular que trabalha com a detecção dos ácidos nucleicos RNA e DNA. Além disso, a técnica chamada PCR em tempo real (real time) evoluiu a partir da técnica de PCR convencional, tendo a função de aperfeiçoar as limitações da técnica anterior. O aparelho de PCR quantitativo em tempo real é uma técnica que se baseia mais uma vez no princípio da reação em cadeia da enzima polimerase (PCR), com a função de multiplicar o material genético quantificando o referido DNA obtido. A PCR em tempo real combina com a metodologia de PCR convencional usando um mecanismo de detecção e quantificação por parte de fluorescência. A metodologia vai nos permitir que tanto os processos de amplificação, detecção e os de quantificação do DNA sejam realizados em uma só etapa, favorecendo certa agilidade na obtenção de resultados, levando a uma diminuição do risco de contaminação da amostra, sem esquecer que esses fatores nos dão maior precisão nos resultados. A possibilidade do uso deste aparelho é muito ampla, envolvendo, por exemplo: a quantificação da expressão gênica, a quantificação de vírus, o diagnóstico de agentes patogênicos, toxicologia forense, a quantificação de danos que ocorrem

no DNA, os estudos relacionados à genotipagem, a determinação durante o prénatal do sexo, dosagem gênica, oncologia clínica, quantificação de proteínas, microbiologia, análise e quantificação de DNA mitocondrial e de DNA nuclear, qualidade do material genético, entre muitas outras aplicações possíveis. Assim, os equipamentos de PCR em tempo real detectam e analisam simultaneamente mais do que um único sinal de fluorescência, permitindo a identificação de sequências diferenciadas de um gene-alvo numa única reação.



Assimile

É importante que você tenha entendido as principais diferenças e vantagens do PCR tradicional e do *real time* ou PCR em tempo real na detecção de patologias e diferentes exames genéticos.

Como a situação de Clara é delicada, pois envolve a gravidez, os exames de paternidade, que já lhe causaram constrangimentos, e agora a patologia da talassemia, que em sua família é de origem genética, Clara pede que os exames de sua filha sejam confirmados por um exame mais específico, garantindo-lhe mais confiança caso se comprove a doença nela.



Reflita

Quais as diferenças entre as técnicas de Biologia Molecular? Quais são elas e como realizá-las? Tenha em mãos o Manual de Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações na extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase da USP. É interessante como as técnicas são explicadas com simplicidade, trazendo a você, leitor, um maior contato com a tecnologia laboratorial indispensável no diagnóstico genético e patológico. Disponível em: http://www.imt.usp.br/images/pdf/proto/aula1.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2015.



Pesquise mais

Com a investigação e realizações de diversos exames, os pais podem saber do diagnóstico de talassemia em seu filho com menos de 1 ano de idade. Clara encontra-se nesta situação e precisa saber quais exames devem ser realizados no caso de sua filha Luana apresentar a doença. Pesquise outros tipos de testes que podem ser realizados para determinar o diagnóstico de doenças usando a Imuno-hematologia Molecular. Para

aprofundar o assunto dos exames que levam à detecção de doenças hematológicas e técnicas laboratoriais de Biologia Molecular usadas em hematologia, leia o seguinte artigo: CASTILHO, L. Imuno-hematologia molecular: onde estamos e para onde vamos? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 4, p. 216-17, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n4/a04v31n4/a.Acesso em: 8 nov. 2015.



Exemplificando

Como falamos neste conteúdo do livro didático sobre a extração do material genético e a técnica do PCR em tempo real e doença hematológica, veja esta pequena revisão que trata de outra patologia sanguínea, usando a técnica do PCR *real time*, suas características e eficácia em doenças sanguíneas. ALMEIDA, P.S.R. et al. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mieloide crônica por PCR em tempo real. **Rev** . **Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 382-6, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v29n4/a12v29n4.pdf>. Acesso em: 8 nov. 2015.



Faça você mesmo

Antes de prosseguir o seu estudo, pense como seria a vida de Luana caso ela descobrisse ser portadora de talassemia. Qual a gravidade da anemia e de situações que envolvam problemas de ordem hematológica em seu organismo, já no início de sua vida? É uma situação diferente da de um adulto que descobre ser portador da talassemia em uma idade mais avançada? Pesquise e coloque suas ideias sobre esse assunto.

Sem medo de errar



Atenção!

Com base em seu estudo deve ficar claro para você que a talassemia existe em diferentes graus, mais leve e mais grave. O tratamento depende da gravidade da talassemia. Para as talassemias do tipo minor, que é mais comum, não é necessário tratamento.



Lembre-se

Para o tratamento da talassemia intermediária, muitas vezes, é necessário realizar transfusões de sangue aliadas à suplementação de ácido fólico. O ácido fólico é uma vitamina que seu corpo usa e necessita para produzir as hemácias sanguíneas. Já no caso da talassemia grave, além de transfusões de sangue e ácido fólico, muitas vezes é necessária a quimioterapia.

Com a realização de PCR em tempo real ou *real time*, foi fechado que o diagnóstico de Luana para a talassemia é positivo. Assim como a mãe, Luana é portadora dessa patologia, no entanto, não se sabe a gravidade da doença dela. Esperam-se os resultados para saber se a criança necessita de um tratamento mais minucioso e específico envolvendo transfusão de sangue, entre outros tratamentos, ou não.

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha entendido as diferenças ou a gravidade dos tipos de talassemia para compreender o prognóstico da doença de Luana.

Pratique mais!
Instrução
Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações
que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com as de
seus colegas.

Tipos de talassemia e suas características	
1. Competência geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia.
2. Objetivos de aprendizagem	Compreender como ocorre a extração do DNA e análise laboratorial desse material genético, dentro de técnicas de Biologia Molecular.
3. Conteúdos relacionados	Metódos de extração de DNA e análise laboratorial do DNA.

(continua)

4. Descrição da SP	A filha de Clara nasceu e chama-se Luana. A criança é forte, sadia, porém irá realizar os testes necessários para verificação se é portadora da talassemia como a mãe. Para isso, amostras de sangue da criança foram coletadas para que se realizassem os testes de recém-nascido e aquele relacionado à determinação da talassemia. Além do teste feito por eletroforese, Clara solicitou que fosse realizado também por outro método, para que se confirmasse o diagnóstico. O exame de Luana será, então, por PCR em tempo real ou <i>real time</i> . No entanto, há a suspeita de Luana apresentar um tipo mais grave de talassemia do que a de sua mãe Clara, pois a quantidade de Ferro da criança detectou uma anemia mais grave.
5. Resolução da SP:	A realização de testes com o uso de técnicas de Biologia Molecular como <i>real time</i> confirmou os resultados positivos para a talassemia em Luana como sua mãe havia suspeitado. No momento dos exames de recém-nascido verificou-se uma anemia severa em Luana e, assim, o resultado do exame de talassemia mostra que ela deve fazer rapidamente transfusões de sangue para conter a anemia.



Faça você mesmo

Qual a chance de a filha de Clara passar por tratamentos médicos e não sofrer nenhum tipo de intercorrência em seu tratamento? Há risco de vida para a criança? Busque essas informações, elencando quais possíveis problemas podem aparecer no decorrer do tratamento de Luana.

Faça valer a pena!

1. A talassemia é uma doença de origem
que resulta em Os tipos da doença podem variar de
mais leve, intermediária e mais grave. Este diagnóstico determinará o
tipo de tratamento que vai desde a ingestão de
até a necessidade de

Com base na afirmação acima, qual sentença justifica a frase citada:

- a) Adquirida, anemia, vitamina C, transfusão de sangue e antibióticos.
- b) Genética ou adquirida, anemia, ácido fólico, transfusão de sangue, quimioterapia.
- c) Inata, deficiência de zinco, vitamina D, transfusão de sangue, cirurgia.
- d) Inata, deficiência de ferro, vitamina D, quimioterapia, cirurgia.
- e) Adquirida ou genética, anemia, vitamina D, cirurgia, quimioterapia.

2.	Sabe-se que a conformação estrutural do DNA tem forma original
de	e, apresentando resistência e estabilidade em sua
m	olécula. A extração de DNA inclui dois procedimentos principais que
sã	o: presente na amostra a ser estudada
е	a própria A alternativa que completa a frase
СО	rretamente é:

- a) Eucariontes, quebra ou lise, determinação do DNA.
- b) Procariontes, o estudo da membrana, purificação do DNA.
- c) Dupla fita, quebra ou lise, purificação do DNA.
- d) Dupla fita, estudo da membrana, identificação nuclear.
- e) Eucariontes, quebra ou lise, síntese de proteínas.
- **3.** Quanto mais puro o material genético obtido, mais precisas serão a avaliação e a quantificação desse material. No entanto, para preservar a integridade do material durante toda a técnica de extração, são necessários alguns cuidados iniciais:
- I. Assim, o material deve ser guardado de forma adequada em baixas temperaturas até o momento de ser submetido à extração do DNA.
- II. Pode-se estocar o material genético em grandes quantidades (volume), pois guanto mais amostras melhor o resultado.
- III. O congelamento e descongelamento sucessivo das amostras acaba oxidando o material, perdendo as amostras.
- IV. Você não precisa se preocupar em usar luvas no manuseio do DNA, é só tomar cuidado no momento da revelação do material genético com o Brometo de Etídeo.
- V. Salas e ambientes separados e climatizados são importantes para a extração do DNA, sendo que a extração deve ser trabalhada em Eppendorfs DNASE e RNASE *free* para que as amostras não apresentem contaminações durante suas análises.

Diante das afirmativas, pode-se concluir que:

- a) As alternativas I, II, III estão corretas.
- b) As alternativas III, IV, V estão corretas.
- c) As alternativas I, III, IV estão corretas.

U1

- d) As alternativas I, II, IV estão corretas.
- e) As alternativas I, III, V estão corretas.

Seção 1.4

Evolução da biologia molecular

Diálogo aberto

Clara descobriu que Luana é portadora de talassemia. A talassemia é uma doenca genética que pode apresentar-se de uma forma mais branda sem precisar de tratamento mais rigoroso, ou ainda apresentar-se de forma mais grave necessitando de uma alimentação saudável, ácido fólico e até transfusões de sangue. Em casos extremos faz-se necessário a quimioterapia. Exames detectaram que o bebê de Clara apresenta a forma mais grave de talassemia, necessitando de transfusão de sangue. Clara fica desesperada, porque, além de ser muito pequena, a criança precisa receber a transfusão de um doador compatível sem, no entanto, apresentar traços de qualquer doença, pois, como Luana ainda tem um sistema imunológico incompleto, poderia não aquentar (ou não conseguir reagir) determinada patologia e agravar seu quadro clínico. Assim, o hospital que está cuidando de Luana se interessou em fazer um estudo mais detalhado sobre esse tipo de patologia em crianças. Clara ficou preocupada em deixar que os dados clínicos da doença de sua filha fossem arquivados para pesquisa, mas concordou que a pesquisa fosse realizada porque, caso se tratasse de um caso raro, seria necessária a intervenção desses estudos nessa área. Para isso, um conjunto de técnicas da genética molecular deve ser aplicado ao estudo do genoma e das doenças genéticas de Luana. Esse assunto é muito importante na área de genética médica, que tem como objetivo principal compreender a importância do sequenciamento genético e a base molecular das doenças genéticas como a talassemia.

Desta forma, uma vez que se compreenda o mecanismo molecular da doença de Luana, deve ser possível chegar a um diagnóstico mais aperfeiçoado, relacionando o DNA ou RNA e, ainda, tentar uma intervenção para a cura da doença. Assim, é sugerido o sequenciamento genético da talassemia apresentada por Luana, sabendo exatamente qual é a especificidade dessa doença em bebês, a susceptibilidade e a resistência a esse tipo de doença, a tolerância aos medicamentos necessários e outros parâmetros ligados à doença, que estão relacionados à diversidade e sobrevivência da espécie humana.

Vamos aprender um pouco mais sobre as técnicas de Biologia Molecular envolvendo o sequenciamento e as bibliotecas de DNA e o Projeto Genoma, assuntos essenciais que garantem a evolução da Biologia Molecular.

Não pode faltar

Com o aparecimento de numerosas doenças já diagnosticadas e outras ainda sem cura, o estudo das técnicas de Biologia Molecular e o aprofundamento do estudo das variadas doenças genéticas e adquiridas, justificam o aprendizado do sequenciamento de genes.

O sequenciamento de genes seria então uma série de reações e métodos bioquímicos que têm o objetivo de determinar a ordem das bases nitrogenadas da molécula de DNA: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). O que sabemos e esperamos é que a montagem do genoma feito através da união de sequências de DNA seja agrupada para então criar uma representação do cromossomo original ao DNA que estamos estudando. Sendo assim, em que ponto do DNA exatamente estaria a alteração genética para a talassemia no conjunto de genes de Luana?

No processo de um sequenciamento genético, todo o DNA é analisado, fragmentando o material genético em milhões de pequenos pedaços. Essas pequenas porções diminutas do gene são lidas por equipamentos de sequenciamento automático, que são capazes de ler até 1.000 nucleotídeos ou pares de bases de uma só vez, reunindo as partes dos genes e colocando-as na ordem original, detectando alterações e coincidências entre diferentes pedaços de DNA. As partes que coincidem podem ser fundidas, unindo dois pedaços de DNA. O processo é repetido até montar a sequência completa.

Métodos de sequenciamento

O sequenciamento de DNA é um método de Biologia Molecular que tem por finalidade determinar a sequência de nucleotídeos em uma determinada molécula de DNA.

Por que sequenciar um gene?

As técnicas de sequenciamento surgiram em 1977 com o método de degradação química e enzimática, em que o tratamento do material genético com determinadas substâncias químicas corta a molécula de DNA em nucleotídeos específicos. Assim, marcavam-se radioativamente as extremidades do DNA e purificava-se o fragmento a ser sequenciado. No entanto, a técnica limitava o tamanho a 100 bases devido à resolução oferecida pelo gel de poliacrilamida. Em seguida, criou-se o método de Sanger, que seria mais rápido e acurado e baseava-se em uma extensão radioativa feita em nucleotídeos (normalmente citosina) no primer ou nas sequências terminadoras da molécula.

Com os avanços na área, essa marcação foi substituída por compostos fluorescentes (fluorocromos). Dessa forma, a região passava a ter uma cor

específica através da adição do composto fluorescente. Assim, sequenciadores automáticos que se associam a softwares específicos facilitam a distinção de cada fluorocromo, armazenando o nucleotídeo correspondente em bancos de dados e deixando o resultado já pronto para ser usado.

Com a evolução nos equipamentos, desenvolveu-se a técnica da eletroforese capilar que é a migração de amostras carregadas eletricamente em um ambiente que contém solução-tampão (eletrólito carreador), através da qual uma corrente elétrica é aplicada. Assim, capilares e eletrodos contendo solução-tampão conduzem corrente elétrica, fornecendo função tamponante ao ambiente. A amostra que contém substância iônica e que conduz corrente elétrica é introduzida no capilar que, sob a influência do campo elétrico, faz com que as amostras migrem para o eletrodo correspondente: cátions para catodos e ânions para ânodos. Dessa forma, os sequenciamentos de genes que analisavam no máximo 100 bases, hoje passaram a analisar 700 bases com uma qualidade muito alta. Veja que interessante, atualmente, com toda essa tecnologia, os equipamentos fazem aproximadamente 96 sequenciamentos a cada duas horas.



Assimile

Para que se possa realizar um sequenciamento de DNA, necessita-se de um número abundante de cópias do fragmento que será sequenciado. Esse fragmento pode ser obtido pela reação de PCR que é seguida de purificação, sendo retirados os excessos de reagentes não consumidos na técnica.

Aplicação do sequenciamento

A aplicação do sequenciamento acontece na análise genômica, em que se conhece o conjunto de genes de determinada espécie animal e vegetal na ciência forense, na análise filogenética, conservação das espécies, epidemias virais, descoberta de drogas, *screening* genético, dentre outras aplicações.

Com o grande número de dados obtidos no sequenciamento, pode aparecer uma certa dificuldade em analisar o entendimento das informações contidas nesses genomas. Uma das técnicas usadas hoje é o *microarray* (microarranjos de DNA), determinando a expressão de milhares de genes e identificando aqueles envolvidos em doenças em larga escala de diferentes patógenos. Essa técnica é diferente da PCR, utilizando equipamentos e reagentes específicos e pessoas treinadas para interpretação de resultados.

Assim um *array* de DNA seria um arranjo de oligonucleotídeos (ou de sequência de cDNA) de fita única que está fixado em um suporte como membrana de náilon,

lâmina de vidro ou, ainda, um chip de sílica (ou chip de DNA). O exemplar mais conhecido é o GeneChip®.

O importante é você saber que os experimentos de *arrays* de DNA nos permitem fazer uma comparação gênica entre duas ou mais amostras como: analisar células normais versus tumorais, ou células infectadas versus normais. Nos chips de DNA é possível sintetizar milhões de oligonucleotídeos em um só arranjo, que poderá conter todos os genes de um organismo, por exemplo, como o genoma humano; isso de uma só vez.

Projeto Genoma

O Projeto Genoma Humano (PGH) é o mapeamento do genoma humano que identifica todos os genes e seus nucleotídeos, decifrando o conjunto de genes de um determinado organismo. Assim, sequenciam-se, um a um, os genes que codificam as proteínas do corpo humano e ainda sequências de DNA que não são genes. Esse projeto reuniu um esforço mundial de pesquisadores, médicos e centros de pesquisa e surgiu por iniciativa do National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos

Devido a um grande interesse e esforços da comunidade científica internacional associados aos avanços na área da bioinformática e das tecnologias de informação, um primeiro desenho do genoma foi montado em 26 de junho de 2000, dois anos antes do que era previsto. Assim, na data de 14 de abril de 2003, o projeto foi concluído com sucesso, sequenciando 99% do genoma humano, com uma precisão de 99,99%.

Projeto Genoma e seus benefícios

O que é muito interessante saber sobre o Projeto Genoma é que, através do mapeamento genético do genoma humano, será possível, em breve, encontrar as causas de diferentes enfermidades. Novos medicamentos e vacinas podem ser elaborados a partir de informações obtidas por pesquisas. Descobrindo a causa ou o motivo de várias doenças, o ser humano pode adotar maneiras de se prevenir. Se uma pessoa sabe que é geneticamente predisposta a desenvolver câncer de pulmão, poderá deixar de fumar, adotando medidas saudáveis que retardem ou evitem a doença. Pesquisas genéticas e determinados exames especializados detectam, ainda, se um embrião possui genes para determinada patologia, tornando possível um tratamento adequado ou cirurgia desde os primeiros dias de sua vida. Todos esses procedimentos diminuem os efeitos danosos que a doença pode trazer a um organismo, assim como também as sequelas que poderiam futuramente aparecer.

Como a montagem do genoma é feita pela união das sequências de DNA que se juntam para criar uma representação do material genético em estudo, sabe-se que para isso, inicialmente é necessário que o DNA seja partido em milhões de pequenos pedaços. Esses pedaços são "lidos" por máquinas de sequenciamento automático, que podem ler até mil nucleotídeos ou bases de uma só vez. Nessa leitura, detectam-se todos os locais nos quais existem coincidências entre pedaços distintos de DNA. Assim, as partes coincidentes podem ser fundidas, unindo dois pedaços de DNA. O processo é repetido até montar a sequência completa.



Pesquise mais

Os avanços na tecnologia da Biologia Molecular são inúmeros e usados tanto para caracterizar genomas normais quanto patológicos. Enquanto questões éticas são abordadas sobre esse tema, os laboratórios estudam a possibilidade de desenvolver e aplicar testes de DNA, pois do ponto de vista comercial os interesses são muito grandes. Entender a complexidade de algumas situações e a dificuldade de se tomar decisões em benefício dos envolvidos, evidencia a importância de se discutir questões éticas com toda a sociedade. ZATZ, M. Projeto Genoma Humano e Ética. **São Paulo em Perspectiva**, v. 14, n. 3, p. 47-52, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/spp/v14n3/9771. pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015.

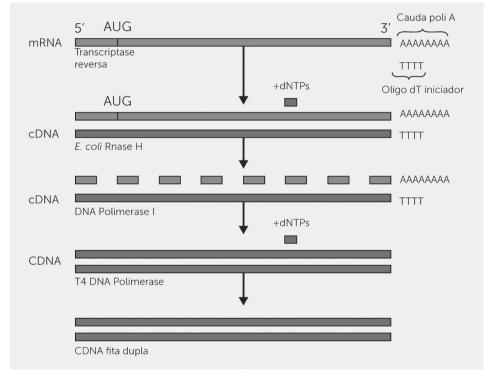
Bibliotecas de DNA

Uma biblioteca de genes é tida como uma coleção de fragmentos de DNA de um organismo, obtido pela ação de enzimas de restrição, inserido em um hospedeiro. A biblioteca de genes é representativa do conjunto de todos os genes de um determinado organismo, sendo importante quando se pretende isolar um gene específico. Assim, quando o objetivo do trabalho é clonar um determinado gene ou o cDNA (DNA complementar), torna-se necessária a construção de coleções de genes recombinantes, favorecendo diferentes estudos. Se esses dados forem obtidos a partir de um DNA genômico, representando todo o genoma, acaba por constituir uma biblioteca de genes. A biblioteca de DNA complementar (cDNA) são os clones de DNA complementares derivados de diversos mensageiros da célula (mRNA) de determinado tecido de interesse. Uma biblioteca de genes que envolve uma colônia de bactérias, por exemplo, utiliza um plasmídeo ou placas de fagos (se o vetor usado for um fago) com o material de DNA recombinante. Essa situação inclui sequências de um genoma inteiro de um organismo em que diversas sequências são expressas por um tipo celular em particular ou por sequências existentes em um fragmento de DNA.

Quando tratamos o gene do exemplo citado com a enzima RNase H, esta faz cortes no material criando espaços na cadeia de RNA. Assim a cadeia complementar

de DNA é por sua vez copiada, formando-se novos DNAs complementares (cDNA) de cadeia dupla por ação de uma enzima DNA polimerase. O *primer* para esse seguenciamento seria o fragmento de mRNA original.

Figura 1.7 | Síntese de cDNA de cadeia dupla, em que o mRNA é extraído de um determinado tecido e o cDNA é sintetizado a partir de um mRNA na presença da ação da enzima transcríptase reversa. Um oligonucleotídeo complementar à cauda poli-A da extremidade 3' do mRNA (à direita, acima da figura) se hibridiza com esta parte do gene, servindo como primer da enzima transcríptase reversa, que por sua vez copia o RNA para uma cadeia complementar de DNA, formando um híbrido DNA/RNA.



Fonte: http://users.med.up.pt/med05009/bcm/bibliocdna.htm. Acesso em: 11 nov. 2015.



Reflita

Você percebeu quanta importância tem o estudo ou a investigação científica no sequenciamento de diferentes genes envolvidos em patologias? Para isso, leia o artigo que fala a respeito das alterações genéticas que são responsáveis pelo aparecimento das hemoglobinas variantes e/ou em genes reguladores, resultando nas talassemias. BERTHOLO, L.C.; MOREIRA, H.W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre

elas e talassemias beta. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 4, p. 245-51, ago. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n4/a04v42n4.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015.



Exemplificando

Como estudamos a importância do sequenciamento do material genético na descoberta de alterações genéticas e patológicas, ainda é possível aplicar o referente estudo quando se faz uso da terapia gênica para curar doenças genéticas, substituindo um gene com defeito (ou aquele que esteja ausente). Também a técnica de *Southern Blotting*, o aproveitamento do material genético para comparar o DNA recolhido em cenas de crime com as do(s) suspeito(s); e o uso de sondas de DNA para efetuar diagnósticos e identificar os agentes patogênicos que estão no sangue e nos alimentos.



Faça você mesmo

Agora que foi identificada a doença de Luana e sabe-se que tratamentos mais pesados farão parte da rotina da criança, o que fazer para que isso não venha causar mais problemas à saúde do bebê e até risco de vida? Enumere quais doenças poderiam ser transmitidas em caso de transfusão sanguínea neste momento em que foi determinada a necessidade de tal tipo de tratamento.



Vocabulário

Hibridização do DNA: processo de emparelhamento de cadeias do material genético (DNA) por complementaridade de bases nitrogenadas.

Sem medo de errar



Atenção!

O tratamento da talassemia maior ou grave é feito ao longo de toda a vida do paciente, através de transfusões sanguíneas periódicas, a cada três ou quatro semanas. Esse fato ameniza o aparecimento da anemia crônica, sem prejudicar muito o desenvolvimento ósseo e o funcionamento do coração, garantindo a quantidade de oxigênio suficiente para o funcionamento orgânico.

Como os resultados de Luana foram positivos para a talassemia e a criança precisa de transfusão de sangue, a equipe médica dará início ao estudo do sequenciamento genético da talassemia. Dessa forma, uma vez que se compreenda o mecanismo molecular da doença de Luana, deve ser possível chegar a um diagnóstico mais aperfeiçoado, intervindo para a cura da doença. Assim, será possível saber a especificidade dessa doença em bebês, a susceptibilidade e a resistência a esse tipo de doença, e a tolerância aos medicamentos utilizados.



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha entendido quais os riscos do tratamento de Luana e a importância do sequenciamento genético na maioria das patologias ainda sem cura. Com as transfusões sanguíneas, a pessoa passa a acumular ferro no organismo, fazendo com que a terapêutica para a doença inclua, ainda, o uso de medicamentos para retirar o excesso de ferro do corpo, o qual poderia trazer danos irreversíveis para órgãos vitais caso não fosse tratado. Outro problema das transfusões de sangue é o risco de contrair doenças infecciosas. Por fim, a alternativa de tratamento da talassemia maior seria um transplante de medula óssea, que precisa de acompanhamento o tempo todo com relação ao paciente.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com as de seus colegas.

Tratamentos da talassemia	
1. Competência geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar aos diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia.
2. Objetivos de aprendizagem	Compreender como acontece a evolução da Biologia Molecular, o sequenciamento genético, a importância das bibliotecas de DNA e do Projeto Genoma.
3. Conteúdos relacionados	Bibliotecas de DNA, Projeto Genoma e Genoma e sequenciamento de DNA.

(continua)

4. Descrição da SP	Luana é portadora de talassemia como a mãe, no entanto os exames relatam que ela apresenta a forma mais grave de talassemia, necessitando de transfusão de sangue. Clara fica desesperada, porque, além de muito pequena, a criança precisa receber a transfusão de um doador compatível sem, no entanto, apresentar traços de qualquer doença, pois como Luana é pequena e ainda tem um sistema imunológico incompleto, poderia não aguentar (ou não conseguir reagir) determinada patologia e agravar seu quadro clínico. Assim, o hospital que está cuidando de Luana se interessou em fazer um estudo mais detalhado sobre esse tipo de patologia em crianças. Enquanto se iniciam as transfusões sanguíneas Luana passa bem, no entanto, há a necessidade de saber através de exames, após algum tempo, se ela não contraiu alguma doença infecciosa.
5. Resolução da SP:	A realização de testes com o uso de técnicas de Biologia Molecular como real time confirmou os resultados positivos para a talassemia em Luana, como sua mãe havia suspeitado. No momento dos exames de recém-nascido, verificou-se uma anemia severa em Luana e assim o resultado do exame de talassemia mostra que ela deve fazer rapidamente transfusões de sangue para conter a anemia. Não foram identificadas doenças infecciosas em Luana e a transfusão foi bem aceita pelo organismo da criança. Esse procedimento seguirá até que as taxas dos componentes sanguíneos necessárias para conter a anemia se estabilizem dentro da normalidade.



Faça você mesmo

As técnicas de Biologia Molecular são amplamente utilizadas para o diagnóstico de doenças, como no diagnóstico da talassemia e do HIV por exemplo. Identifique outras doenças que só são possíveis de serem descobertas com o auxílio de técnicas moleculares.

Faça valer a pena!

- **1.** O sequenciamento de genes seria uma série de reações e métodos bioquímicos que têm o objetivo de determinar a ordem das bases nitrogenadas da molécula de DNA: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). Assim podemos afirmar que:
- a) A montagem do genoma é feita através da união de sequências de DNA agrupadas para então criar uma representação do cromossomo original do DNA.
- b) As montagens de sequências de proteínas são feitas através do

estímulo de enzimas de restrição e inibição da tag polimerase.

- c) A desnaturação, amplificação e extensão são as fases do sequenciamento genético.
- d) A formação de genes alelos têm origem de um único cromossomo.
- e) A montagem do cariótipo é feita para identificação de genes mutantes.
- **2.** No processo de um sequenciamento genético, todo o DNA é analisado, fragmentando o material genético em milhões de pequenos pedaços. Assim:
- I. As pequenas porções diminutas do gene são "lidas" por equipamentos de sequenciamento automático, que leem até mil nucleotídeos ou pares de bases de uma só vez.
- II. Os genes reúnem suas partes e as colocam na ordem original, detectando alterações e coincidências entre diferentes pedaços de DNA.
- III. As partes do gene que coincidem podem ser fundidas, unindo dois pedaços de DNA.
- IV. O processo de sequenciamento acontece uma única vez.
- V. O processo de sequenciamento é repetido até montar a sequência completa.

Pode-se afirmar que:

- a) As alternativas I, II, III, IV estão corretas.
- b) As alternativas I, III, IV, V estão corretas.
- c) As alternativas III, IV, V estão corretas.
- d) As alternativas I, II, III, V estão corretas.
- e) As alternativas I, IV, V estão corretas.
- **3.** O sequenciamento de DNA é um método de Biologia Molecular que tem por finalidade:
- a) Facilitar a entrada e saída de genes.
- b) Determinar a sequência de nucleotídeos em uma determinada molécula de DNA.

- c) Realizar a cópia de um cDNA e RNAt para garantir a formação de novos genes.
- d) Extrair o RNA do tecido.
- e) Colaborar com a formação de novas cadeias de genes mutantes.

Análise de ácidos nucleicos

55

Referências

ALMEIDA, P. S. R. et al. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mieloide crônica por PCR em tempo real. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 382-6, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v29n4/a12v29n4. pdf>. Acesso em: 8 nov. 2015.

ANDRADE, V. P. de et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n1/a11v43n1. pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 4, p. 245-51, ago. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n4/a04v42n4.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015.

BONINI-DOMINGOS, C. R. et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 3, p. 388-94, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v22n3/13413.pdf>. Acesso em: 30 nov. 15.

CARROLL, S. B. et al. **Introdução à genética**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

CARVALHO, C. V. de; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de práticas em biologia molecular**. São Paulo: Yends, 2010.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. A célula. 3. ed. Barueri: Manole, 2013.

CASTILHO, L. Imuno-hematologia molecular: onde estamos e para onde vamos? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 4, p. 216-17, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n4/a04v31n4. Acesso em: 8 nov. 2015.

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. 2. ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 2007.

JOBIM, M. R. et al. Novos testes de DNA na investigação de paternidade com suposto pai falecido. **RT/Fasc. Civ.**, ano 97, v. 874, p. 55-69, ago. 2008. Disponível em: http://www.cdg.org.br/vs-arquivos/banner/artigo-doc-1478.pdf>. Acesso em: 7 out. 2015.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KARP, G. Biologia celular e molecular. 3. ed. Barueri: Manole, 2005.

MALACINSKI, G. M. **Fundamentos de biologia molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MALTA, G. Nobel de química vai para trio que estudou reparo da molécula de DNA. **Folha de S.Paulo**. Disponível em: http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2015/10/1691102-nobel-de-quimica-vai-para-estudos-dos-mecanismos-de-reparacao-do-dna.shtml>. Acesso em: 8 out. 2015.

MENCK, C. F. M. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 99-108, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/a07v2470.pdf. Acesso em: 30 nov. 2015.

MONTERO-LOMELI, M.; RUMJANEK, F. D. **Técnicas de biociências**: protocolos comentados para o laboratório. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

NAOUM, P.C. **Eletroforeses**: técnicas e diagnósticos. Grupo Gen. São Paulo: Santos, 2012.

PINHO, M. S. L. Pesquisa em biologia molecular: como fazer? **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 26, n. 3, p. 331-6, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbc/v26n3/a16v26n3.pdf>. Acesso em: 7 out. 2015.

ROBERTIS, E. de; HIB, J. **De Robertis**: bases da biologia celular e molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

VARELLA, D. Clonagem humana. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 263-5, 2004. Disponível em: ">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-40142004000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>">http://www.scielo.br/scielo.php?scielo.p

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR**: aplicações e padronização de reações. Disponível em:http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20 Cristina%20-%20Biologia%20Celular/Principios_da_PCR.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2015.

WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. F.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZAMARO, P. J. A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 261-6, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v38n4/a03v38n4. pdf>. Acesso em: 30 out. 2015.

ZATZ, M. Projeto Genoma Humano e Ética. **São Paulo em Perspectiva**, v. 14, n. 3, p. 47-52, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/spp/v14n3/9771.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015.

ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Convite ao estudo

Nesta unidade, vamos dar continuidade à disciplina de Biologia Molecular e Biotecnologia, introduzindo o conceito de genes e a importância importância do código genético. Além disso, veremos por que acontecem as mutações e como elas interferem nas alterações do código genético.

A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar aos diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia. A competência técnica está relacionada em conhecer os procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA, as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas.

Os objetivos são entender o conceito de gene e a importância do código genético e por que acontecem as mutações e como elas interferem nas alterações do código genético.

Em cada seção desta unidade, vamos trabalhar com o conceito de genes, código genético e o aparecimento das mutações. Veremos como esses importantes conceitos estão relacionados com as situações diárias e como a Biologia Molecular pode ajudar você a entender o conteúdo desta unidade e resolver as situações-problema com o auxílio de materiais pedagógicos como: o livro didático, a web aula e as leituras que serão sugeridas.

Então vamos lá, bons estudos!

Seção 2.1

Código Genético

Diálogo aberto

Alice é vaidosa e se importa muito com sua aparência, fazendo dietas, exercícios físicos e adquirindo produtos de beleza. Outro costume de Alice é estar sempre bronzeada; mesmo em dias mais frios, ela gosta de ir à praia ou piscina, ficando muito tempo exposta ao sol e aos raios ultravioletas, recorrendo, muitas vezes, ao bronzeamento artificial. Realmente Alice chama a atenção e se destaca por sua beleza, no entanto precisa saber se toda essa vaidade não pode acabar lhe fazendo mal quando se trata de exageros e excessiva preocupação com o culto pela beleza.

Alice, mais uma vez, combinou com suas amigas de passar o final de semana na praia para aproveitar o feriado prolongado. Está pensando no casamento em que ela será madrinha daqui a 15 dias. Disse a uma de suas amigas: "Ana, preciso ficar no sol o final de semana inteiro, se não meu vestido do casamento não irá ficar legal, a cor não irá combinar comigo". Ana, que percebeu mais uma vez o exagero, disse: "cuidado, amiga! Você está exagerando, já está bem assim. E mais, deveria pensar quais os problemas que o excesso de sol pode trazer a você e a sua pele". Assim, quais seriam as principais consequências do excesso de radiações no corpo de uma pessoa? Quais patologias podem ser desencadeadas com o passar do tempo? Todos os conteúdos envolvidos nesta seção irão ajudar você a pensar na importância da Biologia Molecular relacionada ao entendimento do código genético, os fatores que interferem nesse código, assim como também o diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças ajudando você a resolver a situação-problema enfrentada por Alice.

Não pode faltar

Há tempos, questionava-se sobre qual seria a molécula fundamental da vida que determinava ou que seria responsável pelas características hereditárias do ser humano. No entanto, após as pesquisas desenvolvidas por Watson e Crick em 1953, determinou-

Análise de proteínas **61**

se a estrutura molecular do DNA, molécula responsável pelo armazenamento da informação e herança genética. Após estudos posteriores vinculados a essa descoberta, foi postulado o Dogma Central da Biologia Molecular, que reúne toda informação genética contida no DNA das células.

Como já pudemos aprender, a biologia molecular desenvolveu métodos e técnicas de manipulação do DNA e RNA, a fim de que esse material genético fosse extraído e purificado, determinando assim o sequenciamento de genes. Assim, a ciência nos permitiu determinar a composição do genoma de várias espécies, "lendo" os milhões de pares de bases contidos na molécula de DNA de determinada espécie de interesse. Esse fato nos fornece uma quantidade enorme de informações, que precisam ser processadas, organizadas e armazenadas para posterior análise.

O gene é uma sequência de diferentes nucleotídeos que formam os cromossomos. Cada gene codifica uma proteína que é por sua vez um conjunto de aminoácidos. O gene é formado por uma sequência de DNA e RNA, no qual o RNA é o responsável pela síntese de proteínas da célula. Por definição, gene é a unidade fundamental da hereditariedade, pois contém a informação genética que é transmitida de pai para filho. Hoje em dia, um gene é uma proteína, ou seja, um segmento de DNA que produz uma cadeia polipeptídica. No entanto, descobertas recentes vêm mostrando que a realidade é mais complexa ainda do que esse conceito.

Na verdade, se em uma bactéria o número de proteínas sintetizadas é grande, necessitando por volta de 3 milhões de pares de bases para o estudo de determinado DNA, na célula humana, então, o processo é muito mais complexo. Existe, desta forma, a necessidade de um controle muito mais eficiente para definir ou determinar quais genes serão ativados e quais proteínas serão sintetizadas em cada tecido, a cada fase do desenvolvimento. Desta maneira, o controle da expressão gênica é feito por sequências de DNA que ativam determinados genes, informando qual o momento correto que ele deve ser expresso e em qual intensidade.

O controle da expressão do gene não está na região codificadora do gene transcrita em RNAm. Quem controla todo o processo de transcrição é a enzima DNA polimerase, ligando-se a uma região anterior à porção codificante do gene, conhecida como **sequência promotora ou promotor**. Tanto no início quanto no final, sequências específicas definem a uma **unidade de transcrição**, a qual produz uma molécula de RNA. Esse RNA produzido é diferente daquele que conhecemos anteriormente, chamado de RNA heterogêneo nuclear (hnRNA) ou **transcrito primário**. Esse RNA, após passar por diferentes processos na transcrição, forma o RNA maduro que aí sim sai do núcleo e passa a ser transcrito no citoplasma. A tradução se dá na leitura da sequência no sentido 5´ para 3´, iniciando-se na sequência de pares de bases conhecida como AUG (códon ligado ao aminoácido metionina), prosseguindo até o final do processo no qual encontra sequências determinadas com códon finalizador que pode ser de três tipos: UAA, UGA, UAG.

O código do DNA

Como sabemos, a molécula de DNA carrega as informações corretas da sequência de aminoácidos que formam as várias proteínas de nossas células. A molécula de DNA possui as cadeias polipeptídicas lineares de acordo com a sequência de nucleotídeos da molécula. Também na molécula de DNA cada posição pode conter quatro nucleotídeos formados a partir dos 20 aminoácidos que aparecem nos diferentes pontos do DNA.

Mas saiba que o código genético não é composto simplesmente por um único nucleotídeo controlando a posição de um aminoácido, não pode ser, pois pense: se assim o fosse, teríamos apenas quatro possibilidades de combinações. Ainda se pensássemos em dois nucleotídeos, também não seriam suficientes para definir onde e como ficariam os 20 tipos de aminoácidos na cadeia de proteínas, pois o número de combinações possíveis seriam 16. Assim, se tivermos três nucleotídeos determinando o número de combinações possíveis na cadeia polipeptídica, teríamos 64 combinações, sendo um número suficiente de combinações para a disponibilidade de aminoácidos.

Desta forma, no ano de 1966, o código genético foi decifrado, ficando determinado que:

- 1-Os aminoácidos são codificados por uma combinação de três bases nitrogenadas do DNA, formando uma unidade conhecida como **CÓDON**;
- 2 Um mesmo aminoácido pode ser definido por mais de um códon, sendo chamado de degenerado;
- 3 Há três códons que funcionam para finalizar a sequência da cadeia polipeptídica, determinando a interrupção da cadeia que está sendo sintetizada.

Assim, o código genético seria o conjunto de cada três bases nitrogenadas denominadas CÓDON, determinando a entrada de um aminoácido específico ou marcando o final da síntese proteica. O códon de iniciação será sempre AUG, ou seja, sempre que houver adenina, uracila e quanina será iniciada a síntese de proteínas.

A sequência de particularidades com relação ao código genético foi sugerida pelo pesquisador Crick em 1957 e foi chamada de Dogma Central da Biologia Molecular. Esse tema relata que o fluxo de informações genéticas existente na célula obedece ao sentido unidirecional, sendo o DNA transcrito em RNA e por sua vez traduzido em proteína.

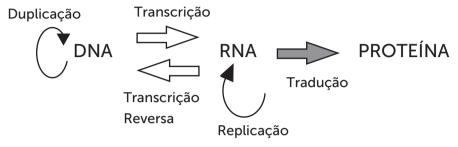
No entanto, duas colocações são apresentadas em exceção:

- Devido à divisão celular, o DNA é copiado formando novas moléculas deste material genético, no processo chamado de duplicação do DNA;

Análise de proteínas 63

- Ainda alguns vírus possuem o RNA como material genético, assim o RNA é copiado e revertido em DNA em um percurso conhecido como transcrição reversa.

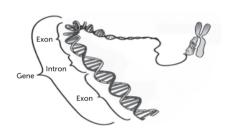
Figura 2.1 | Dogma da Biologia Molecular



Fonte: http://aprendendobiologia.com.br/?page_id=76. Acesso em: 21 nov. 2015.

Como vimos, através de um sinal vindo de dentro ou de fora de nossas células, há um aviso de que é necessário sintetizar determinada proteína em nosso organismo. Assim, o DNA é copiado no RNA, conservando a mensagem que está presente na cadeia molde (com bases nitrogenadas de uma das cadeias do material genético hereditário) favorecendo a formação da dupla hélice do DNA. Para que isso aconteça, é necessário que a dupla fita de DNA se abra separando os polinucleotídeos na presença da enzima

Figura 2.2 | Gene e estrutura do DNA e um cromossoma



FONTE: http://pt.wikipedia.org/wiki/Gene#/media/File:Gene.png. Acesso em: 21 nov. 2015.

RNA polimerase. Desta forma, o RNA é formado, porém tendo copiado a mensagem do DNA de forma complementar.

No entanto, para que a mensagem de formação de síntese proteica aconteça, é necessário que citemos a presença de determinadas porções dos genes conhecidas como **íntrons** (porção que não tem função codificante e não aparecem nas proteínas) e ainda regiões que carregam informações codificantes exatamente para a síntese de proteínas, conhecidas como **éxons**. Desta forma, na estrutura do DNA existem regiões que antecedem e que vêm depois da região codificadora, bem como as sequências que não são traduzidas (íntrons) e que se intercalam com os segmentos que são traduzidos (éxons) conforme figura 2.2.

Quando se inicia a cópia do DNA, o RNA copia tanto os íntrons quanto os éxons, só que antes do RNA sair do núcleo, as porções relacionadas aos íntrons são removidas, em um evento conhecido de **splicing** (processamento do RNA).

Dessa forma, quando o RNA mensageiro carrega a mensagem do núcleo para o citoplasma, ele só "carrega" as porções correspondentes aos "éxons", ou seja, os segmentos que serão realmente traduzidos. E para que servem os íntrons então?

Os íntrons são seguências de bases nitrogenadas presentes no DNA, mas não no RNA mensageiro (RNAm), não participando assim da síntese de proteínas, sendo removidos naturalmente durante a transcrição. Por muito tempo pensou-se que os íntrons não serviam para nada durante o processo de tradução de proteínas. Entretanto, foi descoberto que por volta de 75% do processo da transcrição dos genes humanos (fase anterior à tradução da síntese proteica) é realizada na região dos íntrons. Assim, por mais que no momento da tradução esses elementos não aparecam, vale lembrar que na transcrição na qual o material genético é duplicado e copiado, os íntrons são regiões de fundamental importância, mostrando a ligação desta região com a regulação do gene. O que não se tinha certeza, entretanto, seria como os íntrons seriam transcritos no gene humano, ou qual o número de unidades de transcrição essas unidades possuem e quais os padrões de expressão dos íntrons nos diversos tecidos. Por isso, novos estudos levaram em consideração todos esses dados para que se soubesse muito mais sobre essas unidades reguladoras da transcrição dos genes. Assim, as regiões de transcrição estariam nos íntrons, constatando que não se trata de um acontecimento ocasional restrito a alguns genes, mas sim em sua maioria.

Vale lembrar que nossas células possuem mecanismos específicos que identificam em nosso genoma quais seriam os genes que deveriam ser ativados ou desativados em determinada situação, fazendo com que tanto os íntrons quanto os éxons participem da regulação gênica no momento certo. Depois de se ter o conhecimento do genoma, é importante determinar o sequenciamento dos genes, determinando as características desse material hereditário.

Mutações

A Mutação é considerada uma modificação no DNA, o material hereditário da vida. Pode ser ainda uma mudança brusca na rede de informações genéticas, normalmente referindo-se às alterações de pares de bases do DNA. Essas alterações podem ser maiores, abrangendo inclusive algumas aberrações cromossômicas.

Sabemos que diferentes processos que se repetem muitas vezes, podem gerar erros, principalmente no caso das divisões celulares que acontecem ao longo da vida de um organismo. Geralmente os tecidos do nosso corpo possuem mecanismos de reparo, como se fosse um "controle de qualidade" dos erros que podem aparecer na cópia do material genético. Quando algum defeito escapa do controle, aparecem então as mutações.

Assim, na fase de replicação do DNA, por exemplo, uma base A (adenina) que deveria se parear com a T (timina) na molécula complementar, pode alinhar-se com uma citosina (C). Se isso vier a acontecer, a proteína formará um aminoácido

Análise de proteínas 65

diferente daquilo que fora programado para a síntese de determinada proteína. Assim, a alteração de um único aminoácido na cadeia polipeptídica pode alterar a enzima ou proteína que está sendo formada, fazendo com que ela seja incapaz de realizar sua função. A alteração dessa molécula pode desencadear severas alterações no organismo, levando o indivíduo até a morte.

Existem várias doenças humanas desencadeadas devido à troca de um único nucleotídeo na molécula de DNA, causando assim alterações em determinada proteína fundamental para a célula. Um exemplo desse tipo de alteração é o aparecimento da anemia falciforme, doença que afeta a hemoglobina sanguínea.

Com a mutação, o DNA de um organismo é afetado interferindo em seu comportamento e em sua fisiologia. As mutações podem algumas vezes ser aleatórias, benéficas, neutras ou prejudiciais para o organismo. Quando as mutações não "tentam" suprir ou usar aquilo que o organismo "necessita", elas são consideradas aleatórias, sem interferir na sua estrutura e no seu funcionamento. Por exemplo, as mutações podem favorecer o aparecimento de uma nova enzima na célula tornando um organismo mais eficiente para sobreviver em um determinado ambiente.

No entanto, quando a mutação acontece durante a mitose em uma célula somática, ela é transmitida para as gerações descendentes. Uma das consequências desse tipo de mutação é a formação de tumores e uma aceleração no envelhecimento decorrente de um número elevado de mutações que foram acumuladas durante toda a vida.

Figura 2.3 | Mutação por substituição.



Fonte: http://www.ib.usp.br/evosite/evo101/IIIC3aTypes.shtml. Acesso em: 21 nov. 2015.

Se as mutações acontecerem em células em: 21 nov. 2015. germinativas como os gametas durante o processo da meiose, essas informações podem ser transmitidas para as novas gerações.

Tipos de mutações: conhecer os tipos de mutações facilitam o entendimento dos inúmeros efeitos destas no organismo.

- 1 **Substituição**: é uma mutação que troca uma base nitrogenada por outra (por exemplo, a troca de uma única base A por uma G). Essa substituição poderia levar à:
- A Mudanças no códon que codifica um aminoácido causando mudanças na proteína produzida. Por exemplo, a anemia falciforme acontece devido a uma substituição no gene da proteína beta-hemoglobina, que tem um único aminoácido alterado na proteína produzida;
- B Mudanças no códon que codifica o mesmo aminoácido e não causa mudanças na proteína produzida, são conhecidas como mutações silenciosas;
 - C Mudanças de um códon codificador de aminoácido para um códon "finalizador"

pode deixar a proteína incompleta. Esse fato leva a sérias consequências, já que a proteína incompleta não deve funcionar.

2 - **Inserção**: são mutações onde pares de bases extras são inseridos em um novo lugar no DNA.

Figura 2.4 | Mutação por Inserção

CTGGAG CTGGTGGAG

Fonte: http://www.ib.usp.br/evosite/evo101/IIIC3aTypes.shtml. Acesso em: 21 nov. 2015.

3 - Deleção: são mutações nas quais um trecho de DNA é perdido ou deletado.

Figura 2.5 | Mutação por Deleção.



Fonte: http://www.ib.usp.br/evosite/evo101/IIIC3aTypes.shtml>. Acesso em: 21 nov. 2015.

4 - Deslocamento do quadro de leitura

Como o DNA codificador de proteínas divide os códons através de três bases cada, quando há inserções e deleções pode haver alterações no material genético a ponto de sua mensagem perder o sentido. Assim se você disser "Com dor nos pés", cada letra estaria representando um códon. Se você deletar somente a primeira letra C e tentarmos analisar a sentença, ela não fará sentido. Isso acontece também na Biologia Molecular, nos quais os códons são lidos de maneira incorreta. Esse fato nos fornece proteínas que não são funcionais, detectando erro na formação da cadeia polipeptídica.



Assimile

Interessante notar que a mutação é a mudança na sequência de DNA de um gene, aliada a recombinação gênica que é a responsável pela variação genética dos seres vivos. Assim, as mutações benéficas podem se acumular, resultando em mudanças evolutivas adaptativas.

Análise de proteinas **67**



Reflita

Uma pequena porcentagem de todas as mutações tem na verdade um efeito positivo. No entanto, mesmo esse pequeno número de mutações forma novas versões de proteínas ou enzimas que podem ajudar na adaptação de organismos e na manutenção da biodiversidade. Na edição 237 de 2015 da Fapesp você encontra dados desses estudos: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2014/01/076-077_Leveduras_215.pdf?71b16f>. Acesso em: 22 nov. 2015.



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto a respeito do código genético e o Dogma Central da Biologia Molecular, você pode consultar o material disponível pela W Educacional Editora e Cursos Ltda. Você irá entender o conceito de fluxo de informação genética postulado pelo Dogma Central da Biologia Molecular, compreender o que é o Gene e o Código Genético, entender os processos moleculares que sofreram mudanças e o que foi postulado pelo Dogma Central da Biologia Molecular dentre outros aspectos da Biotecnologia. Acesse o link: http://lms.ead1.com.br/webfolio/Mod3921/mod_dogma_central_da_biologia_molecular_v2.pdf. Acesso em: 22 nov. 2015.

O estudo da biologia molecular em identificar a doença mais cedo, avaliando a eficácia do tratamento e a escolha da terapia

Assim, a importância da Biologia Molecular está também no diagnóstico precoce de diversas doenças. A análise de proteínas usando métodos de Biologia Molecular fornece uma gama de dados que conseguem contornar os sinais e sintomas de patologias, tratando ou prevenindo precocemente o desenvolvimento das mesmas. De modo geral, quanto mais cedo a doença é descoberta, maior é a chance de sucesso no tratamento e até mesmo de cura.



Exemplificando

Detectar um tumor em estágio inicial da doença, ou ainda sem ter sinais e sintomas da mesma, favorece o tratamento do paciente, aumentando aumentando a chance de cura.



Faça você mesmo

Doenças degenerativas que acabam por incapacitar pacientes são um grande desafio para a medicina. Será que se fosse possível saber a respeito da predisposição genética e sobre a possibilidade de realização de testes moleculares, não poderíamos amenizar o sofrimento de pacientes que sofrem de Alzheimer, por exemplo? Leia e analise o texto a respeito do envolvimento da Biologia Molecular e doenças neurodegenerativas para pensar sobre a importância desta ciência na vida das pessoas. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n1/2078.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2015

Sem medo de errar



Atenção!

Para entender o contexto das mutações e biomarcadores moleculares relacionados à patologia do câncer juntamente com a genética e Biologia Molecular repercutindo na área epidemiologia, leia o material disponibilizado. Neste artigo, discute-se a ampliação das fronteiras da pesquisa epidemiológica em câncer com a incorporação das técnicas da genética e da Biologia Molecular. Disponível em: http://www.scielosp.org/pdf/csp/v17n3/4631.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2015.



Lembre-se

O conhecimento de biomarcadores moleculares, o papel das mutações genéticas na carcinogênese, a aplicação destas técnicas nos estudos epidemiológicos e nas implicações para a prevenção de doenças é de grande importância no diagnóstico e tratamento de patologias. Esse estudo nos permite ampliar a compreensão dos mecanismos da carcinogênese e dos efeitos de fatores de risco no câncer.

Um exagero de Alice na exposição solar tem trazido diferentes preocupações para seus amigos. No último feriado, Alice precisou de ajuda médica devido a essa excessiva exposição solar, o que fez com que a médica que lhe atendeu, alertasse sobre diferentes manchas e pintas que se mostram morfologicamente alteradas em sua pele. Sua amiga Ana disse que tem conversado com Alice, e assim que voltarem para casa agendará uma consulta com a dermatologista.

Análise de proteínas 69

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha em mente a relação das mutações que podemos sofrer quando ficamos expostos a diferentes fatores ambientais, dentre eles as luzes ultravioletas vindas da radiação solar.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois as compare com a de seus colegas.

"Mutações e a saúde"	
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.
2. Objetivos de aprendizagem	Entender a estrutura e as informações genéticas do DNA, assim como a ação de enzimas envolvidas na quebra e ligação de pares de bases estruturais do material genético. Além disso, compreeender a clonagem de DNA e suas características.
3. Conteúdos relacionados	Conceitos de genes e código genético. As mutações e alterações no código genético.
4. Descrição da SP	Alice passou o final de semana na praia e sofreu insolação, necessitando assim de soro, repouso e alimentação leve. No entanto, assim que se sentiu melhor, agendou uma consulta com sua dermatologista, pois existem manchas e pintas morfologicamente alteradas em sua pele. A dermatologista disse que Alice teria que se cuidar e não se expor com tanta frequência à radiação solar. Com essa situação, a médica, já no próprio consultório, retirou algumas pintas para que fosse realizada a biópsia do tecido. As características morfológicas das pintas trouxeram dúvidas se Alice não estaria com manchas e pintas alteradas, favorecendo a formação de câncer de pele.
5. Resolução da SP:	A realização de biópsia do tecido da pele de Alice mostra resultados de lesões malignas em sua pele. Esse fato ressalta que Alice terá que evitar a exposição ao sol e cuidar do processo cancerígeno desencadeado.



Faça você mesmo

As mutações aparecem em consequência de erros na duplicação do DNA, porém fatores do ambiente elevam a taxa de incidência de erros no material genético como: os raios X, substâncias do fumo, a luz ultravioleta e corantes de determinados alimentos. Procure ver as diferenças que existem em cada tipo de fator desencadeante de mutação e suas implicações na vida das pessoas.

Faça valer a pena!

- **1.** O gene é uma sequência de diferentes nucleotídeos que formam os cromossomos. Assim é correto afirmar que:
- a) Cada gene codifica uma proteína que é por sua vez um conjunto de aminoácidos.
- b) O gene é formado somente por uma sequência de RNA, onde o RNA é o responsável pela síntese de proteínas da célula.
- c) O gene não está relacionado à hereditariedade, pois a informação genética permanece no núcleo.
- d) Um gene é uma proteína, no entanto um segmento de DNA não chega a produzir uma cadeia polipeptídica.
- e) Os nucleotídeos do DNA não aparecem no RNA.

2. O controle da exp	ressão do gene não está na região codificadora do gene
transcritaem	Quemcontrolatodo o processo de transcrição
éa	ligando-se a uma região anterior à porção codificante
do gene, conhecida	como sequência
De acordo com a a	firmativa acima, qual a alternativa correta?

- a) DNA, RNA polimerase, condensadora.
- b) RNA, transcriptase reversa, promotora.
- c) RNAt, DNA polimerase, condensadora.
- d) RNAr, RNA polimerase, promotora.
- e) RNAm, DNA polimerase, promotora.

- **3.** Tanto no início quanto no final da transcrição, sequências específicas produzem uma molécula de RNA. Esse RNA produzido é chamado de RNA heterogêneo nuclear (hnRNA) ou transcrito primário. Esse RNA, após passar por diferentes processos na transcrição, forma o RNA maduro que aí sim sai do núcleo e passa a ser transcrito no citoplasma. Para que ocorra a transcrição, qual sequência iniciaria e terminaria a formação da proteína? A tradução se dá na leitura da sequência no sentido 5 para 3 , iniciando-se na sequência de pares de bases conhecida como AUG (códon ligado ao aminoácido metionina), prosseguindo até o final do processo no qual encontra sequências determinadas com códon finalizador que pode ser de três tipos: UAA, UGA, UAG. Assim, é correto afirmar que:
- a) Início UAG e finalizadora UAA, UGA, UAG.
- b) Início UGA e finalizadora UAG, UAA, UAT.
- c) Início AUG e finalizadora UAA, UGA, UAG.
- d) Início UGA e finalizadora UAA, UTA, UCG.
- e) Início UUA e finalizadora UTT, UCG, GAC.

Seção 2.2

Síntese de proteínas

Diálogo aberto

Alice é vaidosa e se importa muito com sua aparência, fazendo regimes, exercícios físicos e adquirindo produtos de beleza. Outro costume de Alice é estar sempre bronzeada; mesmo em dias mais frios, ela gosta de ir à praia ou piscina, ficando muito tempo exposta aos raios ultravioletas e ao sol, recorrendo, muitas vezes, ao bronzeamento artificial. Realmente Alice chama a atenção e se destaca por sua beleza, no entanto precisa saber se toda essa vaidade não pode acabar lhe fazendo mal quando se trata de exageros e excessiva preocupação com o culto pela beleza.

Alice ficou assustada e até preocupada com o que pode ter ocasionado o câncer de pele e como seu organismo está reagindo diante dessas alterações patológicas. Depois de detectar alterações em pintas na pele de Alice em uma consulta, a médica dermatologista buscou entender o que poderia estar desencadeando essa busca incessante pela beleza. Na última consulta, Alice resolveu se abrir com a médica e lhe dizer que esse efeito da ansiedade já havia lhe preocupado outras vezes quando teve bulimia. Nada realmente lhe deixava satisfeita, e aí o problema era de ordem psicológica. Também disse à médica que não passava um dia sem ir para a academia, ficando de 2 a 3 horas fazendo exercícios físicos. Este fato também mostrava que Alice se preocupava muito com sua aparência física, sem, no entanto, atentar-se às desordens psicológicas que poderiam estar envolvidas em situações como essa.

A médica se colocou à disposição para ajudar Alice com relação ao fator psicológico que lhe trazia uma ansiedade diária. Porém, também lhe explicou o que havia acontecido com relação às alterações sofridas em sua pele. E disse ainda: "Alice, muito provavelmente não só o sol, mas também sua ansiedade é tida como um fator de estresse. Tudo isso pôde ter favorecido para que suas células sintetizassem as proteínas de uma forma errada, causando as mutações em seus genes que desencadeou o câncer de pele. Porém, como detectamos isso logo no início, vamos resolver este problema da melhor maneira possível. No entanto, precisamos trabalhar no sentido de você não se preocupar tanto com a sua aparência física indo à academia dia sim, dia não, e tomar sol somente quando for possível, sem obrigação". O que podemos pensar no que está acontecendo no organismo de Alice quando o trabalho muscular é realizado de modo exagerado? Apesar de saber que é necessário tratar o câncer de

pele o quanto antes, é muito importante neste momento prestar atenção em como controlar a ansiedade de Alice; assim, como podemos ajudá-la nesse sentido?

Vamos trabalhar e entender o processo da síntese de proteínas para compreender melhor o que está acontecendo com o organismo de Alice.

Não pode faltar

A síntese proteica é um processo que acontece no interior de todas as células do organismo, sendo até certo ponto bastante complexo. Esse processo tem duas fases: transcrição e a tradução.

A transcrição acontece no núcleo das células e consiste na síntese de uma molécula de RNA mensageiro (mRNA), a partir das informações contidas numa molécula original de DNA. O processo de síntese proteica inicia-se através da ação da enzima RNA-polimerase, que atua na molécula de DNA. A RNA-polimerase tem a função de desfazer a dupla hélice do material genético, pois vai destruindo as pontes de hidrogênio que ligam as bases complementares (A, T, G, C) das duas cadeias, afastando-as. A RNA-polimerase inicia assim a síntese de uma nova molécula de mRNA de acordo com a complementaridade das bases nitrogenadas disponíveis. Assim, se na cadeia do DNA o nucleotídeo for a adenina (A), a RNA-polimerase liga o mRNA ao nucleotídeo uracil (U). Quando a leitura da complementaridade da fita termina, a molécula de RNA mensageiro separa-se da cadeia do DNA, restabelecendo assim, as pontes de hidrogênio e reconstituindo a dupla hélice. No entanto, nem todas as sequências de bases nitrogenadas contidas na molécula do DNA codificam aminoácidos. Vale lembrar que antes de sair do núcleo, o RNA sintetizado sofre um processamento chamado de "maturação", fazendo com que determinadas porções do RNA sejam transcritos (íntrons), sendo posteriormente removidos. Outras porções conhecidas como éxons ligam-se pela ação da enzima RNA ligase, formando assim um mRNA maturado. O RNA que sofreu esse processo de exclusão dos íntrons é conhecido como RNA pré-mensageiro. No final desse processo, o mRNA é formado por determinadas sequências de bases nitrogenadas que codificam os aminoácidos de uma proteína, podendo assim migrar para o citoplasma, onde deve acontecer a tradução da mensagem, ou seja, a síntese de proteínas.

Assim, a transcrição é o processo de formação do RNA a partir da dupla fita de DNA. Esse RNA formado é conhecido como RNA mensageiro (RNAm) que tem a função de "informar" ao RNA transportador (RNAt) uma determinada sequência de aminoácidos que dará origem às proteínas. Vale lembrar sempre que esse processo é por sua vez catalisado pela enzima RNA-polimerase, que tem a função de quebrar as pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas dos filamentos de DNA. A partir desse momento, a enzima usa uma das fitas de DNA como molde para construção

do RNAm, ligando as bases nitrogenadas de RNA (adenina, citosina, uracila e guanina) a essa fita de DNA. Ao se concluir essas ligações, o processo está completo. A enzima destaca o filamento de RNA formado, voltando a unir as duas fitas de DNA.

Entretanto, entre a fase de transcrição e da tradução, não podemos nos esquecer da etapa de ativação de determinados aminoácidos, nos quais o RNA transportador (RNAt) atua carregando os aminoácidos que estão dispersos no citoplasma até os ribossomos. Numa das regiões do RNA transportador (RNAt) está o anticódon, ou seja, uma sequência de 3 bases complementares ao códon de RNAm. A ativação desses aminoácidos é dada por enzimas específicas que se unem ao RNA transportador, formando o complexo "aminoácido-RNAt", que dá origem ao anticódon (uma sequência de três códons complementares aos códons do RNAm). Para que esse processo aconteça, entretanto, é preciso haver energias vindas de estoques celulares de ATP (adenosina trifosfato).

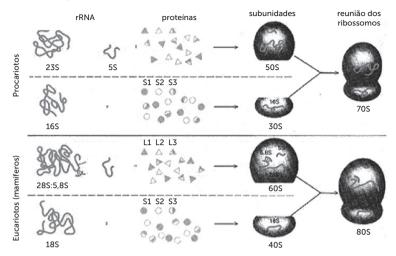
A tradução das proteínas acontece na região do citoplasma, sendo considerada a segunda parte da síntese proteica. A síntese consiste na leitura do mRNA proveniente do núcleo, representando uma sequência de aminoácidos, que constitui assim a proteína. As moléculas de tRNA apresentam-se com cadeias de 75 a 80 ribonucleotídeos que interpretam a linguagem do mRNA e da linguagem das proteínas. O processo da tradução encerra com três etapas conhecidas como: iniciação, alongamento e finalização.

Fase de iniciação da síntese de proteínas

Na fase de iniciação da tradução da síntese de proteínas, a subunidade menor do ribossomo liga-se à extremidade 5' do mRNA, deslizando ao longo de sua molécula até encontrar o chamado códon de iniciação (AUG) que especifica o aminoácido metionina.

Vale lembrar que os ribossomos possuem a subunidade 40S representada como "uma porção circular" que está em cima de outra "porção circular" de 60S, não sendo estruturas simétricas. As duas subunidades têm formas irregulares, porém se encaixam de tal forma que "sobra" uma fenda por onde passa o RNA mensageiro (RNAm), quando o ribossomo se move no processo de tradução e por onde se forma a cadeia polipeptídica. Quando acontece a síntese proteica, vários ribossomos se ligam na molécula de RNA mensageiro, formando um polirribossomo. Desta forma, uma única fita de RNAm pode ser traduzida por vários ribossomos ao mesmo tempo.

Figura 2.6 | Diferença entre as estruturas dos ribossomos de seres procariontes como as bactérias (acima) e dos eucariontes mamíferos (abaixo). Os ribossomos são formados por duas subunidades, uma menor e outra maior.



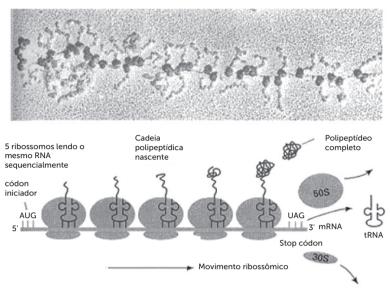
Fonte: http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupo6/estrutura.html. Acesso em: 30 nov. 2015.

Os ribossomos são organelas citoplasmáticas encontradas tanto em procariotos como em eucariotos. Em geral, sabe-se que a estrutura dos ribossomos de seres eucariontes são maiores e mais complexas do que aquelas encontradas nos organismos procariontes. O tamanho dos ribossomos e o peso das moléculas de RNA ribossômico (rRNA) diferem de organismo para organismo. Seres eucariotos simples têm ribossomos menores, embora eles sejam maiores que os ribossomos de bactérias, os mamíferos têm os maiores ribossomos

A principal função dos ribossomos é servir de área ou "sítio" para a tradução, que por sua vez é o processo final da síntese de proteínas, reunindo diferentes aminoácidos e formando as proteínas. Assim que as duas subunidades (uma menor e outra maior) são unidas pelo RNA mensageiro vindo do núcleo, o ribossomo faz a tradução formando a cadeia polipeptídica.

O ribossomo vai, desta forma, deslizando ao longo da fita de mRNA a cada três pares de bases, fazendo sempre com que o códon seguinte seja reconhecido por outro tRNA, ligando assim o próximo aminoácido. À medida que cada novo códon é lido ou processado, um novo aminoácido é traduzido pela interação entre mRNA e tRNA. A ligação entre o códon e o anticódon adequa o aminoácido no ribossomo para em seguida formar a cadeia polipeptídica.

Figura 2.7 | Eletromicrografia mostra a síntese de proteínas onde os ribossomos aparecem como grânulos escuros, além da ligação das subunidades do ribossomo maior (50S) e menor (30S) unindo-se ao RNA mensageiro formando um polipeptídio ou proteína no sentido de movimento 5 para 3 .



Fonte: http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupo6/introdu.html. Acesso em: 30 nov. 2015.

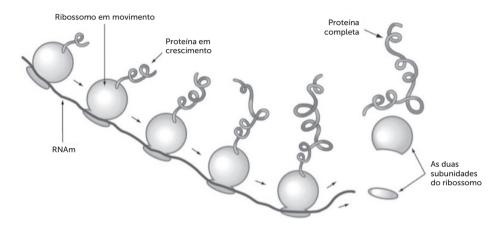
Fase de alongamento da síntese de proteínas

A seguir, após a fase de iniciação, ocorre a fase de alongamento, na qual um segundo RNA transportador (tRNA) carrega aminoácidos específicos de acordo com o códon que encontra em seu caminho. Desta forma, acontece a ligação peptídica entre o aminoácido que está disponível e a metionina que fica sempre na extremidade da cadeia de aminoácidos. A metionina é o aminoácido que inicia a tradução (AUG ou o códon de início), sendo logo depois acrescentados os outros aminoácidos por meio de ligações peptídicas, seguindo até que se encontre o códon de parada ("Stop códon"), que pode ser tanto a sequência UAA, UAG ou UGA. A responsável pelas ligações entre os aminoácidos trazidos pelo RNA transportador é a enzima Peptidil-Aminoacil-Transferase. O ribossomo vai aumentando, avançando de três em três pares de bases ao longo da cadeia de mRNA no sentido 5' 🗆 3', repetindo inúmeras vezes esse mesmo processo. Os tRNA que já se ligaram inicialmente, vão se desprendendo do RNA mensageiro até que se conclua o processo. O evento vai sendo repetido até que todos os aminoácidos que foram codificados pelo RNA mensageiro sejam adicionados à cadeia polipeptídica. O processo de alongamento segue até que o ribossomo encontre um códon de término no RNAm, o que sinaliza o fim da síntese.

Fase de finalização da síntese de proteínas

A tradução ou síntese de proteínas só termina quando a porção codificadora do ribossomo encontra um dos códons de finalização (UAG, UAA ou UGA). Como não existem RNAt que correspondam a esses três códons, o ponto ou local de finalização passa a ser ocupado por proteínas conhecidas como "fatores de terminação". O fator de terminação tem a função de finalizar a síntese de proteínas, fazendo com que a cadeia polipeptídica se solte do último RNAt, induzindo o desligamento das subunidades ribossômicas, com a liberação do RNAm.

Figura 2.8 | Síntese de Proteínas com as subunidades dos ribossomos, RNA mensageiro e a formação da proteína completa.



Fonte: César & Sezar (2007).

Vamos relembrar neste momento a importância do Dogma Central da Biologia Molecular, trabalhando os principais conceitos abordados nesta seção a respeito das informações biológicas, relacionando DNA, RNA e Proteínas. Assim, os processos bioquímicos que estudamos definem o Dogma Central da Biologia Molecular que são: a replicação do DNA, a transcrição e a tradução ou a síntese de proteínas. Desta forma surge então, a explicação sobre como acontece o fluxo da informação genética contida na molécula de DNA, gerando uma proteína. Todas as etapas estudadas trazem a elucidação a respeito da síntese de uma cadeia polipeptídica e quais são os fatores ribossômicos, transcricionais e nucleares envolvidos nesse processo.

Síntese de Proteína Muscular

A prática de atividade física regular é um hábito para manutenção da saúde e do condicionamento físico. Para obtenção de melhores resultados, muitas pessoas

buscam o uso de suplementos alimentares que favorecem a definição da estética corporal, no lugar das proteínas associadas às dietas alimentares. O grande problema é que quanto mais se usa de suplementos, anabolizantes, dentre outras substâncias proteicas, maior é o acúmulo de gordura subcutânea e a sobrecarga de órgãos relacionados com o metabolismo proteico, como rins, fígado e outros.

Os suplementos mais usados pelos esportistas e pessoas que buscam o culto pelo corpo, são as proteínas que garantem o crescimento, desenvolvimento e reconstituição tecidual, como é o caso da musculatura esquelética.

As proteínas são formadas por aminoácidos, sendo os principais aqueles fornecidos pela dieta, conhecidos como aminoácidos essenciais, são eles: leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina. Já os aminoácidos não essenciais são aqueles encontrados no músculo, plasma e ainda tecido visceral. Todos esses aminoácidos fazem parte da estrutura tecidual ou ainda podem compor componentes do metabolismo e hormonal. Em nosso organismo, as proteínas são sintetizadas e degradadas continuamente através de um processo conhecido como turnover, através de processos anabólicos e catabólicos, respectivamente.



Assimile

Sendo então o metabolismo proteico reservado aos fenômenos de anabolismo e catabolismo e continuamente relacionados ao *turnover*, sabe-se que esse mecanismo é ativamente controlado por fatores dietéticos, hormonais (como insulina, glucagon, fator de crescimento derivado da insulina ou IGF-1) e ainda fatores metabólicos.



Vocabulário

Éxon = segmento de bases nitrogenadas de gene que consiste em DNA que codifica nucleotídeos no RNA mensageiro. Um éxon pode codificar aminoácidos de uma proteína.

Íntron = segmentos de DNA de um gene que não codificam determinada parte da proteína produzida pelo gene. Eles separam a sequência constituída pelos éxons.

Splicing = processo que remove os íntrons e aproxima os éxons durante a transcrição do RNA. O *splicing* só ocorre em células eucarióticas, já que o DNA das células procarióticas não possui íntrons.

Fatores de transcrição = são proteínas que se ligam ao material genético ou DNA para que aconteça uma ligação entre a enzima RNA-polimerase e o próprio DNA, permitindo assim a transcrição e a tradução de proteínas.

O corpo humano obtém os aminoácidos do sangue, sendo o mecanismo genético do núcleo celular o responsável pela condução da síntese proteica, de acordo com as necessidades da célula. Nossas células usam, então, a quantidade de aminoácidos necessária para realizar a síntese proteica. A síntese obtém os aminoácidos a partir do sangue e dos fluidos corporais, formando através de ligações peptídicas, as proteínas. A demanda da fabricação de proteínas irá suprir as necessidades dos tecidos corporais, as necessidades hormonais, enzimáticas e de produção de anticorpos.



Reflita

As proteínas dos alimentos são formadas por cadeias longas e complexas de aminoácidos, assim durante o processo digestório, as enzimas proteases do estômago e intestino delgado transformam a proteína complexa em polipeptídios e depois em aminoácidos individuais. Desta forma, os aminoácidos são absorvidos pela parede do intestino delgado que depois levam esses compostos para o sangue e para o fígado através da veia porta.

Veja a importância da síntese de proteínas e disponibilização para o organismo. http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/541/361>, Acesso em: 2 dez, 2015.

A síntese de proteínas para ganho de massa muscular é sempre maior que os processos de catabolismo muscular. Então, salienta-se a importância de entender como acontece o processo de síntese proteica para acelerar o ganho de massa muscular em profissionais da área do esporte, ou aqueles que se preocupam muito com a imagem de seus corpos. As proteínas são então, o principal componente da fibra muscular, aumentando o tamanho dos músculos ao trabalhar esse tecido. Como vimos, o DNA contém as informações necessárias para que todas as proteínas do nosso corpo sejam sintetizadas, no entanto, a escolha de qual proteína será sintetizada através dos processos que conhecemos (duplicação do material genético, transcrição e tradução de proteínas) depende das necessidades do nosso organismo.

Quando a pessoa realiza atividades físicas com aumento de carga muscular, ingerindo proteínas e aumentando a frequência na realização dos exercícios físicos, pode levar o organismo a desenvolver a hipertrofia muscular, na qual o corpo deve aumentar a síntese de proteínas musculares como a actina e miosina. Normalmente

o organismo produz proteínas, isso acontece constantemente em taxas proporcionais à sua própria degradação; esse processo chama-se *turnover*, ou seja, a todo momento o corpo destrói e constrói proteínas, que servem para renovar suas estruturas, substituindo tecidos velhos por novos. No entanto, diante dos estímulos, a síntese de proteínas pode exceder a degradação, levando ao aumento do volume proteico da célula.



Pesquise mais

O turnover é a renovação da proteína corporal, integrando os processos de síntese e degradação proteica. A síntese proteica é regulada de acordo com a necessidade do corpo, em virtude das circunstâncias metabólicas. Para entender o assunto a respeito da síntese de proteínas musculares você pode consultar o material: Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no turnover proteico: deposição e degradação de proteína muscular de autoria de CABRAL, C.H.A.; ALMEIDA, D. M. de; MARTINS, L.S; MENDES, R.K.V. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15, 2012. Disponível em: http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20agrarias/Mecanismos.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2015.



Exemplificando

Nos exercícios de musculação, há um aumento da síntese de proteínas miofibrilares como a actina e miosina. Para que isso aconteça, esportistas e outras pessoas que possuem interesse em aumentar a massa muscular, fazem a suplementação proteica na dieta consumindo proteína exógena. Todos esses aspectos trabalham a massa muscular dando resultados aparentemente benéficos, no entanto, tem toda uma retenção proteica no organismo que precisa de acompanhamento médico e nutricional para que não sobrecarreque órgãos vitais como os rins e fígado.

Sem medo de errar



Atenção!

A síntese proteica muscular é um processo complexo e fundamental, pois envolve a capacidade de captação de aminoácidos por parte dos diferentes músculos, promovendo a manutenção e/ou o crescimento de células musculares. Sua importância no envelhecimento, processos patológicos e hipertrofia muscular são assuntos relevantes nos últimos

anos. Leia o artigo sobre: síntese proteica muscular e a influência da suplementação de ômega 3: aspectos atuais. Disponível em: http://www.univates.br/revistas/index.php/destaques/article/viewFile/1018/616>. Acesso em: 2 dez. 2015.



Lembre-se

O músculo esquelético é importante, pois corresponde a cerca de 50% do conteúdo de proteínas corporais, funcionando como uma estrutura de contenção e sustentação. Esse tecido é o principal componente dinâmico do corpo humano e possibilita os variados movimentos. Em se tratando de metabolismo da glicose, o músculo serve de reservatório de glicogênio realizando a oxidação de ácidos graxos e síntese de proteínas.

A médica de Alice percebeu em consulta que sua ansiedade é considerada tóxica e até crônica, já que alguns anos atrás ela teve bulimia e relatou ser dependente da realização de exercícios físicos, principalmente a musculação. O exagero em torno de suas atividades diárias torna sua rotina mais cansativa, fazendo com que o que poderia ser uma atividade prazerosa, se tornar em algo obrigatório e estressante.

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha em mente todas as fases do processo de síntese de proteínas, desde a constituição do material genético até a produção de proteínas pela fase de tradução.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois as compare com as de seus colegas.

"Síntese de proteínas e dieta"			
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.		

2. Objetivos de aprendizagem	Entender o conceito e como acontecem as etapas envolvidas na síntese de proteínas.			
3. Conteúdos relacionados	Conceitos e fundamentos da síntese proteica.			
4. Descrição da SP	Alice ficou assustada e até preocupada com o que pode ter ocasionado o câncer de pele e como seu organismo está reagindo diante dessas alterações patológicas. Depois de detectar alterações em pintas na pele de Alice em uma consulta, a médica dermatologista buscou entender o que poderia estar desencadeando essa busca incessante pela beleza. Na última consulta, Alice resolveu se abrir com a médica e lhe dizer que esse efeito da ansiedade já havia lhe preocupado outras vezes quando teve bulimia. Nada realmente lhe deixava satisfeita, e aí o problema era de ordem psicológica. Também disse à médica que não passava um dia sem ir para a academia, ficando de 2 a 3 horas fazendo exercícios físicos. Esse fato também mostrava que Alice se preocupava muito com sua aparência física, sem, no entanto, atentar-se às desordens psicológicas que poderiam estar envolvidas em situações como essa. O uso de suplementos alimentares na dieta, incluindo proteína em excesso fez com que Alice preocupasse sua médica, já que havia 2 anos que ela ingeria proteínas diariamente, em excesso. A médica se preocupou com os rins e solicitou diferentes exames de sangue, incluindo exame de urina e dosagens de creatinina e ureia.			
5. Resolução da SP:	A realização de exames periódicos constatou alterações nos exames de sangue e urina com relação à filtração glomerular ou clearence renal, mostrando um excesso de creatinina de creatinina na ureia. A presença de creatinina mostra que os rins de Alice não estão dando conta de filtrar as proteínas que ela está ingerindo em excesso, levando a um acúmulo em seu organismo.			



Faça você mesmo

As alterações evidenciadas nos exames de Alice demostram que os rins não estão com o funcionamento normal. A estimativa da filtração glomerular é usada para diagnosticar se existem lesões renais iniciais, monitorando o estado de funcionamento dos rins. É obtida por um cálculo a partir do resultado da dosagem de creatinina. A dosagem de creatinina juntamente com a ureia ajuda na avaliação do estado dos rins. Em que outras patologias esses exames podem ser solicitados? Esses exames também monitoram pacientes com doença renal, diabetes e hipertensão arterial, as quais podem levar à lesão renal.

Faça valer a pena!

- **1.** A síntese proteica é um processo que acontece no interior de todas as células do organismo, sendo até certo ponto bastante complexo. Este processo tem duas fases que são:
- a) Replicação e Duplicação.
- b) Transcrição e Tradução.
- c) Duplicação e Tradução.
- d) Informação e Tradução.
- e) Replicação e Divisão.

de uma molécula contidas numa mo	acontece no núcleo das células e consiste na síntese de, a partir das informações écula original de DNA. O processo de síntese proteica a ação da enzima, que atua na
De acordo com a a	firmativa acima, qual a alternativa correta?
a) Tradução, RNA r	nensageiro, helicase, RNA.
b) Transcrição, RN	A ribossômico, DNA polimerase, RNA.
c) Replicação, RNA	transportador, DNA polimerase, DNA.
d) Transcrição, RNA	A ribossômico, RNA polimerase, RNA.

3. Os ribossomo	os possuem as	subunidades	40S e	60S	com	formas
irregulares, porér	n se encaixam	de tal forma q	ue "sob	ra" ur	ma fei	nda por
onde passa o		, quando	o o ribos	ssomo	o se m	nove no
processo de	e por	onde se forma	a a			

Assinale a afirmativa que preenche corretamente os espaços.

a) RNA ribossômico, transcrição, cadeia polipeptídica.

e) Transcrição, RNA mensageiro, DNA polimerase, DNA.

- b) RNA mensageiro, tradução, cadeia polipeptídica.
- c) RNA transportador, duplicação, cadeia polipeptídica.
- d) RNA ribossômico, transcrição, cadeia oligopeptídica.
- e) RNA mensageiro, replicação cadeia oligopeptídica.

Seção 2.3

Conceitos e funções das técnicas de análise de proteínas

Diálogo aberto

Alice é vaidosa e se importa muito com sua aparência, fazendo regimes, exercícios físicos e adquirindo produtos de beleza. Outro costume de Alice é estar sempre bronzeada; mesmo em dias mais frios ela gosta de ir à praia ou piscina, ficando muito tempo exposta ao sol e aos raios ultravioletas e recorrendo muitas vezes ao bronzeamento artificial. Realmente Alice chama a atenção e se destaca por sua beleza, no entanto precisa saber se toda essa vaidade não pode acabar lhe fazendo mal quando se trata de exageros e excessiva preocupação com o culto pela beleza. Diferentes sintomas apresentados por Alice mostram que já há tempos sofre de uma ansiedade crônica, que acaba causando diferentes patologias como bulimia, insatisfação com sua aparência física, descontentamento e depressão. Desta forma, a médica que cuidou de seu câncer de pele, diagnosticou que o principal tratamento daqui em diante para Alice, seria o de natureza psicológica. Dessa maneira, Alice aceitou realizar uma consulta com um psiquiatra, conhecido como Dr. Hugo. Ele trabalha muito bem com a medicação para ansiedade e depressão, assim como também com psicoterapia. Muitas vezes, somente a medicação nesses casos não resolve, é necessário que se trabalhe também com a terapia, pois o cérebro apresenta uma plasticidade neuronal que leva certo tempo para que se consiga obter os resultados esperados.

Vamos trabalhar e entender os conceitos e funções das técnicas de análise de proteínas para aplicar essas técnicas no estudo de proteínas envolvidas com diferentes patologias, incluindo as alterações na síntese de diferentes neurotransmissores cerebrais produzidos no sistema nervoso central. Sabe-se que existem neurotransmissores de origem polipeptídica que atuam nas funções de células neuronais. Os neuropeptídios são neurotransmissores responsáveis por mediar respostas sensoriais e emocionais: como a fome, a sede, o desejo sexual, o prazer e a dor.

Não pode faltar

A serotonina é um neurotransmissor com variadas funções no organismo. Apresenta significativa ação no humor, memória, aprendizado, alimentação, desejo sexual e sono reparador. A falta desse neurotransmissor leva a transtornos depressivos, alimentares, sexuais e do sono. Para que o neurotransmissor seja produzido, é importante o consumo de triptofano, o aminoácido precursor da serotonina. Lembrese de que toda proteína é a reunião de diferentes aminoácidos. Ainda a rotina de 6 a 8 horas de sono por dia e a realização de exercícios regulares favorecem a fabricação desse neurotransmissor presente no nosso organismo humano.

Sabemos que vários aminoácidos exercem efeito inibitórios e excitatórios em nosso sistema nervoso. Por exemplo, o neurotransmissor inibitório GABA é fabricado a partir do aminoácido glutamato, que está presente em várias sinapses nervosas, exercendo efeitos calmantes como as drogas ansiolíticas. Esses medicamentos e/ou o neurotransmissor natural GABA atuam na célula nervosa, bloqueando a ansiedade e acalmando a pessoa. A ação farmacológica de ansiolíticos acontece em células nervosas (neurônios), inibindo canais de cloro presentes na membrana dessas células. Com o bloqueio da entrada dos íons cloro, a estimulação da ansiedade diminui e a pessoa se acalma. Outra substância derivada de um aminoácido conhecido como triptofano é o neurotransmissor serotonina. A serotonina atua na ansiedade e depressão. trabalhando na recaptação da serotonina, fazendo com que essa substância fique mais tempo disponível na fenda sináptica, regulando os níveis de humor, medo, ansiedade e outros fatores que podem trazer sintomas desagradáveis para a pessoa. Os receptores de serotonina aparecem por todo o organismo, no qual muitos deles estão distribuídos por todo o sistema límbico cerebral, com grande afinidade por drogas antidepressivas. Como a participação dos aminoácidos são essenciais na formação de polipeptídios, a falta deles pode ocasionar diferentes patologias, incluindo as doenças do sistema nervoso central.

A purificação de proteínas envolve uma série de processos que têm em vista o isolamento de um único tipo de proteína que vem de uma mistura complexa de aminoácidos. A purificação de proteínas é de grande importância para a caracterização da função, estrutura e interação das proteínas de interesse. Os diferentes passos do processo de purificação de uma proteína devem separar partes proteicas e não proteicas da mistura polipeptídica, e finalmente isolar a proteína desejada, ou seja, aquela envolvida na ansiedade, depressão, bulimia, dentre outras doenças. Por exemplo, na patologia da esclerose múltipla sabe-se que há o aumento da quantidade de uma substância proteica conhecida como beta-amiloide, que ao se concentrar na membrana plasmática da célula neuronal, impede que os impulsos nervosos aconteçam de modo rápido e eficiente, determinando assim os episódios de dificuldade de movimentos musculares, sejam aqueles envolvidos no andar, falar, deglutir, respirar. Assim, a separação ou purificação de uma proteína é um aspecto

valioso nesse tipo de estudo. Os passos de purificação e separação dos componentes de natureza proteica exploram as diferenças no tamanho da proteína, em suas propriedades físico-químicas e na afinidade de ligação que apresentam. Esses aspectos estão envolvidos em métodos de separação proteica como cromatografias, *Southern, Western e Northern Blotting*. As proteínas são purificadas por diferentes processos de fracionamento; observando-se suas características como: solubilidade, polaridade, massa molecular, cargas iônicas e sítios de ligação para moléculas específicas. Dentre as técnicas de purificação para então haver a caracterização de proteínas, está envolvida a **cromatografia**, que é uma técnica quantitativa com a finalidade de identificar as substâncias presentes em determinados tecidos. A técnica de cromatografia usa propriedades como: solubilidade, tamanho e massa da substância, trabalhando por meio de fases: uma **estacionária** (fixa) e outra **móvel**

A Cromatografia de Líquidos ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) é conhecida como um método analítico que separa as diferentes espécies químicas presentes em determinada amostra. A separação acontece por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas presentes na amostra, apresentando duas fases: uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária refere-se a uma coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro composto normalmente de aço ou vidro, no qual em seu interior se encontra um material formado por pequenas partículas. A fase móvel ou conhecida como solvente flui através do sistema, arrastando a amostra injetada pela coluna e pelo detector. As substâncias que estão presentes na amostra possuem diferentes estruturas moleculares e grupos funcionais, desta forma a afinidade com relação às fases móvel e estacionária e ainda suas velocidades de migração serão iqualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Pode-se verificar que a substância que eluir em primeiro lugar será a de menor "afinidade" com o enchimento (fase estacionária) e em oposição à substância de maior "afinidade" com a coluna, é aquela que eluir por último. Assim, a Cromatografia de Líquidos separa espécies químicas de acordo com suas funcões moleculares. Pode-se afirmar que é um método utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes tipos de produtos.



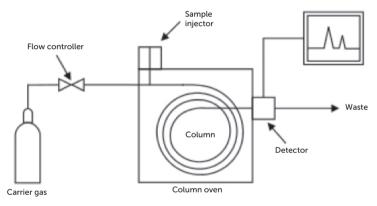
Assimile

A coluna cromatográfica é o processo de separação de substâncias que compõem uma determinada amostra, sendo o constituinte mais importante de um sistema cromatográfico. A escolha de uma coluna depende de diferentes fatores, que elucidam alguns pontos que normalmente ajudam as pessoas que trabalham com cromatografia a entender esse processo químico. Leia o artigo sobre *Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)* de autoria de Rafael Berbert Chust, Cromatografia de Líquidos, Boletim SPQ 39, 1990.

Disponível em: http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/ article/3000458/pdf>. Acesso em: 12 dez. 2015.

Ainda o método de arraste a vapor contido na cromatografia consiste primeiramente na introdução da amostra em uma corrente de gás inerte, normalmente hidrogênio, hélio, nitrogênio ou argônio, que devem atuar como gás de arrastre. As amostras líquidas vaporizam-se antes da injeção no gás de arrastre. O fluxo de gás passa por uma "coluna empacotada" através da qual os componentes da amostra se deslocam em velocidades influenciadas pelo grau de interação de cada componente da amostra com a fase estacionária não volátil (que não evapora). As substâncias que têm a maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, portanto, separadas daquelas de menor interação. À medida que as substâncias eluem da coluna, podem ser quantificadas por um detector e/ou tomadas para outra análise.

Figura 2.9 | Figura ilustrativa do esquema de um cromatógrafo gasoso



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_gasosa#/media/File:Gas_chromatograph-vector.svg. Acesso em: 11 dez. 2015.

<u>Eletroforese</u>: é uma técnica na qual sua separação é com base na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico. Não é utilizada para purificar grandes quantidades de proteínas porque afetam sua estrutura e a função. As vantagens dessa técnica é que é um método analítico, sendo útil tanto para separar quanto visualizar as proteínas. Ainda com essa técnica estima-se rapidamente o número de diferentes proteínas presentes em determinada amostra ou o grau de pureza apresentado. Permite ainda a determinação do ponto isoelétrico e da massa molecular aproximada.

<u>Purificação de proteínas por eletroforese</u>: a separação de proteínas pelo método de eletroforese está baseada na diferença de carga elétrica apresentada pela proteína. Através de ensaios de eletroforese pode haver a separação de proteínas por tamanho ou mesmo por diferenças de cargas elétricas. Através da eletroforese de proteínas são montados géis de poliacrilamida, na qual a migração é afetada pela massa-carga

e forma da referida proteína que está sendo estudada. A eletroforese, zimografia e o método de *Western Blotting/Immuno Blotting* possuem o princípio físico-químico relacionado à capacidade de moléculas carregadas migrarem sob influência de um campo elétrico. A referida migração segue uma lei, conhecida como "Lei de Coulomb", na qual determinadas partículas de carga negativa migram para o polo positivo (anodo) e aquelas de carga positiva migram para o polo negativo (catodo).

Em uma amostra submetida à técnica de eletroforese, cada molécula que se encontra em determinada zona do gel de eletroforese terá moléculas com menor volume molecular migrando mais rapidamente, e aquelas que possuem maior volume molecular devem migrar mais lentamente. O objetivo da técnica de eletroforese é separar moléculas orgânicas, como no caso do DNA, RNA e proteínas, de acordo com sua carga elétrica e volume molecular.

São diferentes técnicas de eletroforese que podemos conhecer, cada uma com sua particularidade como: A-Eletroforese livre; B-Eletroforese com suporte; C-Eletroforese em gel de agarose; D-Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE1); E-Eletroforese nativa atualmente; F-Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE); G-Eletroforese capilar.

A zimografia é um método sensível para medida da atividade enzimática após uma separação eletroforética. O princípio físico-químico da eletroforese torna possível a separação das proteínas, e a esperada caracterização da atividade enzimática é determinada pela degradação do substrato. Esse método é usado na determinação de enzimas que degradam a matriz extracelular, em especial, metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) nas periodontites por exemplo.

A técnica que identifica uma determinada sequência de DNA a partir de sua transferência para uma membrana envolvendo sondas específicas ficou conhecida como *Southern blot*. Em seguida, outra técnica de transferência em membrana, que verifica a expressão de RNAm foi estudada e caracterizada como *Northern blot*. A técnica caracterizada pela transferência de um extrato proteico para uma membrana, comumente de nitrocelulose ficou conhecida como *Western blotting*. Quando por sua vez a transferência é feita para a membrana, as proteínas são identificadas com anticorpos específicos, e são conhecidas como conhecidas como *Immuno Blot*. Hoje, utiliza-se o termo *Western blotting* como sinônimo de *Immuno blotting*.

Para a quantificação proteica usam-se os métodos espectrofotométricos, que por sua vez visualizam comprimentos de onda na região da luz ultravioleta (visível) através de métodos colorimétricos ou colorimetria. A colorimetria é uma técnica que avalia o quanto os solutos absorverem a luz em comprimentos de onda específicos. Assim a medida da luz absorvida interfere sobre a concentração de soluto em uma determinada amostra ou material biológico que está sendo analisado.



Pesquise mais

Para entender os procedimentos experimentais que trabalham com a separação e determinação de uma proteína específica, leia o material "Série em Biologia Celular e Molecular Métodos Experimentais no estudo de Proteínas" de autoria de: MORAES, C. da S. et al. O nome da obra: Série em biologia celular e molecular: métodos experimentais no estudo de proteínas, 2013. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1.pdf>. Acesso em: 9 maio 2016.

Aplicações das proteínas recombinantes: Muitos produtos que consumimos hoje em dia, como medicamentos e diversos alimentos, são compostos por proteínas que são "programadas" para serem eficientes, nutritivas e capazes de provocar menos reacões adversas. A essas proteínas, damos o nome de proteínas recombinantes, que são aquelas produzidas por outros organismos diferentes daqueles que a produzem. O grande problema nesse assunto é que existem riscos quando se produz grandes quantidades desse tipo de proteínas. Normalmente são usadas bactérias e leveduras para a produção de proteínas recombinantes. Este fato se deve à característica da rápida reprodução, proliferação e crescimento dos micro-organismos, que são muito superiores às células de mamíferos. No entanto, podem acontecer alterações químicas em sua estrutura proteica, fazendo com que nosso organismo não reconheca essas proteínas. Quando falamos de proteínas de função terapêutica como a insulina e outros fatores de crescimento e marcadores de doenças, o risco aumenta, pois o reconhecimento da proteína recombinante e a sua versão original deve ser a maior possível. Quando isso não acontece, pode haver o agravo do quadro da doença e levar o paciente à morte.

Ainda o reconhecimento por parte de nosso sistema imunológico com relação à determinada proteína recombinante, confeccionada em micro-organismos, pode levar a uma resposta alérgica. No entanto, se a proteína recombinante não estiver estruturalmente correta, ela pode perder sua função ou sua atividade enzimática, não agindo nos processos metabólicos vitais do organismo. Essas situações representam um grande risco à saúde humana, pois o organismo ou se torna "intoxicado" ou simplesmente não consegue funcionar de maneira adequada. Por isso, destaca-se a importância da produção de proteínas recombinantes em cultura de células de mamíferos, evitando-se diferentes interferências que podem prejudicar a saúde humana.

As culturas de células obtidas de mamíferos crescem em taxas inferiores à taxa de crescimento de micro-organismos, sendo mais sensíveis às alterações nutricionais e condições ambientais como temperatura e pH. A expressão dessas proteínas recombinantes em culturas de células de mamíferos é feita através de vetores de DNA, que contêm o gene que codifica a proteína de interesse. Assim os vetores são

carreadores que levam uma determinada sequência específica de DNA, que é de grande importância para que se codifique determinada proteína de interesse.

Vetores de expressão e Sistemas de expressão de proteínas in vitro: os vetores de expressão são aqueles vetores usados em casos de clonagem, e possuem os constituintes genéticos que permitem a expressão de proteínas recombinantes. Os tipos mais utilizados em pesquisas são aqueles que utilizam os vetores obtidos de bactérias, devido à facilidade na manipulação de culturas bacterianas. No entanto, as bactérias não possuem a propriedade de processar o RNA mensageiro (RNAm) de seres eucariotos e, neste caso, os insertos que serão utilizados, devem ser derivados de bibliotecas de um DNA complementar (cDNA).

Os vetores de expressão que são utilizados quando se busca determinar uma sequência de proteína de interesse, precisam ser clonados no sítio múltiplo, o qual deverá ser inserido na região promotora do gene.

Quais seriam as desvantagens do uso de vetores de expressão para determinar o isolamento de um determinado gene de interesse? A grande "lacuna", ou a questão neste caso, relaciona-se ao desconhecimento da sequência do inserto. Para que haja a expressão de uma determinada proteína, o inserto deve se ligar ao vetor de forma que a fase de leitura correta seja reconhecida por toda maquinaria celular. Se isso não acontecer, outras novas proteínas serão formadas e, portanto, a sequência que realmente interessa não será detectada, mesmo que ela esteja presente em um determinado clone



Reflita

Você poderia imaginar que o DNA poderia trabalhar no sentido de expressar proteínas tóxicas? Um problema frequente é a expressão de proteínas recombinantes que podem ser tóxicas para o sistema hospedeiro, local onde ela está sendo expressa. No entanto, podemos adotar métodos estratégicos que contornem esse problema, determinando qual a possível solução que mais se adequa para determinada proteína. Todos esses aspectos estão baseados em outras pesquisas, em artigos já publicados sobre esse assunto, buscando sempre um alvo ou um vértice que ainda esteja em aberto, para retomar a investigação científica.

Todo o processo do "inserto" refere-se à introdução de um DNA exógeno em uma célula hospedeira. Esse processo foi inicialmente desenvolvido em células bacterianas e depois adaptado às células de outros organismos, como leveduras, fungos, células vegetais e por fim células de mamíferos.

A transferência de material genético para as referidas células bacterianas acontece através de três processos: transdução, conjugação e transformação.

1-Atransdução é a fase da obtenção do material genético pela ação de bacteriófagos. Para isso, o fago deve infectar e realizar o ciclo lítico. Durante a replicação do fago, ocorre a aquisição do material genético da célula infectada, também chamada de célula doadora. A troca de material genético acontece quando a partícula viral infecta a célula receptora e nela introduz o DNA bacteriano da célula doadora.



Exemplificando

As aplicações práticas da técnica do DNA recombinante na pesquisa biológica trabalham desde a curiosidade humana sobre a vida até o controle e de doenças humanas, de animais e plantas, pensando sempre na melhoria da qualidade de vida. Ainda existem muitos outros limites na aplicação prática da engenharia genética, no entanto, é grande o interesse de profissionais e pesquisadores no entendimento dessa tecnologia altamente promissora para a solução e prevenção de diversas patologias.

- 2 A conjugação acontece quando o material genético é transferido de uma célula doadora para outra receptora. Para que o material genético seja transferido de uma célula a outra, é necessário um contato entre as células por meio de "junções". Com os conhecimentos da Biotecnologia, para que aconteça a realização da conjugação, torna-se necessária a presença de plasmídeos que possibilitem a junção célula a célula. Se o plasmídeo de interesse não possuir essas funções, pode-se introduzir na mesma célula outro plasmídeo que contenha as funções de conjugação.
- 3 Já a transformação é o processo natural no qual o DNA exógeno obtido após a lise celular é capturado por outra célula a célula receptora. A célula que deve receber um DNA exógeno é conhecida como célula competente. A competência refere-se à presença de receptores de membrana na superfície das células doadoras, os quais se ligam ao DNA exógeno aproximando-o da superfície celular. Esse material é internalizado e incorporado ao genoma da célula receptora.

Toda a eficiência da transformação depende de vários fatores, como: o estado fisiológico das células, os componentes que estão na cultura destas bactérias (tanto Gram-positivas como Gram-negativas) e as características genéticas da espécie em questão.

Após a etapa da transformação, muitos outros procedimentos requerem uma alta quantidade de DNA. Assim, os clones podem ser submetidos a processos que permitam que o DNA recombinante seja amplificado.



Pesquise mais

A amplificação do DNA recombinante produz uma quantidade maior do DNA quimérico ou híbrido, um pré-requisito para muitos procedimentos de Biologia Molecular. Além disso, esse procedimento tem a vantagem de estar envolvido em um sistema que verifique a sequência de DNA após a sua replicação na célula hospedeira. Assim, a possibilidade de mutação é menor do que quando a amplificação se realiza por outras técnicas. Para entender o assunto a respeito do DNA recombinante, você pode consultar o material: "A engenharia genética" de autoria de José Alberto Neves Candeias. Revista de Saúde Pública, v. 25, n. 1, 1991. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101991000100002>. Acesso em: 12 dez. 2015.



Faça você mesmo

A técnica de DNA recombinante envolve grandes vantagens tecnológicas e terapêuticas. No entanto, o que mais preocupa os pesquisadores são as possibilidades de mutação, ou seja, ao reestruturar ou reorganizar uma cadeia genética, pode-se correr o risco de gerar diferentes mutações. Genes que não se adequam ao organismo hospedeiro e que ao invés de curar ou favorecer o esclarecimento de situações ainda desconhecidas, desencadeiam no objeto de estudo outras alterações genéticas, também desconhecidas. Nesse sentido, pesquise e traga informações para a sala de aula em que a técnica do DNA recombinante trouxe erros ao invés de soluções para a genética.



Vocabulário

GABA = é um ácido aminobutírico em que o grupo amina está na extremidade da cadeia carbônica. É o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central de mamíferos. Sua função está na regulação da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso.

DNA quimérico = é o DNA recombinante no qual os fragmentos de DNA isolados a partir de diferentes fontes biológicas trabalham com métodos de produção de híbrido (ou quiméricos), tais como organismos selecionados geneticamente e engenharia de embriões.

Ao final, sabe-se que o DNA quimérico modificado em um determinado hospedeiro, é capaz de se replicar. Isso acontece, pois os vetores usados para clonagem se originam a partir da replicação autônoma. A obtenção de uma maior quantidade de DNA recombinante acontece após diversos ciclos de divisão da célula hospedeira. A cultura em que essas bactérias se encontram deverá conter milhões de cópias do material inserido em um determinado clone. Esse processo é uma maneira de amplificação do DNA híbrido.

Sem medo de errar



Atenção!

A terapia gênica é o tratamento baseado na introdução de genes com uso de técnicas de DNA recombinante. Embora essa técnica esteja em estágio experimental, existem variados progressos recentes que indicam oportunidades crescentes na ciência, indústria farmacêutica, medicina, fazendo com que essa tecnologia esteja cada vez mais ao nosso alcance. Leia o artigo que se discute a terapia gênica. Disponível em: http://ch.nttp://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300004>. Acesso em: 12 dez. 2015.

A médica dermatologista que cuidou do câncer de pele de Alice diagnosticou uma ansiedade que não era normal, passando a ser tóxica para o organismo de Alice. Em consulta realizada com o psiquiatra Dr. Hugo, foi determinado que Alice deveria tratar tanto a ansiedade quanto a depressão através de medicação e terapias; o Dr. explicou que provavelmente o estresse diminuiu muito os estoques de serotonina que Alice tinha, sendo necessário o uso de medicamentos que trabalhasse a plasticidade neuronal, fazendo com que as emoções e ansiedade fossem reestruturadas. Desta forma, de uma maneira controlada, Alice iria reorganizar sua rotina, sem exageros e diminuindo os riscos de trazer novos problemas para sua saúde. Toda a ansiedade, bulimia e a busca de um corpo perfeito transformaram Alice em uma pessoa refém de seu próprio desequilíbrio mental. A maioria das doenças físicas tem um fundo de origem psicológica, e este é o caso de Alice.



Lembre-se

A medicina moderna investe no diagnóstico precoce e tratamento de doenças complexas cujas causas primárias ainda não são conhecidas e para aquelas ainda sem cura. Em muitos casos, hoje já é possível planejar uma intervenção através da terapia gênica, visando reduzir ou evitar a progressão da doença. A intervenção pode ser baseada no conhecimento

de suscetibilidade genética ou na oportunidade de alterar mecanismos fisiológicos das células, órgãos ou sistemas envolvidos nas doenças.

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha em mente os conceitos e funções das técnicas de análise de proteínas, DNA recombinante, assim como também o uso dessa tecnologia no tratamento e prevenção de doenças.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois as compare com a de seus colegas.

"Prevenção e tratamento de doenças"				
1. Competência geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.			
2. Objetivos de aprendizagem	Entender o conceito e como acontecem as etapas envolvidas na síntese de proteínas.			
3. Conteúdos relacionados	Conceitos e funções das técnicas de análise de proteínas.			
4. Descrição da SP	Diferentes sintomas apresentados por Alice mostram que há tempos ela sofre de uma ansiedade crónica, que acaba causando diferentes patologias como bulimia, insatisfação com sua aparência física, descontentamento e depressão. Desta forma, o Dr. Hugo diagnosticou ansiedade e depressão e receitou medicação e terapia para esses sintomas. Durante a consulta, ele realizou alguns exames em Alice e verificou que sua pressão arterial estava alta, muito provavelmente devido à ansiedade e estresse em que ela se encontrava. Além disso, o Dr. Hugo pediu a ela que procurasse um cardiologista após sentir-se melhor e mais confiante com a medicação e terapia recomendada.			
5. Resolução da SP:	A realização de exames mostrou que Alice apresenta picos de pressão arterial, principalmente quando está em situação de estresse. Seu medo, sua ansiedade fazem sua pressão arterial subir e depois quando está em casa, em uma situação mais confortável, sua pressão normaliza. Necessitase, desta forma, acompanhar o efeito da medicação contra ansiedade e depressão em Alice, recomendando a prática de exercícios físicos que irá tanto ajudá-la na depressão quanto na regularização da pressão arterial. Se houver necessidade, deve-se usar um anti-hipertensivo fraco e realizar medições sucessivas de pressão arterial com a finalidade de controlar esses picos de pressão mais alta.			



Faça você mesmo

As alterações evidenciadas nos exames de Alice demostram que a pressão arterial está alta no momento em que está sob estresse. Como você faria para explicar para Alice que todo esse processo psicológico afetou sua saúde? Liste os eventos que trouxeram essas alterações e a possível explicação fisiológica e farmacológica desde o momento em que teve bulimia, câncer de pele até agora em que seu problema de ordem psicológica foi diagnosticado.

Faça valer a pena!

- **1.** Os neurotransmissores são substâncias que regulam a atividade do sistema nervoso central, ora estimulando, ora inibindo suas atividades, de acordo com a necessidade do organismo. Neurotransmissores, como o GABA e serotonina, agem com atividades fisiológicas que atuam respectivamente:
- a) Bloqueando e estimulando substâncias.
- b) Inibindo e recaptando substâncias.
- c) Inibindo em ambas as situações as substâncias.
- d) Bloqueando em ambas as situações as substâncias.
- e) Estimulando e recaptando substâncias.
- **2.** A separação ou purificação de uma proteína é um aspecto valioso no estudo de diferentes patologias. Os passos de purificação e separação dos componentes de natureza proteica exploram as diferenças no tamanho da proteína, em suas propriedades físico-químicas e na afinidade de ligação que apresentam. Sabe-se, desta forma, que serão estudadas características como:
- a) Conteúdo nuclear e proteico, tamanho de organelas celulares, diâmetro nuclear.
- b) Conteúdo citoplasmático e proteico, tamanho e constituição de organelas celulares, diâmetro nuclear.
- c) Características como diâmetro de poros nucleares, massa molecular, sítios de ligação, polaridade.

- d) Características de massa molecular, tamanho de ânions e cátions, sítios de ligação, constituintes da membrana plasmática.
- e) Características como solubilidade, polaridade, massa molecular, cargas iônicas e sítios de ligação.
- **3.** Dentre as técnicas de purificação para acontecer a caracterização de proteínas, temos a cromatografia, que é uma técnica quantitativa com a finalidade de identificar as substâncias presentes em determinados tecidos. A técnica de cromatografia usa propriedades que trabalham com solubilidade, tamanho e massa da substância, trabalhando através de fases conhecidas como:
- a) Primária e secundária.
- b) Estática e maleável.
- c) Estacionária e móvel.
- d) Fisiológica e metabólica.
- e) Forte e fraca.

Seção 2.4

Técnicas de análise para detecção de ácidos nucleicos

Diálogo aberto

Alice é vaidosa e se importa muito com sua aparência, fazendo regimes, exercícios físicos e adquirindo produtos de beleza. Outro costume de Alice é estar sempre bronzeada; mesmo em dias mais frios, ela gosta de ir à praia ou piscina, ficando muito tempo exposta ao sol, recorrendo muitas vezes ao bronzeamento artificial. No entanto, Alice precisa saber que a vaidade não pode afetar sua saúde, quando se trata de exageros e excessiva preocupação com o culto pela beleza. Depois de certo tempo, já medicada pelo transtorno da ansiedade, ataques de pânico e depressão, Alice se sentia bem. No entanto, ainda tinha de vez em quando, certos episódios de crises de ansiedade de uma hora para outra, e isso a deixava assustada. Toda vez que esse episódio voltava a acontecer, o que era para ser sanado, aparecia com maior intensidade e esse fato deixava Alice muito triste. Dr. Hugo, no entanto, lhe explicou que por mais que a medicação já estivesse fazendo efeito em seu organismo, havia toda uma rede neuronal que precisava de um tempo maior para restabelecer as conexões, conhecida cientificamente como "plasticidade neuronal". Ele receitou para Alice 15 sessões de psicoterapia, com retorno no próximo mês, caso não tivesse nenhum problema maior durante esse tratamento. Ainda solicitou exames de tireoide para saber sobre o funcionamento da glândula, pois este pode interferir em doenças de ordem psicológica.

Vamos entender as técnicas de coloração não radioativas que ajudam na detecção de ácidos nucleicos, envolvendo histologia, cultura de células, histoquímica, anticorpos monoclonais, métodos muito utilizados em laboratórios e também na pesquisa a fim de detectar e prevenir doenças genéticas e moleculares.

Não pode faltar

A plasticidade neuronal ou neuroplasticidade acontece quando o sistema nervoso é capaz de se moldar estrutural e funcionalmente, adaptando-se ao longo do desenvolvimento neuronal, estando exposto a novas experiências. Desta forma, é muito bom saber que os circuitos neuronais são "maleáveis" e mostram participação na

formação de memórias e aprendizagem, bem como na adaptação de eventuais lesões e processos traumáticos que acontecem ao longo da vida adulta. Como sabemos, os neurônios estão conectados pelas sinapses que podem ser: excitatórias, inibitórias, químicas e elétricas, e que por sua vez mostram uma variedade de características e funcões que atuam nas transmissões sinápticas, liberando neurotransmissores. Na depressão, doenca na qual o circuito neuronal apresenta alterações funcionais e anatômicas, faz com que o desgaste emocional, físico, e aquele advindo do ambiente, possam alterar toda essa conexão cerebral desencadeando transtornos de ansiedade e depressão. Cada circuito neuronal possui uma especificidade particular, que deve interagir com outros circuitos, permitindo uma funcionalidade dinâmica e fisiológica. O sincronismo entre os diferentes neurônios dentro do circuito funcional permite que determinada resposta ou função cerebral leve a uma remodelação e rearranjo da atividade neuronal associada. A plasticidade de circuitos pode ser considerada, então, como a mudanca na atividade de milhares de neurônios e nas suas relações dentro de um circuito, sendo que toda essa interligação é feita com outros vários neurocircuitos. Como exemplo, podemos citar a neurogênese em adultos e a plasticidade na região do córtex cerebral.

Microscopia de fluorescência: na microscopia de fluorescência, as substâncias são irradiadas por luz em determinado comprimento de onda. Nessa técnica, há a emissão de luz na qual as seções de tecidos são irradiadas com luz ultravioleta que, por sua vez, emitem luz na porção visível de espectro, fazendo com que as substancias que estão sendo estudadas apareçam brilhantes, sendo conhecidas como "substâncias fluorescentes". O microscópio que usamos nessa técnica possui uma fonte de luz ultravioleta intensa e filtros especiais que selecionam o comprimento de onda dos raios luminosos que atingem o objeto em estudo e também dos raios que são emitidos por ele. As substâncias fluorescentes que possuem afinidade por moléculas presentes nas células ou na chamada matriz extracelular, usam-se corantes fluorescentes. O complexo DNA e RNA pode se ligar aos corantes como azul de toluidina (AT) e alaranjado de acridina (AO). Esses corantes interagem com moléculas que se ligam especificamente aos componentes das células e tecidos, permitindo a identificação dos variados componentes celulares através dos componentes de fluorescência que eles devem emitir.

Microscopia eletrônica de transmissão: a técnica envolve um sistema de produção de imagens com altíssima resolução, permitindo que o material em estudo seja ampliado e visualizado com detalhes. A técnica analisa somente partículas ou moléculas isoladas, mas não células e tecidos. O funcionamento dessa técnica se baseia no estudo de elétrons que são desviados por campos eletromagnéticos de modo semelhante ao desvio da luz em lentes de vidro, fenômeno normalmente conhecido por "refração". Para se observar uma imagem, os elétrons devem ser captados por um detector, ou seja, por uma placa fluorescente, como se fosse um negativo fotográfico. Como a imagem ao microscópio é produzida pela quantidade

de elétrons que chegam ao detector de elétrons que foram retidos no tubo do microscópio, a imagem resultante é obtida em preto e branco. As áreas escuras de uma micrografia eletrônica costumam ser denominadas de elétron-densas, e áreas claras de elétron-transparentes.

Microscopia eletrônica de varredura: a técnica fornece imagens tridimensionais de superfícies de células, tecidos e órgãos. Nesse microscópio, os elétrons são localizados sobre o objeto de estudo percorrendo toda a superfície, sem atravessar o material. Os elétrons são capturados por um detector e transmitidos aos amplificadores e outros componentes eletrônicos gerando um sinal. O sinal obtido gera uma imagem em preto e branco que é visualizada em um monitor, podendo ainda ser gravada ou fotografada. Os objetos das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura parecem estar iluminados com locais sombreados, trazendo de volta a ideia de uma imagem tridimensional.

Cultura de células e tecidos: culturas de células são mantidas "vivas" e podem ser adequadamente estudadas fora do corpo. A metodologia é de grande importância para o estudo isolado do efeito de moléculas sobre um determinado tipo de célula ou tecido. A cultura de células favorece ainda uma análise direta do comportamento dessas células vivas por meio de análise microscópica in vitro, ou seja, fora do corpo de um animal de laboratório. Diferentes células e tecidos são cultivados em soluções composta por sais, aminoácidos, vitaminas, glicose, dentre outros componentes compondo os meios de cultura usados em metodologias laboratoriais e científicas. Os mais conhecidos são o DMEM (Dulbecco/Voqt modificado de Eagle's - Harry Eagle) e o RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), nos quais os linfócitos humanos, por exemplo, são tradicionalmente cultivados. Esse meio possui quantidade de fosfato suficiente para o cultivo em 5% de gás carbônico (CO₂). Em contraste, as células cultivadas em DMEM devem ser cultivadas numa atmosfera de CO2 a 10%. Ainda vale salientar que os meios de cultura celulares são em sua maioria suplementados com soro. As células cultivadas são suplementadas com soro bovino a 10% ou soro fetal bovino a 10%. Pensando-se no preparo de células, sabe-se que uma vez isoladas, essas podem ser cultivadas em suspensão ou podem ser colocadas sobre uma placa de vidro, conhecida como "Placa de Petri" ou ainda sobre uma lamínula de vidro, ou seja, superfícies que favorecem a adesão e crescimento celular; essas são conhecidas como cultura de células primárias. No entanto, diferentes tipos de células isoladas de tecidos normais ou patológicos e mantidos in vitro constituem uma linhagem permanente de células. Para permitir a "imortalidade" de células normais em metodologia in vitro, são trabalhadas em uma área estéril e utilizando-se de soluções e equipamentos estéreis.



Exemplificando

A linhagem de células HeLa (obtidas de um tumor no útero humano) são consideradas células genética e morfologicamente diferentes do tecido

original, sendo capazes de se proliferar infinitamente quando em cultura celular. É um excelente modelo para se estudar alterações celulares em tumores de útero e de citotoxicidade.

Fracionamento celular: o método de fracionamento celular, organelas e outros componentes das células e tecidos podem ser purificados e isolados para posterior estudo in vitro e com o uso de microscópio. O fracionamento celular é um processo físico que trabalha a força centrífuga, tendo como finalidade a separação de organelas e componentes celulares quanto à diferenciação de seus coeficientes de sedimentação. Assim, dependendo do tamanho, forma, densidade e viscosidade do meio em que está suspensa, esses elementos são separados.

Histoquímica e citoquímica: esta técnica é muito utilizada para identificar e localizar determinadas substâncias em cortes histológicos ou em cultura de células. Vários são os procedimentos para se consequir esses dados, sendo que a maioria se baseia em reações químicas específicas ou ainda em interações de alta afinidade entre as moléculas. Esse método normalmente forma substâncias insolúveis coloridas ou elétron-densas que, por sua vez, favorecem a localização de átomos ou de moléculas através do uso da microscopia de luz ou eletrônica. Pode-se localizar: íons, ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, polissacarídeos. As **proteínas** são detectadas pelo método de imunocitoquímica. Ainda há vários métodos histoquímicos que revelam com maior ou menor especificidade proteínas como as enzimas. Esses métodos trabalham como as enzimas reagem com ligações químicas específicas. A maioria dos métodos histoenzimáticos funciona do sequinte modo: a substância marcadora que irá reagir com uma molécula insolúvel, precipita sobre o local onde está a enzima, evidenciando-a; este produto final aparece de maneira elétron-densa ou "colorida" para ser visível por microscopia eletrônica ou de luz. Ao examinar os cortes ao microscópio, é possível observar as células (ou organelas) cobertas com um material colorido ou elétron-denso. As **enzimas** comumente estudadas e detectadas são as fosfatases. amplamente encontradas no organismo. Normalmente detectam-se as fosfatases alcalinas que possuem atividade máxima em pH alcalino. Em reações de detecção de fosfatases ácidas, detectam-se organelas envolvidas na digestão de substâncias como os lisossomos, que contêm grande quantidade dessas enzimas. Ainda as enzimas conhecidas como deidrogenases exercem um papel em vários processos metabólicos. As deidrogenases ao serem incubadas com cortes de tecidos não fixados e ao receber hidrogênio, precipitam-se sob a forma de uma substância colorida insolúvel. Por exemplo, a succinato desidrogenase que é uma enzima envolvida no ciclo de Krebs, favorece a localização de mitocôndrias. A peroxidase é uma enzima que atua na oxidação de diferentes substratos e na transferência de íons de hidrogênio para peróxido de hidrogênio, produzindo ao mesmo tempo moléculas de água. O precipitado insolúvel marrom ou elétron-denso formado permite a localização da atividade enzimática em microscópios de luz e eletrônicos. É usado como método

auxiliar no diagnóstico de leucemias, nas quais pode ser evidenciado através da atividade da peroxidase em células leucêmicas. A peroxidase é uma enzima ativa que produz de modo rápido uma quantidade de precipitado insolúvel, usado para marcar outras moléculas. Um teste muito conhecido que também trabalha com a atividade da enzima peroxidase é o **teste de Elisa**. O teste de Elisa ou enzima imunoensaio fazem uso de marcadores antígenos-anticorpos, sendo a reação monitorada pela enzima peroxidase sem usar radioisótopos para detectar determinada patologia ou descartar a hipótese da mesma. Esse teste pode ser usado para determinar a quantidade de tiroxina (T4) livre, em casos de problemas com a glândula tireoide, por exemplo. Durante o ensaio, há a ligação do hormônio T4 da amostra com o conjugado T4-peroxidase do teste de Elisa, que concorre por um número de sítio de ligações do anti-T4 monoclonal na parede da cavidade da placa teste, determinando a quantidade de hormônio tiroxina do paciente.

Os **polissacarídeos** podem aparecer livres ou agrupados com proteínas e lipídios. São avaliados pelo método de (PAS) ou reação de ácido periódico-Schiff, no qual resíduos de aldeído são revelados. A revelação do método fornece uma coloração púrpura nos locais do corte em que há muitos polissacarídeos. O glicogênio é o polissacarídeo encontrado no organismo, sendo evidenciado pela reação de PAS em tecidos de fígado, músculo estriado e outros tecidos. Já os **glicosaminoglicanos** são polissacarídeos não ramificados, que contêm amino-açúcares. Quando cadeias de glicosaminoglicanos se ligam a compostos protéticos, elas constituem os proteoglicanos. Geralmente os componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo são moléculas de proteoglicanos. Os proteoglicanos possuem como componente principal da cadeia os carboidratos diferentes das glicoproteínas. Glicosaminoglicanos e glicoproteínas ácidas reagem com o corante Alcian Blue, pois seu conteúdo que contém grupos carboxila e sulfato são fortemente aniônicos. E para que se faça a revelação de lipídios em preparações, faz-se uso de corantes como Sudan IV e Sudan Black. O corante se dissolve nas gotículas de lipídios, ganhando a cor do corante, a cor escura. Ainda métodos adicionais podem ser usados para localizar o colesterol e seus ésteres de fosfolipídios e de glicolipídios. Esse tipo de coloração é muito usado para diagnosticar doenças metabólicas, onde há o acúmulo intracelular de lipídios variados.

Detecção de moléculas em cortes histológicos: interações moleculares de alta afinidade: uma molécula que aparece em uma célula ou em um corte de tecido é percebida por compostos fluorescentes que se ligam a elas. Com o auxílio de um microscópio de luz ou eletrônico, buscam-se detectar moléculas orgânicas como açúcares, proteínas e ácidos nucleicos. Os referidos marcadores são conhecidos como substância florescente, e são vistos através de um microscópio de florescência ou de laser. Ainda a enzima peroxidase é detectada pela demonstração da enzima com peróxido de hidrogênio e metais (geralmente partículas de ouro) que podem ser observados por microscopia de luz e eletrônica. Assim, compostos conhecidos como faloidina, proteína A, lectinas e anticorpos, são exemplos de compostos que interagem

especificamente com outras moléculas. Desta forma, são exemplos a faloidina que interage fortemente com a actina dos músculos, sendo geralmente marcada com substâncias fluorescentes. A proteína A é uma proteína que se liga à região Fc (região de interação com outras células e/ ou proteínas) de moléculas de imunoglobulinas, assim pode-se detectar anticorpos diversos quando a proteína A está ligada a um marcador. Ainda as lectinas, proteínas ou glicoproteínas derivadas de sementes de vegetais, ligam-se com alta afinidade e especificidade ao grupo de moléculas de carboidratos. As lectinas interagem com diversos açúcares e, portanto, se ligam a glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídios, esse tipo de marcação é muito usada para caracterizar moléculas de membranas celulares que possuem sequências específicas de açúcares.

Imunocitoquímica: esta técnica trabalha com interação específica entre uma determinada molécula e um anticorpo. Métodos que se utilizam de anticorpos marcados são eficazes para identificar proteínas e também glicoproteínas. A imunocitoquímica é a metodologia que permite identificar moléculas ou ainda células por meio da presença de anticorpos. Em uma reação de imunocitoquímica, cultura de células ou corte de tecidos que contenha determinada proteína, são incubados em uma solução que contém a presença de anticorpos que por sua vez reconhece proteínas. O anticorpo se liga de maneira específica à proteína e sua localização é visualizada por microscopia de luz ou eletrônica, dependendo do tipo do marcador que foi incubado junto ao anticorpo. A técnica da imunocitoquímica pede que o anticorpo esteja disponível para tal ligação, para que se consiga detectar proteínas, a qual deve ter sido previamente purificada e isolada de forma que anticorpos possam ser produzidos contra ela.

Anticorpos monoclonais e policlonais: os anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de um linfócito B parental, que é clonado e sempre produz os mesmos anticorpos, em resposta a um agente causador de doenças. Esses anticorpos são iquais em sua estrutura: propriedades físico-químicas e biológicas, especificidade e afinidade, tendo a propriedade de se ligar ao mesmo epítopo no determinado antígeno. Esses anticorpos são coletados do plasma do animal de laboratório e usados para imunocitoquímica. Já os anticorpos derivados de diferentes linhagens de linfócitos B, são conhecidos como anticorpos policlonais. São considerados uma mistura de moléculas de imunoglobulinas secretadas contra um único, antígeno específico, cada uma reconhecendo um epítopo diferente. No entanto, cada clone pode ser cultivado isoladamente, no qual diferentes anticorpos contra determinado antígeno podem ser coletados e separados. Cada um desses vários anticorpos constitui um único anticorpo monoclonal. Vale salientar que existem várias vantagens em se usar o anticorpo do tipo monoclonal quando comparado com um anticorpo policlonal. Os monoclonais costumam ser mais específicos, evitando que aconteçam ligações inespecíficas com outras proteínas, o que dificultaria o reconhecimento de determinada proteína. Neste caso, faz-se uso de técnicas usadas em imunocitoquímica, na qual o anticorpo contra determinada proteína está ligado a um marcador apropriado, sendo os resultados

observados em microscopia de luz ou eletrônica. Se o marcador for a enzima peroxidase, coloca-se a enzima em contato com seu substrato para ser analisado. Esses locais devem ficar fluorescentes, ou poderão ficar cobertos por um precipitado devido à presença da enzima ou partículas de ouro.

Técnicas de hibridização: as técnicas de hibridização permitem as análises das moléculas envolvidas no processo do fluxo de informação do DNA, RNA e síntese de proteínas, controlando esse fluxo. A hibridização é a técnica que envolve a ligação entre duas moléculas de cadeia única de ácidos nucleicos, que se reconhecem pela complementaridade de sua sequência de pares de bases nitrogenadas. Essa técnica permite a identificação de sequências específicas de DNA ou RNA. Quando são aplicadas as técnicas de hibridização diretamente em células e cortes de tecidos, cromossomos e esfregaços, chamamos de *hibridização in situ*. É um método usado para verificar se uma célula tem uma determinada sequência específica de DNA, definindo ou localizando um gene em um cromossomo. Ainda pode ser usado para identificar as células onde genes específicos estão sendo transcritos, sem esquecer que inicialmente o DNA é desnaturado por ação do calor ou agentes desnaturantes, que faz com que as duas cadejas se separem. Em seguida, uma solução contendo a sonda é colocada sobre a lâmina, que após lavagem, denuncia através do marcador usado onde houve a ligação da sonda com a sequência complementar do DNA. Quando se usa o DNA ou RNA purificados, a hibridização relata a separação de moléculas de DNA ou RNA por tamanho, contando ainda com a leitura da eletroforese em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida. A partir disso, o material genético é transferido para uma folha de nitrocelulose por meio de um solvente, onde finalmente os ácidos nucleicos são analisados por hibridização. A técnica que identifica o DNA é chamada de Southern blotting e quando a eletroforese é realizada com moléculas de RNA, a técnica é conhecida por Northern blotting. As técnicas de hibridização são usadas em pesquisa, diagnóstico clínico e medicina forense, pois se mostram eficazes e específicas na identificação de proteínas.



Assimile

Os problemas na interpretação de cortes histológicos podem acontecer devido às distorções e artefatos que aparecem quando se faz o processamento dos tecidos. Uma das causas que levam à distorção da imagem obtida é um tipo de retração que o fixador utilizado produz, ou ainda a ação do etanol e do calor da parafina usada para inclusão. A retração só diminui guando os tecidos são incluídos em resina.



Reflita

As várias etapas dos procedimentos na montagem da lâmina de histologia podem acabar distorcendo os tecidos, fornecendo uma imagem diferente daquela que os tecidos apresentavam quando eram vivos ou daquelas encontradas nos livros didáticos. Para diminuir esses artefatos, novas adaptações de técnicas antigas e primordiais em tecnologias são criadas como auxílio.



Pesquise mais

Para entender mais a respeito de técnicas de histologia, leia o material intitulado: *Técnicas Histológicas*. Disponível em: http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm>. Acesso em: 26 dez. 2015.



Faça você mesmo

A histologia é usada em diferentes campos de atuação: pesquisa e clínica médica como visto durante a seção e é amplamente empregada em diagnósticos pós-operatórios. Pesquise a importância de um estudo histopatológico para a área da saúde. Por exemplo, no caso da situação-problema trabalhada anteriormente, o diagnóstico de câncer de pele determinado pela médica de Clara. Qual a importância desse estudo?

Se precisar de ajuda em suas dúvidas sobre as técnicas histológicas, assista ao vídeo disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=RlyTg64AT9E>. Acesso em: 14 jan. 2016.

Sem medo de errar



Atenção!

Na microscopia de luz, existe uma dificuldade de se visualizar núcleos, mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos e estruturas celulares envolvidas por membrana basal e matriz extracelular. É necessário desta forma que sejam realizadas preparações para que os compartimentos celulares de

interesse sejam visualizados. Por outro lado, o microscópio eletrônico de transmissão é o que nos permite a observação de células com todas as suas organelas e inclusões envolvidas pela membrana e pelos componentes de matriz extracelular.



Lembre-se

Os meios de cultura de células e tecidos fornecem as substâncias essenciais encontradas no organismo para o crescimento e para o controle do crescimento de células in vitro. Costuma-se adicionar a esses meios soros, alguns tampões, antibióticos se necessário e indicadores de pH.

Depois de um tempo já medicada pelo transtorno da ansiedade, ataques de pânico e depressão, Alice se sentia melhor, no entanto, tinha recaídas de ansiedade e depressão. Dr. Hugo explicou que por mais que a medicação já estivesse fazendo efeito em seu organismo, havia toda uma rede neuronal que precisava de um tempo maior para restabelecer as conexões, conhecida cientificamente como "plasticidade neuronal". A terapia fez Alice entender muito sobre a doença e não mais teve medo de fugir, mas sim de enfrentar e saber lidar com determinada situação. Ainda descobriu uma baixa funcionalidade na tireoide, especialmente de hormônio T4.

Avançando na prática

Instrução Desafiamos você a praticar o que aprendeu transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"A genética e a doença de ordem psicológica"		
1. Competência geral	Conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Entender sobre as técnicas de análise para detectar ácidos nucleicos sem o uso de radioisótopos.	
3. Conteúdos relacionados	Técnicas de análise para detecção de ácidos nucleicos.	

Análise de proteínas **107**

4. Descrição da SP	Depois de um tempo já medicada pelo transtorno da ansiedade e depressão, Alice se sentia melhor, porém tinha recaídas de ansiedade e depressão. Dr. Hugo explicou que por mais que a medicação já estivesse fazendo efeito, havia toda uma rede neuronal que precisava de um tempo maior para restabelecer as conexões, conhecida cientificamente como "plasticidade neuronal". Ainda solicitou exames de tireoide para saber sobre o funcionamento da glândula, que pode interferir em doenças de ordem psicológica. Desta forma, como Alice melhorou após a psicoterapia, entendendo que sua causa era genética e advinda de suas preocupações diárias, Alice precisou avançar em seus exames, pois relatou ainda sentir episódios de intensa tontura após as crises de ansiedade, pânico e aumento de pressão arterial.
A realização de novos exames mostrou que Alice aprocrises de labirintite quando fica ansiosa e com me organismo de Alice não aceita mais que ela se entreo situações que lhe tragam preocupações. Neste mor medicada e realizando a psicoterapia, Alice tem condiços e recuperar das crises de labirintite que não lhe per realizar as atividades que mais gosta. Desta forma, quar Hugo viu seus novos exames, disse para Alice que o car para sua cura ou eventual melhora seria mesmo a media a terapia e a conscientização de que sua ansiedade o preocupações estavam acabando com sua saúde, tra além de doenças psicológicas, o aparecimento de hiperta arterial e crises de labirintite. Pediu para Alice pensar er readequação em seu estilo de vida.	



Faça você mesmo

Novas alterações em exames mostram que Alice em situações de estresse e ansiedade acabou desenvolvendo episódios de labirintite. O que deve ser modificado na rotina de Alice para que doenças de fundo psicológico não alterem ainda mais as reações fisiológicas de seu organismo?



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você tenha em mente os conceitos e funções das técnicas de análise para detecção de ácidos nucleicos sem a presença de compostos radioativos, e ainda o uso dessa tecnologia no tratamento e prevenção de várias doenças.

Faça valer a pena!

- **1.** A plasticidade neuronal ou neuroplasticidade acontece quando:
- a) O sistema muscular e as fibras musculares aumentam sua elasticidade.
- b) O sistema muscular aumenta a contração de suas fibras musculares.
- c) O sistema nervoso é moldado alterando sua estrutura de acordo com as situações que acontecem durante a vida.
- d) O sistema nervoso é adaptado e remodelado, aumentando muito a dimensão dos neurônios.
- e) O sistema nervoso apresenta características de inibição de crescimento neuronal, diminuindo a ansiedade.
- **2.** A ansiedade e depressão acabam prejudicando as conexões cerebrais e assim a memória, a aprendizagem, a vontade e a criatividade ficam prejudicados. Normalmente indicam-se exercícios físicos, terapias, medicação para que todo o circuito neuronal apresente melhoras. Todas essas técnicas envolvidas em crises de ansiedade e depressão trabalham com:
- a) Decaimento e mau funcionamento neuronal.
- b) Diminuição do número total de neurônios.
- c) Princípios de esquizofrenia e outras doenças neurodegenerativas.
- d) Remodelamento cerebral, aumento de conexões cerebrais e melhora cognitiva.
- e) Princípios de doenças cardiovasculares.
- **3.** Culturas de células são mantidas "vivas" e podem ser adequadamente estudadas fora do corpo. A metodologia é de grande importância para o estudo isolado do efeito de moléculas sobre um determinado tipo de célula ou tecido. Sobre essa técnica, é correto afirmar que:
- I. A cultura de células favorece ainda uma análise direta do comportamento dessas células vivas por meio de análise microscópica in vitro, ou seja, fora do corpo de um animal de laboratório.
- II. Diferentes células e tecidos são cultivados em soluções compostas

por sais, aminoácidos, vitaminas, glicose, dentre outros componentes compondo os meios de cultura usados em metodologias laboratoriais e científicas.

- III. Os meios de cultura mais conhecidos são o DMEM (Dulbecco/Vogt modificado de Eagle's Harry Eagle) e o RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), nos quais linfócitos humanos são cultivados.
- IV. O meio RPMI possui uma quantidade de fosfato suficiente para o cultivo em 5% de gás carbônico (CO2), em contraste com as células cultivadas em DMEM que devem ser cultivadas numa atmosfera de CO2 a 10%.
- V. As células cultivadas são suplementadas com soro bovino a 10% ou soro fetal bovino a 10%.

Estão corretas as afirmativas:

- a) As afirmativas I, II e III estão corretas.
- b) As afirmativas II, III e IV estão corretas.
- c) As afirmativas I, II, III, IV e V estão corretas.
- d) As afirmativas I, II, III e IV estão corretas.
- e) As afirmativas III, IV e V estão corretas.

Referências

ALMEIDA, O. P. et al. Biologia molecular da doença de Alzheimer: uma luz no fim do túnel? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 77-81, jan./mar. 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100017>. Acesso em: 9 maio 2016.

CABRAL, H. A. C. et al. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no turnover proteico: deposição e degradação de proteína muscular. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15. Disponível em: http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20agrarias/Mecanismos.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.

CANDEIAS, José Alberto Neves. A engenharia genética. **Rev. Saúde Pública**, v. 25, n. 1, 1991. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101991000100002>. Acesso em: 19 jan. 2016.

CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia prático em biologia molecular**. São Caetano do Sul: Yendis, 2010.

CHUST, Rafael Berbert. Cromatografia de Líquidos. **Boletim SPQ**, 39, 1990. Disponível em: http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/article/3000458/pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.

ERENO, D. Mutações benéficas. **Revista Pesquisa Fapesp**, janeiro de 2014. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2014/01/076-077_Leveduras_215.pdf?71b16f>. Acesso em: 19 jan. 2016.

FARAH, S. B. **DNA Segredos e mistérios**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

FILHO, V. W.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 467-480, maio/jun., 2001. Disponível em: http://www.scielosp.org/pdf/csp/v17n3/4631.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARP, G. **Biologia celular e molecular**. 3. ed. Barueri: Manole, 2005.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos avançados 24 (70)**, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/a04v2470.pdf. Acesso em: 19 jan. 2016.

MARANGON, A. F. C; MELO, R. A. de Consumo de proteínas e ganho de massa muscular. **Universitas Ciências da Saúde** – v. 2, n. 2. – p. 281-290. Disponível em: http://www.

Análise de proteínas **111**

publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/541/361>. Acesso em: 19 jan. 2016.

MORAES, C. da S. et al. Série em biologia celular e molecular: métodos experimentais no estudo de proteínas, 2013. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1.pdf. Acesso em: 19 jan. 2016.

NAOUM, P. C. Eletroforeses: técnicas e diagnósticos. São Paulo: Editora Santos, 2012.

PAIM, J. A. et al. Síntese proteica muscular e influência da suplementação de ômega 3: aspectos atuais. **Revista destaques acadêmicos**, v. 6, n. 3, 2014 – CCBS/UNIVATES. Disponível em: http://www.univates.br/revistas/index.php/destaques/article/viewFile/1018/616>. Acesso em: 19 jan. 2016.

REYS L. F.; MACEDO, J. N. A.; DAMALIO, J. C. P. **Dogma Central da Biologia Molecular e Introdução à Bioinformática**. Brasília: W Educacional Editora e Cursos Ltda., 2011. Disponível em: http://lms.ead1.com.br/webfolio/Mod3921/mod_dogma_central_da_biologia_molecular_v2.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. **Técnicas histológicas**. Disponível em: http://depto.icb.ufmg.br/dmor/pad-morf/histologicabasica.htm>. Acesso em: 19 jan. 2016.

WATSON, J. D. et al. Biologia molecular do gene. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. F.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

METODOLOGIAS DE ANÁLISE EM BIOLOGIA MOLECULAR

Convite ao estudo

Nesta unidade trabalharemos de forma mais precisa as técnicas de Biologia Molecular, tratando dos conceitos, caracterização e métodos das variadas técnicas de Biologia Molecular.

A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar aos diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia. Já a competência técnica procura conhecer os procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA, bem como as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas.

Os objetivos são entender a importância das técnicas aplicadas à Biologia Molecular no estudo de diferentes patologias e anomalias genéticas. Além das diferenças e a caracterização das referidas técnicas e sua aplicação.

Em cada seção desta unidade vamos trabalhar as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia, observando essas práticas em rotinas de laboratórios e diagnóstico de patologias. Todo o conteúdo abordado e as sugestões de leitura devem favorecer a resolução das Situações-Problema (SP) abordadas, esclarecendo a você a importante utilidade dessas técnicas nas situações que aparecem em nosso dia a dia.

Para que você possa assimilar e perceber a importância do conteúdo acima e, dessa forma, cumprir as competências e objetivos do tema, veja a seguir uma Situação-Realidade (SR).

Andrea casou-se com Eduardo há menos de um mês. No entanto, já na viagem de lua de mel, notou que o marido ainda guardava lembranças do passado no qual ficara viúvo. Andrea diz que de uns dias para cá tem percebido que Eduardo está sempre se lembrando do casamento anterior, em que perdeu

sua ex-mulher e seu filho em um acidente. Provavelmente, como Eduardo não conseguia se livrar dessas lembranças, descontava em Andrea toda essa carga emocional que carregava com ele.

Andrea tentou ajudar Eduardo fazendo de tudo um pouco, conversando e levando-o para viajar e, também, sugeriu consultar seu psiquiatra, mas todas as tentativas foram em vão. Eduardo tornou-se agressivo e agora ela não tem encontrado forças para lutar, sentindo-se esgotada, tanto física como emocionalmente. Relata ainda que, apesar de saber de toda essa história desde que conheceu Eduardo, não pensou que ele fosse ter o sentimento tão aflorado assim quando revivesse a realidade de casamento e de constituição de família. Agora passado uns 40 dias que voltaram da viagem, já falam em separação. Todo esse sofrimento fez Andrea ficar muito isolada e sem saber o que fazer. Vamos ajudá-la?

Bons estudos!

Seção 3.1

Técnicas de biologia molecular

Diálogo aberto

Caro aluno, seja bem-vindo! Antes de iniciarmos esta seção, vamos retomar a situação apresentada no "Convite ao Estudo". É contada a história de Andrea e Eduardo. Eles se casaram há menos de um mês e agora, passado uns dias que voltaram da viagem, já falam em separação. Todo esse sofrimento fez Andrea ficar muito isolada e sem saber o que fazer.

Andrea continua isolada da família, chora muito e não aceita ajuda de ninguém. Ao conversar com sua avó por telefone, diz que sente dificuldade para dormir, chora muito e que suas pernas e braços algumas vezes estão adormecendo. Sua vó disse para que ela volte para a casa dos pais e não fique sozinha, pois precisa de ajuda. Por enquanto, Andrea disse que ficará em São Paulo, mas como passou por uma situação de estresse muito forte, irá procurar ajuda médica para saber o que pode ser feito neste caso. Todos estão preocupados, pois Eduardo saiu de casa e deixou Andrea em seu apartamento sozinha.

De manhã, quando Andrea tentou se levantar, não conseguiu firmar os pés no chão. Não era tontura, era uma fraqueza nas pernas que a fazia mancar e se arrastar ao tentar caminhar. Também sentia sua boca adormecida, "formigando". Andrea ligou imediatamente para o médico e foi ao consultório de seu neurologista.

A partir dessa situação, vamos estudar a patologia da Esclerose Múltipla (EM), bem como seus sinais e sintomas por meio de diferentes ensaios, verificando a possibilidade de a doença ser de origem genética. Para isso, usaremos testes de Biologia Molecular, verificando mecanismos de ação envolvidos na patologia da EM. Vamos entender a referida patologia por meio de testes de Biologia Molecular, relacionando o entendimento de doenças genéticas e/ou aquelas desencadeadas por mutações no código genético.

Quais outras patologias podem aparecer com o passar do tempo?

Não pode faltar

Os avanços científicos nos últimos anos, tanto na área da Genética como na da Neurobiologia, têm favorecido o uso de ferramentas moleculares que cada vez mais nos permitem a identificação pré e pós-sintomática de doenças neurodegenerativas, criando, assim, perspectivas de novas possibilidades terapêuticas.

O diagnóstico de doenças na área da Biologia Molecular consiste na avaliação da estrutura dos componentes do material genético (DNA) existente no núcleo das células de nosso organismo. As alterações que podem acontecer no DNA são, desde a perda de partes, como, também, uma simples troca de um de seus componentes ou, ainda, outras combinações genéticas mais complexas. Em decorrência de uma mutação, por exemplo, um determinado gene pode deixar de realizar a sua função ou adquirir outras funções diferentes de sua função original, levando ao aparecimento de patologias. Quando é realizada a investigação molecular de doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, por exemplo, é possível verificar que existem diferentes ferramentas moleculares que possibilitam identificar alterações em genes que seriam os agentes causadores de doenças e, ainda, aquelas que permitem a investigação do DNA, identificando, assim, os marcadores biológicos que estariam mostrando a susceptibilidade a certas doenças, como: Parkinson, Alzheimer e Esclerose Múltipla.

Para que se determine se realmente existe a susceptibilidade à determinada doença de origem genética, técnicas de extração e purificação de DNA e RNA são realizadas, a fim de que se determine o sequenciamento de genes para alguma patologia que está sendo investigada. Dessa forma, a Biologia Molecular nos permite determinar a composição do conjunto de genes do DNA ou do RNA envolvido na gênese da patologia, de forma que os variados pares de bases contidos na molécula de DNA são "lidos". Todo esse estudo nos fornece uma variedade de informações, que são processadas, interpretadas e armazenadas para o momento da análise do material genético.

Existem variadas doenças que estão associadas a uma instabilidade na duplicação de nucleotídeos, havendo repetições trinucleotídicas, ou seja, repetições de sequência do DNA. Esse grupo de doenças forma um grupo de neuropatias hereditárias causadas por mutações nos genes. O mecanismo consiste na amplificação de sequências genéticas repetidas do DNA, que fazem com que os genes correspondentes aumentem de tamanho. O que acontece é que a referida amplificação leva os genes a produzirem proteínas anormais, que chegam a ser neurotóxicas para o sistema nervoso central, gerando uma perda progressiva dos neurônios

O número de repetições anormais existente no material genético favorece o diagnóstico molecular conclusivo presente no gene que está associado à doença. Um diagnóstico realizado somente com base clínica dificulta a detecção de determinada patologia, o que é revelado por meio das ferramentas moleculares. No caso da identificação de marcadores para predisposição genética em doenças como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Múltipla, é possível verificar que determinadas alterações em genes podem ter um envolvimento direto ou indireto com a doença, mas não são esses os únicos fatores capazes de desencadeá-la.

Sabe-se que os anticorpos são específicos para proteínas e outras moléculas, podendo ser monoclonais e policionais. Você se lembra?



Assimile

Os anticorpos monoclonais são obtidos por uma população de células iguais (conhecida como clone), que crescem em meio de cultura celular. São considerados anticorpos homogêneos, ou seja, todos reconhecem a mesma porção de proteína antigênica que induziu sua formação. Já os anticorpos policlonais são aqueles obtidos a partir de diferentes tipos de células que produzem anticorpos.

Vale a pena conhecer outra técnica para trabalhar com a citogenética molecular. Mas você sabe o que é a citogenética?

A citogenética estuda as anomalias que afetam os cromossomos, favorecendo, assim, o diagnóstico de uma doença genética ou a prevenção destas. Assim, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (Fish) ajuda a localizar genes de maneira precisa ou a sequência de DNA diretamente nos cromossomos por meio de preparações celulares.

A técnica de Fish é aplicada em cromossomos que estão em metáfase e núcleos interfásicos, utilizando sondas de DNA. Estes métodos de marcação radioativa com sondas de DNA oferecem novas possibilidades de se realizar o mapeamento genético. Assim, pode-se mapear até um gene ou sequência de DNA do líquido amniótico, por exemplo, para diagnosticar alterações cromossômicas numéricas e, ainda, doenças ligadas ao sexo. Com todo o avanço da Biologia Molecular, é possível que usemos o método Fish no diagnóstico precoce em aneuploidias cromossômicas numéricas e, ainda, na determinação de sexo do feto e até os cromossomos envolvidos na leucemia mieloide crônica. Esse fato é interessante e importante, pois quanto antes se tem um diagnóstico, mais cedo se inicia o tratamento e a possibilidade de cura pode ser muito maior.

Conheça a especificidade em que se pode trabalhar com sondas usadas na citogenética clínica, permitindo tanto o mapeamento genético quanto o diagnóstico clínico:

- Sondas centoméricas: trabalha-se na região dos centrômeros dos cromossomos, ou seja, as sondas consistem de sequência de DNA repetitivo na região dos centrômeros de um cromossomo específico.
- Sondas de sequência única: são específicas para um determinado local. Importantes na detecção de deleções (perda de parte de cromossomos) ou duplicações gênicas.
- Sonda de pintura do cromossomo: são sondas multicoloridas que pintam o cromossomo inteiro, caracterizando moléculas complexas e a origem de material cromossômico adicional.
- Sondas multicoloridas: trata-se de uma pintura cromossômica para cada par de cromossomos e, portanto, cada par será pintado por uma cor diferente quando na presença de um marcador fluorescente.



Exemplificando

Usando o mesmo princípio da técnica de Fish, duas outras técnicas foram desenvolvidas para a análise de cromossomos humanos: a hibridização genômica comparativa (CGH) e cariotipagem espectral (SKY). A CGH aumenta a resolução na detecção de alterações cromossômicas, melhorando o diagnóstico do retardo mental, menopausa precoce e tumores, por exemplo. Para que você entenda a diferença entre CGH e SKY leia o artigo a seguir:

VILAS BOAS, D. S. Cariótipo multicolorido: mapeamento cromossômico através do uso de sondas de DNA fluorescentes. **Revista Ceciliana**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: http://sites.unisanta.br/revistaceciliana/edicao_01/1-2009-1-17.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

As proteínas desempenham o trabalho celular, sendo compostas por 20 tipos de aminoácidos. As proteínas dentro do organismo humano exercem diferentes funções: controlam a permeabilidade da membrana, catalisam (aceleram) reações químicas dentro do ambiente celular, regulam os metabólitos, trabalham com o movimento do corpo e controlam a função dos genes. Você imaginava que as proteínas fossem tão importantes assim para o seu organismo funcionar?



Reflita

Sabendo da importância das proteínas nas funções celulares, vamos aproveitar para pensar um pouco sobre a importância do conceito de um gene? Leia o artigo a seguir:

JOAQUIM, L. M. EL-HANI, C. N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientiae Studia**, n. 8, v. 1, São Paulo, jan./mar., 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S1678-31662010000100005>. Acesso em: 6 mar. 2016.

Nesse artigo, você encontra uma discussão sobre a importância do material genético e como é grande o interesse na obtenção de proteínas em quantidade suficiente para possibilitar o estudo estrutural e funcional das proteínas.

A expressão de proteínas recombinantes em sistema bacteriano tem vantagens e envolve a produção de proteínas visando à confecção de fármacos, anticorpos. estudo de estrutura e função. A maneira como a proteína recombinante será produzida, depende do vetor e da própria proteína. Na análise de proteína recombinante, as amostras de cultura consideradas ativadas são usadas geralmente em três diferentes tempos e são avaliadas quando se quantifica a expressão de proteínas em um gel de poliacrilamida. O referido gel é formado por uma malha de poliacrilamida e as proteínas são separadas pela própria massa molecular, ainda sem se esquecer de sempre correr um controle negativo, junto com as amostras em teste. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) é uma preparação que trabalha com a separação de proteínas, sendo necessária a confecção de um gel que é construído e utilizado no sentido vertical. A técnica apresenta em sua composição duas concentrações diferentes de poliacrilamida e de pHs: sendo um gel inferior, conhecido como gel de resolução ou separação (gR, do inglês resolving), e outro superior, conhecido como gel de empilhamento ou de concentração (qE, do inglês stacking). Cada molécula de proteína se liga às moléculas do SDS (um detergente que anula as cargas das proteínas) carregado negativamente, que faz com que essas migrem em direção ao elétrodo positivo e se separem por peso molecular e não por diferença de cargas elétricas.

O gel de resolução é o primeiro a ser colocado no suporte da técnica de eletroforese, podendo ser feito com diferentes concentrações de poliacrilamida. Este fato permite a maior discriminação entre as proteínas com suas diferentes massas moleculares e, assim, as proteínas de alto peso ficam concentradas na região superior do gel e as de baixo peso na região inferior do gel. O gR deve ocupar ¾ da altura do suporte e o restante é preenchido com água destilada. Esse

procedimento antecede a colocação do gel de empilhamento e a água permite que não exista a interação entre o oxigênio do ar com a poliacrilamida.



Atenção!

A manipulação da poliacrilamida que é utilizada no procedimento de eletroforese para montagem dos géis deve ser realizada com luvas, tomando-se o cuidado de não aspirar a solução, pois a substância de poliacrilamida é considerada neurotóxica.



Pesquise mais

Para se aprofundar no assunto a respeito de técnicas de Biologia Molecular envolvendo a revelação de resultados de amostras por eletroforese usando gel de revelação e empilhamento, consulte a tese a seguir, que trabalha a alergia alimentar causada pela ingestão de peixe que continha a larva de *Contracaecum sp*:

SILVA, C. M. da. Resposta imunológica contra antígenos de anisaquídeos de peixes teleósteos. 69 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/cristiane%20_miranda_dout.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

Observe a importância do estudo e análise de proteínas por diferentes métodos, como: ensaios enzimáticos, cromatografias, eletroforese, eletroforese bidimensional, SDS-PAGE, espectrometria de massa, dentre outros:

Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1. pdf>. Acesso em: 07 jan. 2016.

Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma tensão é aplicada.

É importante salientar que, dentre os diferentes reagentes usados, deve-se obedecer a uma ordem no momento de adicioná-los na reação, pois geralmente um reagente pode iniciar ou frear a reação, podendo interferir nos resultados. Assim,

no SDS-page, o TEMED e o APS (persulfato de amônio) são dois reagentes que iniciam a reação e devem ser colocados imediatamente após todos os reagentes e, depois de colocá-los no tubo de ensaio, rapidamente a solução toda deve ser colocada no suporte em que ocorrerá a eletroforese para que assim ocorra a polimerização do gel no suporte e não no tubo de ensaio.

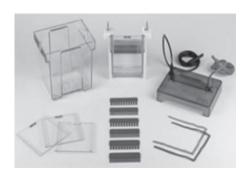
O gel de empilhamento tem a função de deixar as proteínas negativamente carregadas, permitindo que elas entrem ao mesmo tempo na preparação, atingindo a concentração final de 4% de poliacrilamida. Após a polimerização do gel de resolução, retira-se o excesso de água da reação, sendo adicionada a solução para o gel de empilhamento. É nessa etapa que colocamos um espaçador no referido gel, conhecido como "pente", que pode ser de 10 ou 15 espaços, possibilitando a formação de poços nos quais serão aplicadas as amostras a serem testadas. Após a corrida das amostras e controles no gel de SDS-PAGE, é feita a leitura e a quantificação da proteína de interesse.

Figura 3.1 | Montagem dos géis de poliacrilamida em sistema de eletroforese

Cátodo Gel de quando é aplicado o campo elétrico Direção da migração das moléculas empilhamento uuuuukuu Suporte plástico Tampão Ãnodo Gel de corrida Gel de suporte Separado Placa de sílica Placa de vidro Tampão

Fonte: http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio_resumo2010/relatorios/ctc/qui/QUI-Alex%20Andrade%20de%20Lima.pdf; Dicionário Saúde. Disponível em: http://dicionariosaude.com/eletroforese/>. Acesso em: 6 mar. 2016.

Figura 3.2 | Materiais utilizados no SDS-PAGE





com uma pipeta

Fonte: http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-182-Cuba-de-Eletroforese-Vertical-10-x-10-cm; Boise State http://brc.boisestate.edu/dna-and-protein-isolation-and-characterization/. Acesso em: 6 mar. 2016.



Faça você mesmo

Procure exemplificar onde você poderia usar a técnica de eletroforese para determinar a revelação de amostras envolvidas na situação ou patologia que você está interessado em estudar ou aprender para avançar em seus estudos de Biologia Molecular. Vamos lá?



Vocabulário

SDS: detergente dodecil sulfato de sódio.

Aneuploidias cromossômicas: são alterações que envolvem diminuição ou aumento em um determinado par de cromossomos. Já as euploidias são alterações numéricas em que todo o genoma é alterado, ou seja, alteram o conjunto de cromossomos.

Leucemia mieloide crônica: câncer do sistema sanguíneo caracterizado por uma aberração citogenética causada por uma translocação entre cromossomos, que resulta no cromossomo Filadélfia (cromossomo Ph1).

Sem medo de errar!



Atenção!

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crônica do Sistema Nervoso Central (SNC) de etiologia desconhecida, podendo ter manifestações iniciais na adolescência e no adulto jovem. A desmielinização dos axônios acontece por mecanismo autoimune e inflamatório.

Andrea realizou a coleta de líquor, ou líquido cefalorraquidiano, em laboratório, para realização da eletroforese de proteínas na verificação de bandas oligoclonais. A pesquisa de bandas oligoclonais no líquor está relacionada com o diagnóstico e detalhamento de estudos de processo inflamatório que acontece no Sistema Nervoso Central (SNC). Essas bandas são, na verdade, imunoglobulinas sintetizadas por um ou alguns clones de plasmócitos (derivados de linfócitos B), em resposta à presença de um antígeno único e específico. Assim, os resultados encontrados nos

ensaios de eletroforese, com o aparecimento de tais bandas, podem determinar o diagnóstico da Esclerose Múltipla (EM).

Sabe-se ainda que aproximadamente 90% dos pacientes com esclerose múltipla apresentam esse tipo de bandas oligoclonais em exames de LCR, mas não constituem indícios exclusivos dessa doença. Sabe-se que a avó paterna de Andrea faleceu após 4 anos de se descobrir portadora de EM, aos 85 anos de idade. Desta forma, a genética e os fatores ambientais determinaram o aparecimento da doença em Andrea ainda jovem. Outras doenças podem aparecer após o diagnóstico da esclerose múltipla, desde paralisia de músculos que levam ao movimento de pernas e braços, até músculo respiratório (diafragma), deglutição, dentre outros. É comum, também, o processo depressivo e dificuldades para falar.



Lembre-se

O diagnóstico é feito com base no quadro clínico de modo evolutivo. No diagnóstico da EM há o envolvimento de neurologistas, psiquiatras, dentre outros profissionais da saúde. Ainda se tem o forte suporte dos exames de líquor, ressonância magnética de crânio e medula, sempre se excluindo outras doenças de natureza inflamatória ou infecciosa. O exame de líquor na EM mostra o importante dado da elevação do índice de IgG (imunoglobulina G) intra-tecal e a presença de bandas oligoclonais por eletroforese. O aumento de leucócitos na esclerose múltipla é conhecido como pleocitose linfomonocitária, conferindo característica de processo inflamatório

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir, é importante que você se lembre de tudo o que discutimos a respeito da esclerose múltipla e os métodos que podemos usar para diagnosticar e entender essa patologia.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"Pat	"Patologia e Biologia Molecular"		
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar em diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.		
2. Objetivos de aprendizagem	Entender os diferentes conceitos e técnicas de Biologia Molecular e sua caracterização para aplicação em diferentes patologias.		
3. Conteúdos relacionados	Conceitos, caracterização e métodos/técnicas moleculares.		
4. Descrição da SP	Andrea continua isolada da família, chora muito e não aceita ajuda de ninguém. Ao conversar com sua vó por telefone, diz que sente dificuldade para dormir e que suas pernas e braços algumas vezes estão adormecendo. Sua avó pede para que ela volte para a casa dos pais e não fique sozinha, pois precisa de ajuda. Por enquanto Andrea disse que ficará em São Paulo, mas como passou por uma situação de estresse muito forte, irá procurar ajuda médica para saber o que pode ser feito neste caso. Ao dormir a noite toda, quando Andrea se levantou, não conseguia firmar seus pés no chão. Não era tontura, era uma fraqueza nas pernas que a fazia mancar e se arrastar ao tentar caminhar. O exame de Biologia Molecular foi positivo para EM. Agora, pede-se que se realize a ressonância magnética e o índice de IgG, que é calculado a partir de medidas de albumina e de IgG no líquido cefalorraquiano (LCR) e no soro, usando a fórmula: Índice de IgG = [IgG (LCR) ÷ IgG (soro)] + [Albumina (LCR) ÷ Albumina (soro)] para dar continuidade aos exames necessários para saber sobre a EM. Para realizar testes para pesquisa de anticorpos IgG anti-HTLV-I, é necessário usar o método Elisa, confirmados pelo WB. immuno blotting, para pesquisa de banda IgG específica.		
5. Resolução da SP	O diagnóstico de esclerose múltipla foi confirmado por exames que envolveram um índice de IgG elevado na coleta de líquor para dosagem de IgG no sistema nervoso central. Essa característica aparece em 90% dos casos de esclerose múltipla. Os exames de ressonância magnética produzem imagens do cérebro que permitem a identificação e o acompanhamento de áreas de lesão na esclerose múltipla. Ainda pode ser realizada a ressonância magnética funcional, a espectroscopia por ressonância magnética e a ressonância magnética com tensor de difusão. Essas técnicas vão favorecer o acompanhamento da evolução do quadro da doença de Andrea.		



Faça você mesmo

Fatores ambientais em alguns casos são tão sérios e importantes quanto o de natureza genética. O conjunto dos dois determina o avanço ou o adiantamento do aparecimento da doença. Essa é uma realidade que vivemos cada vez mais hoje em dia.

Faça valer a pena

- **1.** O diagnóstico de doenças na área da Biologia Molecular consiste na avaliação da estrutura dos componentes do material genético (DNA) existente no núcleo das células de nosso organismo. A partir disso, analise as afirmativas a seguir:
- I. Uma das alterações que pode acontecer no material genético é a perda de partes do DNA.
- II. As alterações que acontecem no material genético são fundamentadas na simples troca de um dos componentes ou, ainda, em combinações genéticas mais complexas.
- III. As alterações que acontecem no material genético são sempre mutações.

É correto afirmar que:

- a) As afirmativas I e II estão corretas.
- b) As afirmativas II e III estão corretas.
- c) As afirmativas I e III estão corretas.
- d) A afirmativa III é a correta, as outras são incorretas.
- e) Apenas a afirmativa I é a correta.

2. Para que se	determine se existe a susceptibilidade	à determinada
doença de	origem,	técnicas de
	de DNA e RNA são realizadas, a	fim de que se
determine o	de genes para determi	nada patologia
que está sendo	investigada.	

Assinale a alternativa que preenche corretamente as lacunas:

- a) Patológica, extração e purificação, sequenciamento.
- b) Genética, extração e purificação, sequenciamento.

- c) Genética, delimitação, gerenciamento.
- d) Inata, purificação, gerenciamento.
- e) Inata, extração, sequenciamento.
- **3.** A Biologia Molecular nos permite determinar a composição do conjunto de genes do ______ envolvido na gênese da patologia em que os variados _____ contidos na molécula de DNA são "lidos", fornecendo uma variedade de informações, que são processadas, interpretadas e armazenadas para _____ do material genético. Assinale a alternativa que preenche corretamente as lacunas:
- a) cDNA, nucleotídeos, purificação.
- b) cDNA, nucleotídeos, análise.
- c) RNAt, pares de bases, análise.
- d) RNAt, nucleotídeos, análise.
- e) DNA ou do RNA, pares de bases, análise.

Seção 3.2

As técnicas moleculares: ácidos nucleicos, genômica e proteômica

Diálogo aberto

Caro aluno, antes de iniciarmos esta seção, vamos retomar a Situação-Realidade (SR) apresentada anteriormente. A situação conta a história de Andrea e Eduardo, que se casaram há menos de um mês e agora, passado uns dias que voltaram da viagem, já falam em separação. Todo esse sofrimento fez Andrea ficar muito isolada e sem saber o que fazer. Ela continua isolada da família, no entanto, buscou a opinião de vários médicos. Os sintomas ainda continuam, a mão treme demais e as pernas também, tendo dificuldades para se levantar da cama e da cadeira, tanto é que recentemente torceu seu tornozelo por ter rompido os tendões do pé direito. Ao caminhar ainda não consegue firmar muito bem seus pés no chão. Tem medo de fraturar algum membro e não quer usar a cadeira de rodas.

No entanto, um grupo de pesquisadores da Universidade de São Paulo se interessou em estudar o caso de Andrea. Na verdade, esses dados da paciente farão parte de uma pesquisa, mas mesmo assim ela concordou em contribuir com a busca de uma solução para o problema da esclerose múltipla. Se não for para ela, servirá para outros pacientes na prevenção, diagnóstico e até tratamento da patologia. Para detectar geneticamente a existência dessa doença, o grupo de pesquisa disse que irá recorrer a técnicas de Biologia Molecular, usando ensaios que devem favorecer o estudo, ajudando-a a entender melhor o que acontece em seu organismo. A equipe de pesquisa disse que vai verificar todos os exames que a paciente tem em mãos e seguir com o estudo.

Quais técnicas de Biologia Molecular podem ser usadas? Existe uma maneira de retardar os sintomas da doença quando a paciente não está tendo episódios de crise e nem apresenta intenso estresse?

Todos os conteúdos envolvidos nesta seção irão ajudar você a pensar na importância da Biologia Molecular, apresentando diferentes técnicas que devem elucidar mecanismos de prevenção e diagnósticos de doenças possíveis de serem estudadas a partir do isolamento de um determinado gene ou conjunto de genes.

Além das informações apresentadas nas demonstrações contábeis consideradas nos referidos dados da situação-problema anterior, sabemos que o investimento inicial do projeto analisado é de R\$ 1.000.000,00 e tem uma vida útil de cinco anos, estando totalmente depreciado ao término deste período, no qual estará sucateado, devendo ser substituído. O período para aceitação do projeto é de três anos.

Não pode faltar

A aplicação de abordagens moleculares com base na análise de DNA, RNA e proteínas da célula engloba a genômica e a proteômica, assim como o número crescente de sequências genômicas disponíveis, tornando possível a comparação em larga escala entre os genomas de diferentes organismos, determinando como exemplo as proteínas fosforiladas disponíveis em um determinado tipo celular.

O estudo da genômica e proteômica depende das características de macromoléculas biológicas como o pareamento de bases nitrogenadas de DNA e RNA, permitindo o uso de técnicas de hibridização, que por sua vez permitem a expressão do genoma como um todo. Todos os detalhes estudados anteriormente, como as enzimas de restrição, DNA polimerase, técnicas de clonagem e de PCR, permitem o isolamento de qualquer porção do DNA.

Quando as endonucleases clivam as moléculas de DNA em sítios específicos de ligação de um cromossomo, por exemplo, temos milhões de genes para serem estudados. Esses genes são quebrados em moléculas menores com a ajuda das chamadas enzimas de restrição, como a ECOR1, obtida da bactéria *Escherichia coli*, que reconhece a sequência 5 GATTC 3 . Assim, quando se coloca um DNA clivado com ECOR1, a técnica de eletroforese separa os fragmentos de acordo com diferentes tamanhos.

Quando se quer fazer a comparação do padrão de expressão de dois tecidos, como o muscular e o nervoso, em placas de microarranjos marcados com corantes fluorescentes, vê-se que os marcadores vermelhos demostram genes expressos em tecido muscular, em verde expressa-se o tecido nervoso e em amarelo demostram ambos os tecidos (nervoso e muscular). Isso nos faz pensar que as amostras apresentam um conjunto diferente de genes (Figura 3.3).

Um ensaio de *Northern blotting* pode investigar quando um RNAm está presente em uma célula tratada com um indutor do gene envolvido na doença de Andrea, comparando, então, a referida amostra com outra célula não induzida e verificando a expressão do DNA em diferentes tecidos do organismo. Assim como a esclerose múltipla envolve dificuldades em andar, falar e enxergar, provavelmente um ensaio comparativo de diferentes tecidos da paciente Andrea conseguirá compreender e discernir essas características genéticas.

Sabe-se que os princípios da hibridização em *Southern* e *Northern blotting* são também a base de análise de microarranjos. Um microarranjo é constituído por várias, centenas ou milhares de sequências de DNA em superfície conhecida, geralmente uma lâmina de vidro ou de plástico. Assim, cada sequência de DNA é derivada de um gene diferente do organismo estudado. A nomenclatura dos microarranjos é inversa às de *Southern* e *Northern blotting*. Assim, na análise de microarranjos, as sequências fixas não marcadas são conhecidas como "sondas", porque são as sequências de DNA conhecidas. Já as sequências-alvo são os cDNAs amplificados e marcados, obtidos do RNA total de uma determinada célula. Quando as sequências-alvo são hibridizadas ao arranjo de sondas de DNA, sabe-se que a intensidade do sinal de hibridização de cada amostra ou espécie no arranjo é uma medida de expressão do gene em estudo.

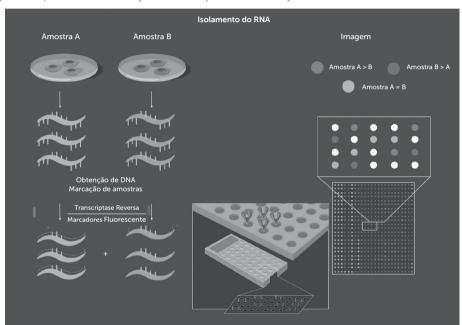


Figura 3.3 | Ensaio de detecção de DNA por microarranjos

Fonte: Watson et al. (2015).

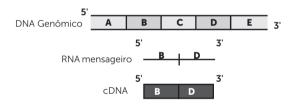
Na figura, a amostra A é tecido muscular (identificada em vermelho) e B é tecido nervoso (identificada em verde). Os genes identificados em amarelo apareceram em ambos os tecidos.

Uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) é muito útil para se iniciar a clonagem de um gene. Mas por que isso acontece? Porque sendo o cDNA (DNA complementar) derivado do RNA mensageiro (mRNA), para uma proteína que foi expressa na célula, é possível conseguir bibliotecas deste material, já que sua representação é significativamente maior do que em bibliotecas genômicas, o

que facilita o seu isolamento. Outra vantagem é que se pode deduzir com certa facilidade a sequência da proteína, pois o cDNA de seres eucariontes é justamente uma cópia do mRNA processado. Assim, é fundamental ter um clone de DNA completo (com todas as sequências codificantes da proteína) para qualquer estudo ou investigação científica.

Você se lembra do que é o cDNA? O cDNA é uma cópia da mensagem, sem a presença de íntrons, possuindo, assim, poucas sequências que não codificam proteínas. Essa ausência de íntrons permite a transcrição e tradução dos cDNAs diretamente de células de bactérias e outros microrganismos. A grande vantagem neste caso é que a maior produção de polipeptídios (proteínas) importantes e a inexistência de íntrons facilita a determinação da sequência correta da mensagem codificada e a dedução da sequência de aminoácidos da proteína que foi codificada. Dessa forma, a técnica de hibridização pode ajudar na identificação de um clone específico dentro de uma biblioteca específica de DNA.

Figura 3.4 | Síntese in vitro de cDNAs de cadeia dupla partindo de mRNAs isolados do tecido de interesse, na presença da enzima transcriptase reversa.



A e E = Sequências Flanqueadoras B e D = exons C = íntron

Fonte: o autor.



Lembre-se

Você se lembra do que é necessário para obter o cDNA? Não?

Vamos lá: 1. É necessário que se faça a preparação dos cDNAs para que seja feita a ligação com o vetor escolhido; 2. Ocorre a introdução dos cDNAs recombinantes em determinada célula hospedeira para que eles sejam replicados; 3. Acontece a identificação de clones específicos.

Portanto, para constituir uma biblioteca de cDNA, é necessário isolar o mRNA de determinada célula de interesse. A seguir, usa-se a enzima transcriptase reversa para fazer um DNA que seja complementar ao RNA. A seguir, usa-se a enzima DNA polimerase para fazer a cópia de cDNA. Após a obtenção desse material, adicionase cada DNA ao plasmídeo e, depois, insere-o dentro de células de bactéria E. coli.

Para clonar um gene, é necessário identificar os fragmentos que correspondem a esses genes entre todos os clones de uma biblioteca de genes. Mas o que é uma biblioteca genômica?

Uma biblioteca genômica contém muitas cópias ou "clones representativos" de cada fragmento de DNA. Esse conteúdo armazenado aumenta muito a probabilidade de se conseguir isolar genes de cópia única, ou seja, os genes que codificam uma determinada proteína. A biblioteca genômica é o modo mais eficiente para se conseguir isolar uma porção de DNA.

A separação da porção do DNA genômico que possui a unidade de transcrição e suas regiões limitadoras (onde estão os elementos controladores da expressão desse gene) fornece informações sobre a estrutura molecular de um determinado gene de seres eucariontes. A construção de uma biblioteca genômica culmina na obtenção aleatória de um grande número de clones, que contém fragmentos do genoma. Para garantir que um determinado fragmento de interesse esteja mesmo entre os elementos clonados, é necessário pensar no tamanho da biblioteca, tendo em mente qual o tamanho do fragmento clonado e qual o tamanho do genoma.

A construção de uma biblioteca genômica envolve basicamente os seguintes passos:

- 1. O isolamento de DNA de alto peso molecular, que é quebrado posteriormente, produzindo fragmentos de tamanho compatível com o vetor.
- 2. A ligação desses fragmentos ao vetor e à introdução dos recombinantes obtidos nas células hospedeiras.



Assimile

Os vetores de clonagem molecular são as moléculas de DNA que amplificam a informação genética que neles foi inserida em centenas de vezes. Existem diferentes tipos de vetores, como: 1. Plasmídeos. 2. Fagos. 3. Cosmídeos. 4. Fagemídeos.

Os Plasmídeos são moléculas de DNA de cadeia dupla, de tamanho pequeno que possuem os elementos necessários a sua replicação e um gene que favorece resistência a um determinado antibiótico. Esses plasmídeos amplificam o segmento de DNA neles inserido, sendo usados como vetores de clonagem. Os Fagos, mais conhecidos para ensaios de clonagem molecular, funcionam como um bacteriófago, que trabalha como um vírus da E. coli. Desta forma, é uma partícula viral constituída por proteínas e DNA em igual quantidade. Os

Cosmídeos favorecem algumas limitações da clonagem em fagos e plasmídeos. Quando inseridos em um determinado fago, os fragmentos de DNA não podem ultrapassar os 15 kb, pois os genes que são de maiores dimensões (35 a 40 kb) tornam impossível a inserção do mesmo. Já os Fagemídeos foram desenvolvidos com a finalidade de juntar as vantagens do fago e do plasmídeo, sendo úteis na clonagem de cDNA.

Os vetores mais conhecidos e usados na construção de bibliotecas genômicas são os fagos e os cosmídeos. Ambos os vetores são fragmentos grandes de DNA obtidos por fragmentação aleatória, ligando-se ao DNA do vetor para poderem ser empacotados em partículas de fago. Assim, as bibliotecas construídas com vetores são armazenadas como fagos recombinantes.

Os vetores possuem, por sua vez, um fragmento central limitado por dois fragmentos essenciais. O fragmento mais conhecido como "braço esquerdo" é o responsável pela codificação de proteínas da cápsula, já o fragmento direito tem a porção de origem de replicação do fago e, ainda, os promotores de outros genes essenciais. Entre o fragmento central e os dois braços estão os sítios de restrição, que são usados na clonagem, orientados inversamente. Esses segmentos são complementares entre si, permitindo uma recircularização da molécula e a consequente replicação do fago dentro da célula hospedeira.

Esse tipo de vetor é conhecido como vetor de substituição, pois, durante a clonagem, a parte central do DNA do fago é substituída pelo fragmento de DNA a ser clonado, dando origem à molécula recombinante. A suspensão de fagos formados pode ser armazenada em frigorífico por vários anos ou por congelamento da mistura de ligação (fragmento de DNA/vetor).

Após se obter o cDNA, torna-se necessário prepará-lo para ser inserido em um vetor especialmente de clonagem, ou seja, vetor utilizado na construção de uma biblioteca de cDNA. Isso vai depender do vetor escolhido, seja um plasmídeo ou um fago.

Sabe-se que o fago é mais utilizado quando comparado aos plasmídeos. O fago necessita de 16 vezes menos cDNA por µg de um determinado vetor para produzir um número equivalente de clones recombinantes. As bibliotecas de fagos são de fácil manipulação se comparadas às bibliotecas de plasmídeos. No entanto, os fagos não são tão eficientes ou favoráveis quando se trata de sequenciamento de DNA e de ensaios de mutagênese dirigida.

Para melhorar este cenário molecular, com certa limitação, idealizou-se que os fagemídeos (são plasmídeos contendo porções do genoma do fago) reuniriam, então, as vantagens dos dois vetores.



Lembre-se

A elaboração de bibliotecas de genes dos mais variados organismos e tecidos favoreceu o desenvolvimento e o enriquecimento da análise da estrutura e expressão de genes de seres eucarióticos, assim como também uma verdadeira revolução tecnológica na indústria farmacêutica e na área de alimentos, favorecendo a produção de polipeptídios na pesquisa e na clínica.

E por que estudar, identificar e produzir os clones de material genético? As aplicações de clones envolvem a produção de diversos produtos para determinado estudo ou para alteração fenotípica de organismos. Na área da clínica médica, a aplicação de clones transformou bactérias como a E. coli em plasmídeos, conferindo a capacidade de separar os dois polipeptídios usados na obtenção de insulina humana. De maneira análoga, a inserção de clones de cDNA em vírus, no caso de vacinas, o hospedeiro desenvolve imunidade para o agente patogênico.



Reflita

Você já pensou que podem existir diferenças entre bibliotecas genômicas e bibliotecas de cDNA? Na biblioteca genômica, os genes estão representados em igual proporção àquela que existe no organismo. Já na biblioteca de cDNA (obtido por cópia do mRNA), são determinantes os genes que serão expressos em um dado momento, na proporção necessária dessa expressão. Por fim, nas bibliotecas de seres eucariontes, há modelos que resultam das diferenças da estrutura genética (DNA) e da estrutura dos seus transcritos (mRNA). Assim, é compreensível que é mais difícil trabalhar com mRNA em laboratório do que com DNA. O que você pensa sobre isso?

Vocês se lembra que falamos anteriormente das diferenças entre as duas bibliotecas (genômica e de cDNA)? Comentamos que a falta ou ausência de íntrons facilita a identificação e a caracterização de determinados genes, ou seja, apenas os genes que serão utilizados pela célula estarão à disposição para o estudo. Desta forma, a enzima RNA polimerase só transcreve genes ativados sem interferir na ação de outros genes do genoma. O tal gene, escolhido para ser clonado, terá diversas cópias, enriquecendo a biblioteca de genes. Caso seja um gene importante, relacionado com determinada patologia, por exemplo, poderá

ser intensificado o estudo, tendo-se a praticidade de já ter o material de interesse isolado. O cDNA é menor e, portanto, pode ser inserido em um único vetor. Assim, muitos estudos moleculares quando procuram uma ação ou um novo gene, começam analisando uma biblioteca de genética que suspeitam do uso desse gene continuamente. Grandes descobertas são feitas assim!



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto a respeito de técnicas de Biologia Molecular envolvendo ácidos nucleicos, genômica e proteômica, consulte os diferentes artigos a seguir:

BUSS, P. M. Genômica e Saúde Pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, Rio de Janeiro, maio/jun., 2002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/50102-311X2002000300001. Acesso em: 6 mar. 2016.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, São Paulo, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>. Acesso em: 6 mar. 2016.



Exemplificando

Você percebeu a importância do estudo da Biologia Molecular estudando as terapias gênicas? Quando pensamos nas vacinas gênicas, imaginamos, também, um gene cujo produto tem a capacidade de curar ou prevenir a progressão de uma determinada doença? Doenças que alastram epidemias e que não possuem cura nem medicação apropriada necessitam do intenso estudo e de pesquisas nessa área.

Leia mais sobre a terapia gênica:

SILVEIRA, E. da. **Terapia Gênica**. Disponível em: <www.biotecnologia. com.br/revista/bio14/entrevista.pdf>. Acesso: 6 mar. 2016.



Faça você mesmo

Procure buscar quais as vantagens e desvantagens da confecção de clones para prevenir e curar doenças. Elenque se há mais vantagens ou desvantagens nessas técnicas. E em nosso país, como está o interesse ou essa situação?

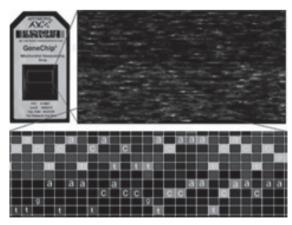
Traga esses dados para discutir no momento da aula presencial.

Sem medo de errar!

A equipe de pesquisa que se interessou pelo estudo de Andrea está realizando um tipo de triagem de técnicas de Biologia Molecular que possam evidenciar qual o estágio de sua doença. O interesse da paciente em contribuir com a pesquisa está relacionado ao cuidado para que os sintomas não aumentem e a doença permaneça em determinado estágio, para que ela possa ter qualidade de vida. Um ensaio que serviu de base para ver as condições da junção neuromuscular, ou seja, músculo e nervo que favorecem os movimentos da paciente, foi a técnica de microarranjos de DNA. As condições neuromusculares de Andrea são boas e, dessa forma, existe uma expectativa positiva para que melhore seus movimentos e seu equilíbrio.

A equipe de pesquisa usou chips de DNA (marca Gene Chip) e obteve um resultado que pôde demonstrar quais os genes estariam envolvidos com a esclerose múltipla no estágio atual da doença. A imagem obtida seria semelhante a esta que segue:

Figura 3.5 | Resultados da técnica de microarranjos de DNA



Fonte: https://www.mun.ca/biology/scarr/Human_mtDNA_re-sequencing_microarray.html>. Acesso em: 6 mar. 2016.



Atenção!

Os arranjos de DNA (microarranjos) são conhecidos como chips de DNA, devido ao componente eletrônico em miniatura que carrega milhões de transistores. Esses são coleções de segmentos de material genético (DNA) que aparecem distribuídos ordenadamente sobre uma superfície sólida.



Lembre-se

Trabalhar com variados tipos de arranjo de DNA é como possuir um "endereço próprio" para cada componente da coleção, ou seja, uma posição individual para cada componente do arranjo.

Avançando na prática

D		
Pratio	מום	maic
Hatto	iue i	ııaıs

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"Terapia Molecular"		
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Entender os diferentes conceitos e técnicas de Biologia Molecular e sua caracterização para aplicação em diferentes patologias.	
3. Conteúdos relacionados	Conceitos de marcadores genéticos e utilização de DNA; interação dos ácidos nucleicos e proteína.	
4. Descrição da SP	A prima de Andrea, ao saber de sua doença, ficou preocupada e queria de toda forma que ela não fornecesse os dados de sua doença para pesquisa da universidade. Deu-lhe novos contatos de neurologistas, psiquiatras e conhecidos que trabalham com doenças autoimunes e neurodegenerativas. Você acredita que esse pedido da prima de Andrea é uma atitude correta? O que Andrea pensa sobre isso?	

5. Resolução da SP:

Andrea teve que conversar muito com sua prima para convencê-la de que a pesquisa iria de alguma forma ajudá-la e que ela não estaria correndo risco de vida ou de saúde pelo fato de estar envolvida neste estudo. Andrea disse ainda que gostaria muito de saber o que fazer com o que ela estava sentindo, o que poderia acontecer com ela e com os outros portadores dessa doença. As pessoas sofrem tanto quando os sinais e sintomas dessa patologia aparecem, então: como evitar ou minimizar esse sofrimento? Andrea pensava também em outros pacientes, em ajudar a descobrir mais sobre a esclerose múltipla. Todo trabalho que envolve pesquisa com seres humanos ou animais precisa do consentimento e avaliação de um comitê de ética. O comitê de ética existe justamente para que tudo seja feito da maneira mais nobre possível, evitando erros e ou sofrimento de pacientes e animais. Tudo que envolve seres humanos precisa do consentimento do paciente e/ou de sua família, dependendo da gravidade da doença.



Lembre-se

A tecnologia de *microarrays*, ou microarranjos de DNA, favorece que se avalie simultaneamente a expressão de milhares de genes em diferentes tecidos de um determinado organismo, ainda em diferentes estágios de desenvolvimento ou condições ambientais.



Faça você mesmo

Busque outras técnicas que você já estudou que poderiam ajudar um paciente com esclerose múltipla. Pesquise! É importante que você se interesse e liste sua opinião aqui!

Faça valer a pena

- **1.** A aplicação de abordagens moleculares com base na análise de ______ da célula engloba ______ assim como o número crescente de sequências genômicas disponíveis, fazendo a ______ em larga escala entre os genomas de diferentes organismos. Assinale a alternativa que contemple a sentença:
- a) RNAm, RNAt, RNAr, genômica, adequação.
- b) RNA, DNA e proteínas, genômica e proteômica, comparação.

- c) DNAc, RNAm, proteômica, comparação.
- d) RNA, DNA, fosfatases, genômica, adequação.
- e) DNAc, RNA e proteínas, fosfatases, comparação.
- **2.** O estudo da genômica e proteômica depende das características de macromoléculas biológicas como o pareamento de bases nitrogenadas de DNA e RNA. Assim:
- I. Permite-se o uso de técnicas de hibridização.
- II. Como consequência da hibridização, permite-se a expressão do genoma como um todo.
- III. Técnicas estudadas anteriormente com o uso de enzimas de restrição, DNA polimerase, técnicas de clonagem e de PCR não permitem o isolamento de porções do DNA.
- IV. Quando as endonucleases clivam as moléculas de DNA em locais específicos de ligação de um cromossomo, por exemplo, temos milhões de genes para serem estudados.
- V. As enzimas de restrição conhecidas como ECOR1 são obtidas da bactéria *Escherichia coli* que reconhece a sequência 5 GATTC 3 do DNA.

É correto afirmar que:

- a) As alternativas I, II e III estão corretas.
- b) As alternativas IV e V estão corretas.
- c) As alternativas I, II, IV e V estão corretas.
- d) As alternativas I, III e IV estão corretas.
- e) As alternativas III, IV e V estão corretas.
- **3.** Um ensaio de *Northern blotting* pode investigar quando um RNAm está presente em uma célula tratada com um indutor do gene envolvido em doença neurodegenerativa, como a esclerose múltipla. Assim:
- I. É possível comparar a amostra em estudo com outra célula não induzida e verificar a expressão do DNA em diferentes tecidos do organismo.
- II. A hibridização em *Southern* e *Northern blotting* é, também, a base de análise de microarranjos.
- III. Um microarranjo é constituído por milhares de sequência de DNA em lâmina de vidro ou de plástico.

- IV. Cada sequência de DNA é derivada de um gene diferente do organismo estudado.
- V. A nomenclatura dos microarranjos são as mesmas das de *Southern* e *Northern blotting*.

É correto afirmar que:

- a) As afirmativas I, II, III e IV estão corretas.
- b) As afirmativas I, II e V estão corretas.
- c) As afirmativas II, III, IV e V estão corretas.
- d) As afirmativas I, III e V estão corretas.
- e) As afirmativas I, IV e V estão corretas.

Seção 3.3

Técnicas de análise - Eletroforese

Diálogo aberto

Andrea casou-se com Eduardo há menos de um mês e diz que de uns dias para cá tem percebido que ele está sempre se lembrando do casamento anterior, por ter perdido sua ex-mulher e seu filho em um acidente. Provavelmente, como Eduardo não conseguia se livrar dessas lembranças, descontava em Andrea toda essa carga que carregava com ele. A mulher tentou ajudá-lo, fazendo de tudo um pouco e sentiu-se esgotada, tanto física quanto emocionalmente. Agora, passado um tempo que voltaram da viagem, já falam em separação.

Todo esse sofrimento fez Andrea ficar isolada sem saber o que fazer. Ela continua interessada em saber a respeito dos estudos sobre seus problemas de saúde. Marcou um encontro com a equipe de pesquisa nesta semana e pôde entender um pouco mais sobre a influência genética da esclerose múltipla (EM). Conversou muito com o pesquisador principal da pesquisa e ele rastreou todos os dados encontrados em seu exame no qual foi usado o método de análise de microarranjos de DNA. Relatou, então, que seus sintomas com relação à dificuldade de andar e se equilibrar, envolvendo músculos e nervos, fazia sentido, pois havia mesmo déficit na expressão de genes para músculos e nervos. Ele falou também para Andrea que agora gostaria de seguir com outros testes moleculares relacionados às lipoproteínas. Sabe-se que algumas deficiências genéticas de lipoproteínas estão envolvidas com anomalias esqueléticas e neuromusculares, com a degeneração pigmentar e da retina, bem como alterações gastrointestinais. Os testes atuais devem envolver a técnica da eletroforese, que conseque fazer uma avaliação do lipidograma do paciente. Como o estudo das lipoproteínas pode ajudar a caracterizar detalhes sobre a EM? Pode ser detectado algum outro tipo de doença fazendo a caracterização das lipoproteínas?

Todos os conteúdos envolvidos nesta seção irão ajudar você a pensar na importância da biologia molecular e da técnica da eletroforese. Serão estudados mecanismos de prevenção e diagnóstico de doenças possíveis de serem especificadas a partir do isolamento de um determinado gene ou conjunto de genes.

Não pode faltar

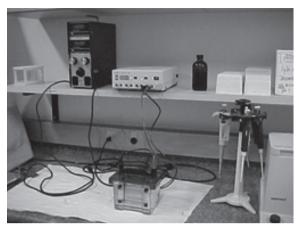
A eletroforese é uma das técnicas mais importantes para se trabalhar na investigação de proteínas, enzimas e DNA. A grande importância do método está relacionada à extensa aplicação em clínica médica e pesquisa na área da Biologia Molecular. Devido à simplificação de seu uso e melhoria na qualidade analítica, permitem-se resultados com possibilidade de reprodutividade, favorecendo o seu uso em laboratórios prestadores de serviços médicos.

Para a revelação de dados das amostras, geralmente faz-se uso de géis de poliacrilamida na presença de SDS (sódio-dodecil-sulfato), fato este que nos permite realizar o fracionamento de proteínas seletivas com base no pH e no peso molecular dessas moléculas que estão sendo estudadas. Não se deve esquecer de que, apesar de termos um alto grau de resolução, permitindo uma boa visualização dos resultados, o seu uso na rotina de laboratórios de análises de amostras é economicamente dispendioso. Sendo assim, seu uso é mais comum em pesquisa científica.

Por vários motivos, é importante que Andrea consiga o apoio da Universidade em seus exames e laudos científicos. A disponibilidade de equipamentos e material de consumo para realização de testes de biologia molecular é bem cara e, com a ajuda da Universidade no diagnóstico e elucidação dos componentes genéticos envolvidos em sua patologia, Andrea poderá encaminhar seu tratamento de uma maneira positiva. O chefe da equipe de pesquisa disse a ela que deve continuar a investigação no diagnóstico e prognóstico da esclerose múltipla, trabalhando agora com ensaios de eletroforese. Ainda explicou que algumas deficiências genéticas de lipoproteínas estão envolvidas com anomalias esqueléticas e neuromusculares, degeneração pigmentar e da retina e alterações gastrointestinais. O que será trabalhado agora é uma avaliação do lipidograma da paciente.

A eletroforese (Figura 3.6) é uma técnica descoberta há mais de 70 anos e mantém seu uso de maneira cada vez mais sofisticada na rotina laboratorial e na pesquisa científica. A explicação físico-química desse método é relativamente simples, pois se emprega uma corrente elétrica contínua para separar os componentes de determinada amostra. Quanto maior a corrente aplicada, maior a velocidade com que se movimentará uma substância em relação à outra. A diferença está em "quem tiver" em sua composição o maior número de cargas elétricas positivas ou negativas em aminoácidos, que, por sua vez, compõem as moléculas de proteínas ou enzimas.

Figura 3.6 | Técnica de Eletroforese



Fonte: http://www2.ib.unicamp.br/profs/depaula/bb123/fotas/5/Eletroforese%20-%20Aparelhagem.html. Acesso em: 6 mar, 2016.

Desta forma, os componentes com cargas elétricas equilibradas devem permanecer parados no gel de resolução, enquanto outros componentes mais carregados eletricamente devem se mover em direção ao eletrodo de carga elétrica oposta.

Tipos de Eletroforese

Existem diferentes tipos de eletroforese que são:

- 1. Eletroforese em acetato de celulose: usado em análises de proteínas, lipoproteínas, isoenzimas e hemoglobinas. Ainda pode ser usado em substâncias de baixo peso molecular, como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, podendo ser fracionado por eletroforese de acetato de celulose.
- **2. Gel de ágar (agarose)**: gel não absorvível, não fermentado e atóxico, que possui fibras e sais minerais, celulose, anidrogalactose e proteínas em sua composição. O gel de agarose pode ser usado em rotinas de laboratório trabalhando o fracionamento de proteínas, lipoproteínas, enzimas, hemoglobinas, assim como também na pesquisa científica com Biologia Molecular, separando fragmentos de DNA.
- **3. Gel de poliacrilamida**: tem o objetivo de fracionar macromoléculas. Esse gel permite o fracionamento por meio de dois processos: 1) A enzima ou proteína é separada pela carga elétrica; 2) Ou fraciona-se pelo seu tamanho (peso molecular). Outras variações técnicas podem usar o SDS, um detergente que desnatura a proteína em seus polipeptídios formadores, além de separar pelo pH e peso molecular.

- 4. Focalização isoelétrica (EFI): método que fraciona espécies moleculares (proteínas, enzimas, DNA, peptídeos) com base em suas cargas elétricas. O método permite que cada proteína migre para sua posição relacionada ao seu ponto isoelétrico. A EFI se caracteriza pelo uso de um suporte de gel (poliacrilamida) com substâncias distribuídas em faixas com pHs graduais em regiões do gel entre o ânodo e cátodo. Essa região organizada é conhecida como gradiente de pH. Hoje, o uso da EFI tem base no rastreamento de hemoglobinopatias em sangue de bebês recém-nascidos, cuja análise tem denominação de "teste do pezinho", devido ao fato de se obter sangue por meio da punção do pé do recém-nascido.
- **5. Eletroforese capilar**: envolve tecnologia com o auxílio da informática e a pureza de materiais conhecidos como tubos capilares. Com este método, é possível realizar diversos modos de separação, com mecanismos de seletividades característicos: eletroforese capilar de zona, eletrocromatografia capilar, eletroforese capilar em gel, dentre outros métodos. Por ser mais simples e otimizar o ensaio, a eletroforese capilar de zona foi a preferida das técnicas de eletroforese capilar. Outra vantagem é que a separação por eletroforese capilar é eficiente, pois o ensaio acontece com a aplicação de voltagem ao sistema (e não de pressão), evitando gradientes de velocidades ao longo da referida parede capilar. Assim, o fluxo é uniforme ao longo do capilar e migra de modo segmentado, diminuindo o alargamento dos picos. Pode-se usar como método de detecção de condutividade de fluorescência ou de espectrometria de massa.

Revelação e Quantificação das Frações Separadas por Eletroforeses

Proteínas, enzimas, lipoproteínas e DNA após sofrer o processo de fracionamento eletroforeticamente devem ser levados para revelação das análises. Como isso acontece? Proteínas que apresentam cor naturalmente, como hemoglobinas e citocromos, são visualizadas sem uso de corantes. No entanto, para que se melhore a visualização das amostras, elas devem ser coradas e descoloridas.

Os corantes têm uma afinidade química com a substância que irão corar (enzimas e proteínas), assim como com o meio em que se encontram, como o gel de agarose, acetato de celulose, gel de poliacrilamida, entre outros. No entanto, a fixação do corante é mais intensa com o produto que está sendo usado do que com o meio usado para fracionar as amostras. Por isso, após o processo de coloração (minutos), é necessário utilizar soluções descorantes que servem para retirar o corante impregnado no meio de separação. Assim, após sucessivas lavagens, revela-se aquelas substâncias ou frações fortemente fixadas com o corante que sobressaem. Esse tipo de técnica permite avaliar as frações com diferentes intensidades de coloração.

Para avaliar quantitativamente as frações de proteínas, lipoproteínas e DNA, faz-se a eluição e a densitometria. A eluição trabalha com uma solução eluidora,

como o ácido acético a 80% por exemplo, que irá desnaturar o meio usado no fracionamento. As frações, uma vez eluídas, irão liberar corantes e tingirão a substância eluidora em diferentes intensidades de coloração. Já a densitometria é uma técnica mais sensível tecnologicamente falando e, também, mais sofisticada, usando softwares e scanners de computadores.



Lembre-se

A quantidade de proteínas eluídas são medidas pelo espectrofotômetro em diferentes comprimentos de ondas. Assim, proteínas, lipídeos e enzimas são eluídas e quantificadas após coloração de suas frações.

Eluição

De forma simples para realizar a eluição, é necessário fazer cortes no acetato de celulose em segmentos que correspondem a cada fração e suas densidades ópticas são medidas em espectrofotômetro (Figura 3.7) com comprimento de onda definido adequadamente.

Figura 3.7 | O Espectrofotômetro



 $Fonte: < http://www2.ib.unicamp.br/profs/depaula/bb123/fotas/5/Espectro\%207.html>. Acesso\ em:\ 6\ mar.\ 2016.$



Assimile

A hemoglobina apresenta-se naturalmente corada, de coloração avermelhada, não sendo necessário o uso de corantes.

Densitometria

A técnica de densitometria permite quantificar de forma eficiente e rápida as frações separadas por eletroforese, técnica muito usada em laboratórios clínicos. O densitômetro é um colorímetro que mede a absorção de luz que atravessa as frações coradas no meio apropriado como suporte (agarose, papel, acetato de celulose). A quantidade de corante absorvida por fração, separadamente, é determinada somando-se as áreas do traçado de cada proteína expressa. Essa determinação relaciona às densidades ópticas e à concentração do corante no suporte ou ao meio de agarose, destacando cores nas bandas fracionadas. Atualmente, esse processo é feito por meio de programas de computadores integrados em equipamentos de densitometria ou aqueles equipamentos automatizados para o método da eletroforese (Figura 3.8).

Figura 3.8 | O Desintômetro



Fonte: http://www.laboratoriowilde.com.br/equipam_001.html>. Acesso: 6 mar. 2016.



Lembre-se

Um densitômetro é um instrumento que mede a densidade óptica. Quando se trata de densitômetro de reflexão, mede-se a quantidade de luz refletida. Já o densitômetro de transmissão analisa a quantidade de luz que conseguiu atravessar o suporte ou o meio transparente.

Coloração e Descoloração

Para que você consiga corar enzimas, proteínas, lipoproteínas e DNA, é necessário usar corantes específicos para cada substância. Quando tratamos de proteínas, pode-se usar azul de bromofenol, negro de amido e a coloração conhecida como Ponceau. As características químicas desses corantes devem

se ligar ao último aminoácido das proteínas, fixando-se nelas e corando-as proporcionalmente às suas concentrações. As enzimas, no entanto, necessitam de substratos enzimáticos específicos, tampões com pH ajustados, aquecimento e luz para serem reveladas.

Quando as lipoproteínas são estudadas, usam-se corantes com afinidade por gordura neutra, esteróis, fosfolipídios, dentre outros tipos de lipídios. Para as lipoproteínas em ensaios de eletroforese e gel de agarose, usa-se o *Sudan Black* e o *Fat Red*. Em um laboratório de análises clínicas, dá-se preferência para o corante *Fat Red*, pois este impregna (gruda) menos na amostra e apresenta maior facilidade para a descoloração.

O fracionamento de bandas de DNA fragmentado é revelado por brometo de etídio, nitrato de prata e azul de metileno. Já a descoloração é variável, conforme o tipo de corante que foi usado.



Reflita

Você já pensou por que há variadas especificações para o estudo da eletroforese? Você pensava que a eletroforese seria uma técnica tão usada rotineiramente em pesquisa e na clínica? Já pensou nas vantagens de custo, eficácia e facilidade de manipulação dessa técnica em relação a outras técnicas de Biologia Molecular?



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto a respeito da eletroforese, consulte os diferentes artigos:

CARVALHO, D. de et al. Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (leguminosae caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Árvore**, v. 30, n. 1, Viçosa, 2006. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rarv/v30n1/28504.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.



Exemplificando

Você percebeu a importância do estudo da técnica da eletroforese? Um tipo de material muito pesquisado pelo método da eletroforese é a hemoglobina e as hemoglobinopatias. Existe um material muito rico no nosso tecido sanguíneo, favorecendo a realização de inúmeros testes para caracterização e diagnóstico de patologias.



Faça você mesmo

Faça uma lista de 5-10 patologias que podem ser diagnosticadas e estudadas pela técnica de eletroforese. Você irá se surpreender!



Vocabulário

Ponto isoelétrico: valor de pH no qual uma molécula, como um aminoácido ou uma proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. O pl é então o pH que proporciona equilíbrio entre as cargas negativas e positivas de grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína.

Sem medo de errar!

A equipe de pesquisa continua tratando dos sinais e sintomas da esclerose múltipla de Andrea e, ultimamente, realizou um lipidograma pelo método da eletroforese de lipoproteína em um meio de acetato de celulose. Nesse resultado, houve uma discreta elevação de lipoproteína (Lp-Tipo 2b), com a diminuição de outro tipo de lipoproteína (Lp-Tipo alfa), quando comparado às frações normais de lipoproteínas. Sabe-se que algumas deficiências genéticas de lipoproteínas estão envolvidas com anomalias esqueléticas e neuromusculares, sintomas característicos da patologia esclerose múltipla. A indicação da eletroforese de lipoproteínas fica restrita à investigação de alguns casos específicos, envolvendo atraso de crescimento e manifestações neurológicas e neuromusculares.



Atenção!

Sabe-se que o perfil de avaliação do lipidograma é de grande importância na avaliação do aspecto do soro e índices de risco de diferentes patologias, como é o caso da esclerose múltipla. De acordo com a patologia investigada, pode associar ainda a dosagem de Apolipoproteínas-A, Apolipoproteínas-B e Lipoproteínas.



Lembre-se

Em situações normais, para verificar o perfil lipídico de um paciente, é necessário utilizar dosagens de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos no lugar da eletroforese de lipoproteínas.

Avançando na prática

4. Descrição da SP

Instrução Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.		
"A esclerose múltipla e os efeitos cardíacos"		
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Entender os diferentes conceitos e técnicas de Biologia Molecular e sua caracterização para aplicação em diferentes patologias.	
3. Conteúdos relacionados	Aplicações de métodos de Eletroforese.	

Pratique mais!

Andrea percebeu que sentia dores de cabeça e na nuca, ficando com a face intensamente vermelha quando falava. Tinha picos

de taquicardia e reclamava de cansaço ao subir escadas. Andrea consultou um cardiologista e ficou de trazer os resultados no próximo encontro com a equipe do estudo da esclerose múltipla.

5. Resolução da SP:

Andrea foi ao cardiologista e foram identificadas alterações em seu eletrocardiograma em teste de esforço na esteira. Além disso, ela se cansou muito durante a realização do teste e pediu para parar. A pressão arterial estava um pouco alta e Andrea estava 10 kg acima do peso estimado para sua idade. Todos esses dados serão passados para a equipe de pesquisa que acompanha Andrea em estudo da esclerose múltipla.



Lembre-se

A eletroforese de proteínas é um método laboratorial que separa as proteínas presentes no plasma humano em frações, de acordo com suas respectivas cargas elétricas. É uma triagem usada na investigação de anormalidades proteícas presentes no sangue.



Faça você mesmo

Busque ao menos 2 trabalhos científicos que trabalhem com a técnica de eletroforese de proteínas. Liste quais são os objetivos do trabalho e a proposta de uso da técnica. Verifique se seu uso envolve algum assunto diferente do que estamos estudando. Pesquise! É importante que você busque variabilidade da técnica e seu amplo uso.

Faça valer a pena

- **1.** A eletroforese é uma das técnicas mais importantes para se trabalhar na investigação de proteínas, enzimas e DNA. A técnica pode ser estruturada, montada e, posteriormente, revelada em um material que envolve um gel de:
- a) Brometo de Etídio.
- b) DNA mitocondrial.
- c) Poliacrilamida (SDS).
- d) Proteínas.
- e) Albumina bovina.

- **2.** A eletroforese é uma técnica antiga e seu uso é mantido na rotina laboratorial e na pesquisa científica. Sua explicação físico-química é relativamente simples. Com relação à explicação da eletroforese, analise as afirmativas:
- I. Emprega-se uma corrente elétrica contínua para separar os componentes de determinadas amostras.
- II. Quanto maior a corrente aplicada, maior a velocidade com que se movimentará uma substância em relação à outra.
- III. A diferença está na composição do número de cargas elétricas positivas ou negativas em aminoácidos que formam as moléculas de proteínas ou enzimas.
- IV. Os componentes com cargas elétricas equilibradas devem permanecer parados no gel de resolução e outros componentes mais carregados eletricamente devem se mover em direção ao eletrodo de carga elétrica oposta.

É correto afirmar que:

- a) As afirmativas I, II, III e IV estão corretas.
- b) As afirmativas I, II e V estão corretas.
- c) As afirmativas II, III, IV e V estão corretas.
- d) As afirmativas I, III e V estão corretas.
- e) As afirmativas I, IV e V estão corretas.
- **3.** O termo "eletroforese" descreve a migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico. No entanto, existe mais de um tipo de realização de eletroforese, incluindo:
- I. Eletroforese em acetato de celulose.
- II. Gel de ágar (agarose).
- III. Gel de poliacrilamida.
- IV. Focalização isoelétrica (EFI).
- V. Eletroforese capilar.

Assinale a alternativa correta:

- a) I, II e III estão corretas.
- b) l e ll estão corretas.
- c) I, IV e V estão corretas.
- d) I, II, III, IV e V estão corretas.
- e) l e V estão corretas.

Seção 3.4

Técnicas de análise: PCR e técnicas de hibridização

Diálogo aberto

Você já sabe que Andrea que havia se casado há menos de um mês e já estava em processo de separação com o marido. Com todo o sofrimento, Andrea ficou isolada e começou a apresentar sintomas de depressão, estresse, síndrome do pânico e, posteriormente, foi diagnosticada como portadora da Esclerose Múltipla (EM). Ela recebeu a proposta de uma equipe de pesquisa de uma universidade para estudar seu estado clínico e a evolução de sua doença.

Andrea está cada vez mais interessada nos estudos dos pesquisadores sobre a esclerose múltipla. Agora, o chefe da equipe de pesquisa pediu que ela fosse ao consultório para que ele fizesse uma análise clínica geral em seu estado de saúde. Ao levar os exames de rotina, os de sangue e urina, e, analisando, o peso corporal, o médico notou alterações hormonais de relativa significância.

Vamos acompanhar, então, o que está acontecendo com o metabolismo dela ou por que os resultados de seus exames de creatinina estão tão alterados. Andrea ficou preocupada, pois sua alimentação não estava sendo tão saudável ou balanceada, então pensou em como resolver todos esses problemas de saúde que acabaram aparecendo após a fase em que se separou de Eduardo. O desafio é entender o que está acontecendo com ela, para que aumente seu peso e altere os exames de sangue e urina.

Todos os conteúdos envolvidos nesta seção irão ajudar você a pensar na importância da Biologia Molecular, da técnica de PCR e das técnicas de hibridização. Além disso, você verá a utilidade das técnicas de Biologia Molecular para ajudar no diagnóstico e tratamento de doenças.

Não pode faltar

Até aqui trabalhamos diferentes técnicas de Biologia Molecular, assim como seus conceitos. Agora, veremos a importância de mais algumas técnicas usualmente trabalhadas na pesquisa e na clínica, que são a técnica de PCR e as técnicas de hibridização (*Southern, Western* e *Northern blotting* e *Fish*). Na verdade, em algum momento desta disciplina, nós já trabalhamos muitos conceitos das referidas técnicas, no entanto, agora iremos fechar esta unidade, dando uma ênfase mais prática a esses conteúdos, facilitando, assim, as manobras laboratoriais.

Como vimos na seção anterior, com o desenvolvimento da eletroforese em gel, vários estudos foram conduzidos, permitindo a imunodetecção de diferentes proteínas. O aparecimento da técnica de *Western blotting* na década de 1970 possibilitou que proteínas separadas por esse método fossem detectadas, caracterizadas e quantificadas. A eletroforese em gel envolve a migração de partículas e trabalha de acordo com o seu tamanho e carga elétrica. De acordo com alguns autores, a técnica de *Western blotting* (WB) trabalhando com imunodiagnóstico, reduz significativamente as reações cruzadas que poderiam ser encontradas em outras técnicas moleculares de diagnóstico.

A técnica de Western blotting (WB), também conhecida como protein blotting ou immunoblotting, é um importante método em biologia molecular, usada para imunodetecção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente. A referida técnica permite, ainda, detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente aquelas que estão em baixas quantidades em determinada amostra. A WB evoluiu da técnica de DNA (Southern) blotting e RNA (Northern) blotting e oferece diversas vantagens: membranas úmidas são muito maleáveis e de fácil manuseio. As proteínas que ficam na membrana necessitam de uma pequena quantidade de reagentes para a análise de transferência. É possível realizar várias repetições do gel para o teste que se deseja realizar e o armazenamento da amostra transferida pode ser por um tempo maior. O protocolo básico de WB pode ser resumido da seguinte forma: preparação das amostras e fracionamento de proteínas, realização da eletroforese em gel, transferência das proteínas separadas do gel para uma membrana adsorvente, bloqueio de ligações que são inespecíficas, adição de anticorpo específico e detecção da reação.

A conhecida técnica do *Northern blotting* é muito usada na pesquisa em biologia molecular para estudar a expressão gênica, ou seja, para verificar se um determinado gene de um genoma é ou não transcrito em RNA e como quantificar isso. Essa técnica tem tal nome devido à similaridade de seu procedimento com o *Southern blotting*, sendo que a diferença principal é que, em vez de RNA, a

substância analisada por eletroforese com uma sonda hibridizadora seria para DNA. Outra diferença na realização do procedimento (quando comparada com o *Southern blotting*) é quando se adiciona formaldeído no gel de agarose, que irá funcionar como um desnaturante.

Preparação das amostras e fracionamento proteico

A preparação de amostras é um passo fundamental no processo de separação de proteínas. Por serem de grande importância as condições iniciais do material, há a necessidade de um modelo experimental adequado com uma preparação cuidadosa de amostras, principalmente em estudos comparativos de proteínas. Como fonte de proteínas podem ser usados: tecidos, culturas celulares, fluidos corporais, plasma ou líquido cefalorraquidiano (LCR). Outros agentes que podem ser estudados são as proteínas de bactérias, vírus e outros agentes infecciosos. Para que se escolha o tecido adequado para determinado estudo, é importante observar as características desse, bem como a pureza e a estabilidade da proteína, tendo o cuidado para que não haja degradação durante a preparação das amostras. Isso tem extrema importância para o resultado do procedimento. O que deve ser lei na realização experimental dessas técnicas é a rápida remoção do tecido, a dissecção e o congelamento em nitrogênio líquido (ou freezer -80° C), para garantir o bom estado do tecido e das proteínas. É necessário se atentar ao uso de tecidos frescos que são provenientes de biopsia. Esses devem estar livres de sanque, de soro e de gordura. Além disso, a adição de enzimas, como proteases e inibidores de fosfatases, evitam a degradação proteica durante a preparação da amostra. Também após a coleta e armazenamento adequado da amostra, ela deve ser homogeneizada e centrifugada, permitindo a remoção de ácidos nucleicos, substâncias que não dissolvem e, também, outras proteínas. Em muitos casos, recomenda-se o fracionamento proteico, com o objetivo de concentrar proteínas de interesse para novos estudos.

A homogeneização é um passo fundamental para a preparação de amostras que são levadas à análise de proteínas. O termo "homogeneização" significa mistura, emulsificação, sendo que esse processo deve alterar as propriedades físicas da amostra sem provocar mudanças em sua composição química. Pode-se caracterizar os métodos de homogeneização em cinco categorias: homogeneização mecânica com bastão e pistilo, ultrassônica, por pressão, por descongelamento e osmótica ou, ainda, lise por detergentes.

A solubilização de proteínas envolve a ruptura das interações entre as proteínas, como, por exemplo, as ligações de moléculas, forças de Van der Waals, ligações iônicas e interações hidrofóbicas, favorecendo, assim, a separação de proteínas na solução. Na tentativa de impedir precipitações proteicas, agregações e modificações – podendo levar à perda de proteínas –, o processo usado na solubilização das amostras envolve o uso de detergentes (como o Triton X-100), agentes redutores,

incluindo o DTT/DTE (ditiotreitol/ditioeritritol), ou o TBP (tributilfosfina) e, ainda, os chamados inibidores de proteases. O uso dessas substâncias, juntamente com um método de ruptura celular adequado e técnicas de dissolução e concentração de proteínas, determina a efetividade da solubilização da amostra.

Durante a análise de proteínas, para que seja feita a preparação do tecido, diminui-se a heterogeneidade da amostra o máximo possível. Quando trabalhamos o Sistema Nervoso Central (SNC), por exemplo, vemos que existe a evidência de lipídios e estes, junto com os ácidos nucleicos, favorecem a obtenção de resultados de boa qualidade. Um dos métodos mais usados é a precipitação seletiva de proteínas na presença de ácido tricloroacético (TCA) ou acetona.

O pH e a força iônica das amostras exercem significativa influência na solubilidade de proteínas. Dessa forma, soluções tampões, soluções salinas e detergentes estão presentes em amostras, podendo interferir nos passos seguintes à separação de proteínas, inibindo o processo de digestão e, ainda, podendo interferir na análise de proteínas.

Para relembrarmos, a eletroforese é um processo em que ocorre a separação de proteínas e outras moléculas, cuja migração de partículas acontece em um campo elétrico (matriz). Para que isso ocorra, é necessário que as partículas sejam dotadas de carga elétrica. Vimos ainda que a poliacrilamida é um dos materiais mais usados para os processos de sequenciamento, pois favorece a separação de fragmentos pequenos, de até 1.000 pb. Como vimos durante seções anteriores, a eletroforese em gel de poliacrilamida (Page) é um método simples e rápido, separando pequenas proteínas de diferentes tamanhos. Vimos também que quando submetemos essas amostras a um campo elétrico em pH neutro, as moléculas de proteína são atraídas para o polo positivo e afastadas do polo negativo. Quando aparece resistência no campo com relação à migração das moléculas, os fragmentos menores podem se mover com maior facilidade do que os maiores, acontecendo, então, uma migração diferenciada dos fragmentos.

Uma fase importante para tornar as proteínas acessíveis para serem detectadas por anticorpos é a transferência destas de um gel para uma membrana adsorvente. A membrana de transferência é colocada em contato com o gel de separação, com a aplicação de uma corrente elétrica. Durante o processo da transferência, o gel está ao lado do eletrodo negativo e a membrana do lado positivo.



Assimile

A ligação das proteínas à membrana se relaciona com as interações hidrofóbicas e com as interações de cargas entre a membrana e as referidas proteínas. Você se lembra de que as proteínas que contêm carga elétrica se movem do gel para a membrana na mesma disposição do gel?

Como resultado desse processo de transferência e ligação à membrana, as proteínas são então colocadas em contato com uma fina camada para detecção.

Na metodologia de WB e outras que envolvem a eletroforese, a eficiência na transferência de proteínas do gel para uma membrana sólida dependerá da natureza do gel, da massa molecular das proteínas (peso) que estão sendo transferidas e do tipo de membrana usada. Ou seja, proteínas com alto peso molecular pouco marcam após revelação de eletroforese SDS-PAGE, resultando em baixa detecção no WB. Você sabia que há vários tipos de membranas disponíveis para que realizemos esse processo? No entanto, a membrana mais usada neste tipo de preparação é a de nitrocelulose, pois apresenta melhor eficiência na ligação das diferentes proteínas estudadas.



Vocabulário

Adsorvente: é a adesão de determinadas moléculas de um fluido (o adsorvido) a uma superfície sólida (o adsorvente). Compreende a impregnação do fluido na interface do sólido (carvão ativado) em contato com o fluido.

Trissomia: consiste em três cromossomos de um tipo específico (o normal são dois cromossomas), causando diferentes alterações no comportamento físico, mental e intelectual da pessoa. A maioria resulta de um número variável de deficiências logo que o indivíduo nasce, sendo frequente a ocorrência de mortes precoces.

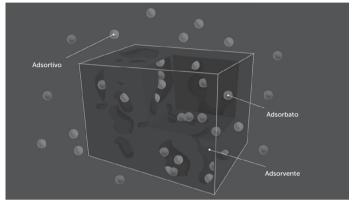
Termociclador: equipamento usado em Biologia Molecular que permite realizar os ciclos de temperaturas necessários para que ocorra a reação em cadeia da enzima polimerase ou amplificação do DNA.



Exemplificando

O carvão ativado, por exemplo, quando colocado em um rio poluído de corantes de uma indústria, consegue adsorver as cores e limpar a água. É um ótimo adsorvente!

Figura 3.9 | Processo de Adsorção



Fonte: http://www.engenhariaearquitetura.com.br/noticias/997/Ar-condicionado-por-adsorcao.aspx. Acesso em: 6 mar. 2016.

Dentre os tipos de eletroforese para WB, o "eletroblotting" tem sido muito utilizado na atualidade. Uma de suas principais vantagens é a velocidade e a transferência completa, quando comparadas à difusão simples e à transferência a vácuo. O eletroblotting pode ser montado pelo método de imersão completa de um sanduíche gel-membrana em uma solução tampão conhecida como transferência úmida. Também pode-se colocar o sanduíche gel-membrana entre papel de filtro absorvente em um tampão de transferência (transferência semisseca). O método mais convencional é o de transferência horizontal semisseca.

Bloqueio de Ligações Inespecíficas

Quando proteínas que não interessam ao seu estudo se ligam fortemente à membrana de nitrocelulose em diferentes condições experimentais, substâncias como o leite seco desnatado, o soro de albumina bovina (BSA), para que se evite ligações inespecíficas entre diferentes proteínas, o Triton X-100 e o detergente Tween 20 são eficientes na remoção de ligações proteicas, brecando uma reação.

Adição de anticorpo

Os mamíferos sempre se protegem contra substâncias tóxicas e invasão de agentes infecciosos de uma maneira bastante eficiente. Como parte do sistema de defesa, células podem ser induzidas para produzir proteínas específicas conhecidas como anticorpos. Os anticorpos se ligam às substâncias "estranhas" (antígenos), neutralizando sua ação no organismo. Em resposta a essa invasão, acontece a síntese

do anticorpo que o reconhece e que possui uma alta afinidade com o epítopo, ou determinante antigênico, imunizando o antígeno. Pelo fato de um antígeno ter epítopos diferentes, normalmente cada uma das células do sistema imune produz um diferente anticorpo contra um dos vários epítopos do antígeno. Desta forma, um grupo de anticorpos que reage com os diferentes antígenos é chamado de anticorpo policlonal. Normalmente, os anticorpos monoclonais ou policlonais são usados para detectar ou "perceber" uma proteína (antígeno ou epítopo) específica, sendo considerado o anticorpo primário da técnica de *immunoblotting*. Após essa reação antígeno/anticorpo primário, a reação é exposta a um anticorpo secundário, direcionando porções específicas do anticorpo primário. Por sua vez, o anticorpo secundário liga-se a uma enzima reveladora, como, por exemplo, a peroxidase, que gera uma mudança de coloração no ensaio (Figura 3.10).

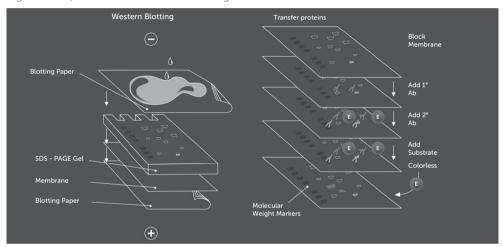


Figura 3.10 | Técnica de Western blotting

Fonte: Conhecer. Disponível em: <www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20agrarias/western.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2016.

Detecção de Antígenos

As proteínas presentes e detectadas nos ensaios de *immublotting* são evidenciadas pelo uso de corantes orgânicos, marcadores fluorescentes e diferentes métodos que usam a coloração de prata e partículas de ouro, prata, cobre e ferro. Agora, guarde isso, pois é importante: o tipo de coloração a ser usado deve sempre ser compatível com a membrana usada para a transferência de determinada proteína.

Na próxima etapa, após a adição do anticorpo primário e anticorpo secundário, são usados dois métodos de detecção de antígenos: o radioativo e o imunoenzimático. O método radioativo envolve a ionização e a autorradiografia

para visualização da ligação antígeno-anticorpo. No entanto, o método apresenta um alto custo e riscos à saúde, devido à radioatividade do material. A quimioluminescência trabalha com a incubação de um substrato fluorescente que, quando exposto a uma enzima reveladora junto ao anticorpo secundário, fornece uma coloração fluorescente. Esta coloração é detectada por um filme ou câmeras que capturam uma imagem digitalizada do WB. A imagem é então analisada por densitometria, avaliando a quantidade de proteína colorida e a quantificação dos resultados, envolvendo valores da intensidade óptica. Atualmente, a quimioluminescência é considerada o método imunoenzimático mais usado para WB.

Hibridização in situ fluorescente (Fish)

Ainda entre as possibilidades de aplicações da Biologia Molecular no diagnóstico, é de grande utilidade os testes de hibridização *in situ* fluorescente (Fish). A técnica de Fish é usada para localizar a presença ou não de sequências de DNA em cromossomos. Ela usa sondas fluorescentes que se ligam às partes do cromossomo que são de alta complementaridade com relação à sequência genética. O uso da microscopia de fluorescência é feito, também, para detectar a ligação de sonda fluorescente aos cromossomos, encontrando, principalmente, características específicas no DNA no caso de aconselhamento genético, medicina e na identificação das espécies.

A Fish pode ser usada, inclusive, para detecção ou localização de alvos específicos de RNA em células tumorais ou amostras de tecido. É eficiente para estudos de trissomia que pode ser encontrada no líquido amniótico, para a amplificação do gene conhecido, como HER-2 em câncer de mama, além de vários testes genéticos usados para a avaliação de doenças hematológicas.



Reflita

Você já pensou num casal que sabe que três sobrinhos de sua família têm a patologia genética da trissomia do cromossomo 21, ou síndrome de Down, e mesmo assim resolve ter um filho?

Com a dificuldade que eles estão tendo para engravidar, um teste como a técnica de Fish poderia delinear o cariótipo da família e dar um índice de probabilidade de o casal vir a ter filhos portadores dessa síndrome ou não.

Reflita sobre a importância da técnica de Fish nessa síndrome e outras patologias.

Técnica da PCR (Reação em Cadeia da Enzima Polimerase)

Como já estudamos anteriormente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais usadas nas diferentes áreas do diagnóstico molecular. O seu conhecimento resultou em uma revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma determinada sequência de DNA de interesse, usando, ainda, métodos automatizados para a análise do genoma. A tecnologia da reação em cadeia da polimerase permite uma série de modificações que possibilitam o seu uso na análise de amostras. Para a realização da técnica da PCR, utiliza-se uma enzima que é estável em diferentes temperaturas, conhecida como **DNA polimerase**. Na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) numa pequena quantidade de DNA e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica-se determinada região de interesse do material genético a ser estudado. Com esse material amplificado é possível realizar diferentes ensaios e um estudo aprofundado das patologias de interesse médico. Isso também pode ser usado na agricultura, no estudo de doenças vegetais, dentre outras situações.



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto a respeito das técnicas de Biologia Molecular estudadas nesta seção, atente-se aos textos:

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR**: aplicações e padronização de reações. Disponível em: http://etallcorp.xpg.uol.com.br/aula2.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

COSTA, A. R. F. da et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiogênica. **Rev. Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 2, Ananindeua, jun., 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.5123/S2176-6223201000020009>. Acesso em: 6 mar. 2016.

Sem medo de errar!

A equipe de pesquisa continua tratando dos sinais e sintomas da esclerose múltipla de Andrea. Em um último exame de rotina que realizou para acompanhamento de condições gerais de seu organismo, notou-se que havia um aumento significativo de creatinina, com a presença de hematúria (sangue na urina). Ainda foi verificado um aumento de peso por volta de 8 kg, desde que houve a separação com Eduardo. Andrea ainda apontou que sua avó e sua prima

por parte da mãe já apresentavam um quadro de insuficiência renal. A equipe médica se preocupou com os antecedentes genéticos e solicitou um estudo mais detalhado, usando a Biologia Molecular. O que foi possível determinar após a realização de testes de Biologia Molecular estudando os fatores que estariam envolvidos nas patologias renais?

Fatores genéticos estão envolvidos nas doenças renais crônicas e até aquela tida como terminal (DRT). Assim, a Biologia Molecular acrescenta novas abordagens ao diagnóstico e à compreensão da patogênese das doenças renais. No caso de Andrea, foi detectada uma nefropatia causada por imunoglobulinas A, IgA ou doença de Berger. A equipe de pesquisa notou que, com a técnica da PCR, é possível obervar a presença de mutação em um gene, associando algumas formas familiares de IgAN15. O quadro clínico é caracterizado por surtos de hematúria macroscópica ou microscópica, apresentando um mal-estar geral, dores musculares, entre outros sintomas. A hipertensão aparece em 10% dos pacientes.



Atenção!

Os fatores genéticos têm influência no desenvolvimento de doenças renais, assumindo um papel modulador da progressão da doença.



Lembre-se

Com relação à mutação detectada nos exames de Andrea, a IgAN é a nefropatia de maior prevalência no mundo. Sabe-se que sua forma familiar foi identificada em pelo menos 35 famílias, com mais de dois membros afetados, nos Estados Unidos, Ásia e Europa.

Avançando na prática

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

acad coregua.		
	"Doenças Renais"	
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Entender os diferentes conceitos e técnicas de Biologia Molecular e sua caracterização para aplicação em diferentes patologias.	
3. Conteúdos relacionados	Técnicas de análise: PCR e técnicas de hibridização.	
4. Descrição da SP	O aumento de peso é nítido na aparência de Andrea. Além da esclerose múltipla, ela apresenta alterações de humor, ansiedade e não consegue parar de comer. No entanto, Andrea não tem se alimentado bem, está comendo o que tiver em casa, sem necessariamente fazer uma refeição saudável. Ao se sentir ansiosa e pensar em tudo o que está acontecendo, come até de madrugada, pois não consegue dormir. Os exames de rotina revelaram que ela tem o diagnóstico de uma doença renal e todos esses fatores de natureza psicológica irão exigir que regule com cuidado sua alimentação. O que pode ser feito neste caso?	
5. Resolução da SP	Buscando a origem de todos os problemas de Andrea, o médico explicou que o estado psíquico e emocional está ainda interferindo em suas atitudes e, consequentemente, no funcionamento de seu organismo. O médico, portanto, precisa regularizar a ansiedade de Andrea por meio de medicação e a prática de exercícios físicos leves, fazendo, ainda, um controle de sua alimentação. É necessário diminuir a ingestão de doces, carboidratos e, principalmente, sal. Ainda devido aos problemas renais, esse médico pede que Andrea não exagere na quantidade de proteína (animal) ingerida. Também deve ter cautela com alimentos que possuam gorduras, ingerindo somente o necessário para o funcionamento do organismo. Ele receitou a medicação de Andrea com relação à hipertensão e ansiedade. Pediu para controlar o colesterol somente na alimentação e continuar com a medicação relacionada à patologia renal. Por fim, pediu que retorne para repetir os exames em 2 meses.	



Lembre-se

As novas abordagens ao diagnóstico e à compreensão da patogênese das doenças renais trabalham três áreas correlatas: Genômica, Proteômica e Metabolômica.

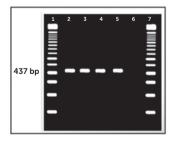


Faça você mesmo

Agora que você já conhece bem as técnicas utilizadas amplamente na Biologia Molecular, chegou a hora de aplicar esses conhecimentos e interpretar os resultados de um gel de eletroforese. Você estudou a importância dessa técnica e os vários testes que são realizados, tendo como resultado o gel de eletroforese. Como você faria para identificar a expressão de proteínas neste gel de eletroforese? Consulte o material que você trabalhou até agora e elabore um laudo dos traços desta proteína (437 bp), incluindo cada um dos componentes a seguir enumerados de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. Cada um desses números são componentes usados no gel e você deve interpretar e responder assim:

Imagine que esses traços proteicos representam o estudo de um medicamento antiúlcera em 5 doses diferentes: uma droga já conhecida ou composto padrão, e a última somente o composto que dissolveu as drogas usadas no tratamento, ou seja, o diluente do medicamento. De acordo com a figura, responda:

- a) Qual é a provável técnica de Biologia Molecular que deve ter sido usada?
- b) O que representa a numeração 437 pb?
- c) O que representam as barras expressas no gel de numeração de 1 e a 7?
- d) O que seriam as numerações 2, 3, 4, 5 e 6?
- e) A significância destas expressões proteicas são diferentes da expressão de 1 e 7? Explique interpretando o gel de agarose apresentado.



Fonte: Santos et al. (2008). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0037-86822008000600022. Acesso em: 6 mar. 2016.

Faça valer a pena

- **1.** Na eletroforese em gel, vários estudos foram conduzidos, permitindo a imunodetecção de diferentes proteínas. Quais técnicas usam a eletroforese para esse estudo?
- a) PCR e Western blotting, RT-PCR, ELISA.
- b) PCR, Western blotting, Southern blotting, FISH, RT-PCR.
- c) RT-PCR, ELISA, FISH, Western blotting.
- d) ELISA, PCR, Western blotting, FISH.
- e) Western blotting, Southern blotting, RT-PCR.
- **2.** A técnica de *Western blotting* (WB) é um importante método em Biologia Molecular usado para imunodetecção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente. A técnica permite:
- a) Detectar, caracterizar e quantificar proteínas, mesmo em baixas quantidades na amostra.
- b) Não consegue detectar e caracterizar proteínas, pois não é uma técnica sensível para este tipo de estudo.
- c) Somente detecta e caracteriza proteínas se estiverem em quantidades significativamente altas.
- d) Somente detecta as proteínas no caso "sim ou não" (ou existe ou não existe a referida proteína).
- e) Não detecta as proteínas, precisa de uma técnica auxiliar, porém, se outra técnica determinar a presença de proteínas, consegue identificála.
- **3.** A técnica de WB oferece diversas vantagens. Com base no conhecimento da técnica, analise as afirmativas:
- I. Membranas úmidas são maleáveis e de fácil manuseio.
- II. As proteínas que ficam na membrana necessitam de uma pequena quantidade de reagentes para a análise de transferência.
- III. É possível realizar várias repetições do gel para o teste que se deseja realizar.

IV. O armazenamento da amostra transferida pode ser por um tempo menor.

Assinale a alternativa correta:

- a) I, II, III e IV estão corretas.
- b) I, II e III estão corretas.
- c) I, II e IV estão corretas.
- d) l e IV estão corretas.
- e) l e III estão corretas.

Referências

BUSS, Paulo M. Genômica e Saúde Pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, Rio de Janeiro, maio/jun, 2002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000300001>. Acesso em: 6 mar. 2016.

CARVALHO, Cristina Valleta de; RICCI, Giannina; AFFONSO, Regina. **Guia de práticas em biologia molecular**. Yendis: São Caetano do Sul, 2010.

CARVALHO, Dulcinéia de et al. Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (leguminosae caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente. **Revista Árvore**, v. 30, n. 1, Viçosa, 2006. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rarv/v30n1/28504.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

COSTA, Ana Roberta F. da et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categoride *Escherichia coli* diarreiogênica. **Rev. Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 2, Ananindeua, jun, 2010.

FARAH, Solange Bento. DNA Segredos e mistérios. Sarvier: São Paulo, 2007.

FAVERO, Paulo Roberto; LEONART, Maria Suely Soares; NASCIMENTO, Aguinaldo José do Nascimento. Eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária no diagnóstico de doenças hemolítica por defeito de membrana. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 38, n. 3, La Plata, jul./set., 2004. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572004000300008>. Acesso em: 7 mar. 2016.

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, São Paulo, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>. Acesso em: 6 mar. 2016.

JOAQUIM, Leyla Mariane; EL-HANI, Charbel Niño. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientiae Studia**, n. 8, v. 1, São Paulo, jan./mar., 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S1678-31662010000100005>. Acesso em: 6 mar. 2016.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO José. **Histologia básica**. 11. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

KARP, Gerard. Biologia celular e molecular. 3. ed. Manole: Barueri, 2005.

MAGALHÃES, Vanda. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, São Paulo, 2005. Disponível

em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552005000200002&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 6 mar. 2016.

NAOUM, Paulo César. **Eletroforeses**: técnicas e diagnósticos. São Paulo: Editora Santos, 2012.

SILVA, Cristiane Miranda da. **Resposta imunológica contra antígenos de anisaquídeos de peixes teleósteos**. 69 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/cristiane%20_miranda_dout.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

SILVEIRA, Evanildo da. **Terapia Gênica**. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br/revista/bio14/entrevista.pdf>. Acesso: 6 mar. 2016.

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR**: aplicações e padronização de reações. Disponível em:http://etallcorp.xpg.uol.com.br/aula2.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

VILAS BOAS, Daniel Siqueroli. Cariótipo multicolorido: mapeamento cromossômico através do uso de sondas de DNA fluorescentes. **Revista Ceciliana**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: http://sites.unisanta.br/revistaceciliana/edicao_01/1-2009-1-17. pdf>. Acesso em: 6 mar. 2016.

WATSON, James et al. Biologia molecular do gene. 7. ed. Artmed: Porto Alegre, 2015.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P. **Biologia molecular básica**. 3. ed. Artmed: Porto Alegre, 2014.

BIOTECNOLOGIA

Convite ao estudo

Nesta unidade, vamos iniciar um estudo mais detalhado sobre a Biotecnologia e suas aplicações.

A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar aos diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e Biotecnologia. A competência técnica está relacionada a conhecer os procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA, as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas. Já os objetivos estão centrados em entender o conceito da biotecnologia e suas aplicações nos diversos setores da saúde, agricultura, genética, bioinformática, meio ambiente, dentre outras aplicações.

Em cada seção desta unidade vamos trabalhar com a Biotecnologia e suas variadas aplicações. Veremos como essa variedade de conceitos pode estar relacionada com as situações diárias e como a Biotecnologia pode ajudar você a entender o conteúdo desta unidade e resolver as situações-problema com o auxílio de materiais pedagógicos, como: o livro didático, a webaula e as leituras que serão sugeridas.

Então vamos lá!

Bons estudos!

Seção 4.1

Biotecnologia e suas definições

Diálogo aberto

Denise pertence a um grupo de pesquisa de uma universidade e realizou importantes estudos que envolvem a Biologia Molecular e a Biotecnologia. Devido ao fato de seu grupo de pesquisa ter obtido resultados muito importantes na aplicação da Biotecnologia, a docente/pesquisadora foi convidada para apresentar seus dados em um congresso internacional. Sendo assim, vamos acompanhar os importantes assuntos que serão abordados nos trabalhos do grupo de pesquisa de Denise sobre a Biotecnologia e a Biologia Molecular, discutindo as aplicações dos resultados encontrados.

Dentre as diferentes áreas de pesquisa que a professora Denise trabalha, uma delas se destacou no estudo de espécies de plantas medicinais que podem ser usadas no organismo humano sem ter efeitos colaterais. Durante o desenvolvimento de sua pesquisa, Denise e sua equipe foram muito elogiados com relação aos resultados que obtiveram. Eles conseguiram descobrir um novo fármaco de importância no tratamento do câncer. Mas qual a importância desse tipo de estudo? Quais técnicas podem ser usadas para se trabalhar com esse assunto? Quais as repercussões desses resultados?

Os conteúdos envolvidos nesta seção irão ajudar a pensar na importância da Biotecnologia e da Biologia Molecular relacionada ao entendimento das aplicações da biotecnologia na saúde e no meio ambiente.

Não pode faltar

O termo "Biotecnologia" pode ser definido como sendo a aplicação de princípios científicos e tecnológicos, envolvendo o processamento de diversos materiais por parte dos agentes biológicos, tendo em vista a aplicabilidade de tecnologia e inovações biotecnológicas voltadas para a melhora do meio ambiente, da saúde das pessoas e da proposta de gerar produtos a partir de matérias-primas que receberam a adição de materiais vivos.

Biotecnologia 171

Para que você entenda um pouco mais sobre a Biotecnologia e suas aplicações, podemos dividir o foco desse assunto em três aspectos principais:

- I. A preparação da matéria-prima para ser utilizada como fonte para os microrganismos.
- II. O processo de fermentação do material em biorreatores, obtendo-se a biotransformação e produção do material desejado.
 - III. Purificação do produto final.

O objetivo principal da Biotecnologia é a obtenção de um determinado produto em escalas industriais, ou seja, em grande quantidade. Assim, a maioria das pesquisas sempre são realizadas para melhorar e aperfeiçoar os três aspectos que citamos para que haja o desenvolvimento da tecnologia. Sabendo que a Biotecnologia possui essa importante finalidade, vale afirmar que a evolução desse conhecimento se deu pelo fato de que vários investimentos iniciais foram realizados trabalhando com desenhos de novos biorreatores, assim como também controlando e monitorando os processos fermentativos. Apesar de sabermos que é desta forma que se consegue um aumento de produção significativo, faz-se necessária a otimização do processo de biotransformação, ponto de fundamental importância da Biotecnologia.

Em um determinado estudo que envolve linhagens variadas de microrganismos capazes de sintetizar produtos de interesse biotecnológico, sabe-se que se tem em "mãos" um material de interesse tecnológico, fazendo com que determinada produção aconteça em níveis correlacionados com uma escala de porte industrial. Não podemos nos esquecer de que algumas vezes pode ocorrer o efeito de mutações aleatórias induzidas por agentes químicos mutagênicos ou ainda por radiação ultravioleta, aumentando os níveis de produção dessa escala. Contudo, deve-se tomar um relativo cuidado com este fato de se modificar geneticamente diferentes organismos, pois o alcance das mutações afeta não só a característica desejada, mas, também, outras importantes vias do metabolismo celular, podendo ser muito prejudicial para a saúde e para o meio ambiente.

Assim, além do efeito indesejado, o processo de obtenção de linhagens é demorado, pois há o envolvimento da expressão de proteínas de interesse terapêutico, ou de aplicação biológica, havendo a necessidade de selecionar e testar os descendentes até que se chegue à amostra esperada, aumentado o tempo e, consequentemente, os custos com esse trabalho. Também pode haver a necessidade da realização de pesquisas com diversos outros microrganismos para que se descubra quais proteínas eles também expressam, e para que seja feito um estudo comparativo, chegando a um resultado esperado.

A revolução da Biotecnologia tradicional chegou até nós através do

desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o que envolve um conhecimento multidisciplinar sobre a biologia celular, a genética, a bioquímica, a biologia molecular, a genética molecular e outras áreas de aplicabilidade, como a área clínica, agrícola, entre outras. Além da sabedoria de microbiologistas e engenheiros químicos e agrônomos em se tratando de escala industrial, a tecnologia do DNA recombinante trabalha com as descobertas que vieram da biologia molecular e da genética. Desta união, então, aparece uma nova área de investimento tecnológico conhecida como "biotecnologia molecular".

Portanto, podemos dizer que a biotecnologia explora processos celulares e biomoleculares para que se desenvolvam tecnologias e produtos variados que podem favorecer a melhora da qualidade de vida. Vale ressaltar que essa área de conhecimento já existe há mais de 6.000 anos, no entanto, hoje, a inovação tecnológica contribui para combater doenças, usar energia mais limpa e em menor quantidade, gerar alimentos, além de favorecer processos industriais mais seguros, limpos e eficientes.

A Biotecnologia

Você já deve ter notado que a Biotecnologia é uma área de conhecimento bastante sábia, pois aproveita os recursos da própria natureza e a composição genética dos seres humanos para poder orientar diferentes áreas da pesquisa que irão ajudar a: diminuir as taxas das doenças infecciosas, bem como os riscos para nossa saúde, favorecendo a detecção de doenças e a ajuda necessária para lutar contra diversas doenças graves e outras ameaças do dia a dia. Assim, o uso de mecanismos biológicos para melhorar os processos de produção industrial é considerado um benefício para a biotecnologia.

Os setores da Biotecnologia são vários e incluem diferentes produtos úteis nas áreas de energia, medicina, saúde, serviços, meio ambiente e produtos agroindustriais. São eles:

1. Setor de Bioenergia e de Biocombustíveis: a tecnologia de produção de enzimas e do etanol de segunda geração (etanol celulósico), bem como as enzimas de tecnologia de produção para fabricar biocombustíveis são importantes produtos que visam ao uso racional da energia e dos combustíveis para confeccionar produtos que agridem menos o meio ambiente e a saúde das pessoas. O biocombustível é aquele de origem biológica não fóssil. Normalmente é obtido por uma ou mais plantas e é fabricado em escala comercial a partir de produtos agrícolas, como cana-de-açúcar, soja, canola, babaçu, mandioca, milho, beterraba, algas, mamona, entre outros. Podemos citar vários exemplos de biocombustíveis, tais como o álcool etanol, a biomassa ou o biodiesel.

Biotecnologia **173**

- 2. Setor de Medicina e Saúde: este setor atua no desenvolvimento tecnológico de proteínas recombinantes, no uso de biomateriais para reparar, regenerar e reconstruir o tecido ósseo e, consequentemente, os órgãos. Há ainda o uso de biomateriais para usos dermatológicos e cosméticos. Utiliza reagentes para diagnóstico em laboratório usando radiomarcadores ou radiofármacos em ensaios de imunoquímica, imunoensaio, citometria de fluxo, determinando as condições clínicas de um paciente, por exemplo. Por fim, atua na construção de vacinas na terapia celular e aquelas que tentam destruir células cancerígenas, vacinas humanas, kits de diagnóstico de diversas patologias, entre outras coisas.
- **3. Setor da Saúde Animal**: foca na confecção de produtos de nutrição e saúde para animais, nos processos biotecnológicos úteis para diagnóstico e tratamento da saúde animal e na produção de vacinas animais e vacinas humanas.
- **4. Setor de Biofármacos**: os usos de proteínas recombinantes, assim como a tecnologia de produção de insulina humana e de outras proteínas terapêuticas, são de grande importância na saúde humana. Os componentes biotecnológicos funcionam como anticorpos monoclonais para uso no tratamento do câncer e anticorpos para uso clínico que são considerados essenciais na terapêutica e nos diagnósticos usados hoje em dia.
- **5.** Diferentes Setores de Serviços: os ensaios clínicos que validam ou aprovam novos medicamentos, o apoio de serviços de pesquisa por agências estaduais e federais e a produção e comercialização de produtos oriundos da Biotecnologia são importantes meios usados no tratamento e diagnóstico de doenças. Nas indústrias agrícolas são destacados os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, mais conhecidos e promissores como PHB e PHB-HV. São verdadeiramente plásticos biodegradáveis gerados a partir da cana-de-açúcar. Há ainda a importância da genômica, pós-genômica e da proteômica e a expressão heteróloga e a clonagem de proteínas, assim como novas tecnologias na criação de animais e vegetais.
- 6. Setores de Indústrias Agrícolas: a grande importância da Biotecnologia agrícola e a melhoria da qualidade de alimentos e dos produtos nutracêuticos ou alimentos que são verdadeiros medicamentos têm a capacidade de proporcionar benefícios à saúde, como a prevenção e o tratamento de doenças. Há ainda a função de bactérias fixadoras de nitrogênio.



Assimile

A fixação biológica do nitrogênio promove vários benefícios para os cultivos agrícolas, dentre os quais destacam-se:

1. Um menor uso de adubos nitrogenados, resultando em economia para o produtor.

- 2. A contribuição para um autofornecimento do nitrogênio utilizado para o metabolismo da planta, diminuindo os impactos do nitrogênio sobre o meio ambiente.
- 3. Uso de plantas conhecidas como leguminosas que seriam como adubos verdes eficientes para fornecer nitrogênio para o solo e melhorar suas propriedades físicas, químicas e biológicas, havendo o aumento de produtividade no solo, incluindo aqueles com deficiência de nitrogênio disponível.

AGEITEC. **Fixação biológica do nitrogênio**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_31_711200516717.html>. Acesso: 3 abr. 2016.

7. Setores do Meio Ambiente: a biorremediação é um processo no qual os organismos vivos como os fungos, algas, plantas ou suas enzimas são usados para remover ou diminuir as contaminações no ambiente. Utiliza processos biodegradáveis para tratamento de resíduos, sendo capaz de favorecer a regeneração do equilíbrio do ecossistema original. Pode trabalhar com o aproveitamento de resíduos e métodos para que seja feito o controle biológico de pragas. Além disso, com a bioprospecção é possível extrair um conteúdo de valor econômico da biodiversidade, formando um patrimônio genético muito rico. Ainda seria a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes obtidas de seres vivos, que tenham um potencial econômico e que possa levar ao desenvolvimento de um produto. Pode-se trabalhar ainda com o tratamento de água, gerenciamento de resíduos sólidos e resíduos industriais.



Exemplificando

As plantas medicinais que são encontradas na natureza são uma matéria-prima que pode ser transformada em medicamento. Desta forma, esse é um exemplo de potencial terapêutico que, se bem aproveitado, pode prevenir e ou curar doenças. Quando administrado na dose correta, não deve apresentar efeitos colaterais, trazendo muitos benefícios para a saúde humana.



Reflita

No ano de 2003, estimava-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis no mercado eram obtidos a partir de fontes naturais, sendo que 25% seriam de plantas, 13% de microrganismos e, por fim, 3% a partir de animais. Hoje em dia, esses números aumentaram

Biotecnologia 175

cerca de 50%, sendo que, quando se trata de medicamentos envolvidos com o tratamento do câncer, estima-se que a grande maioria desses medicamentos sejam obtidos de produtos naturais, advindos de organismos marinhos e terrestres. Considerando ainda a grande quantidade de fármacos atuais que foram desenvolvidos a partir de moléculas biológicas, torna-se extremamente importante o papel da bioprospecção na área da farmacologia. Você já pensou na importância desse arsenal terapêutico que temos à disposição? Pense e reflita a importância desse assunto para nossas vidas.



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto a respeito da importância da bioprospecção (conceitos e normas), do envolvimento da biodiversidade, do patrimônio genético, entre outros assuntos, acesse o link:

UFRGS. **Bioprospecção**. Disponível em: http://www.ufrgs.br/ patrimoniogenetico/conceitos-e-definicoes/bioprospeccao>. Acesso em: 3 abr. 2016.



Faça você mesmo

Busque trazer exemplos em que a Biotecnologia aplicada no setor de bioenergia e de biocombustíveis possa trazer benefícios para o meio ambiente e, consequentemente, para a saúde das pessoas.

Sem medo de errar

O fármaco que a equipe de pesquisa comandada pela professora Denise identificou foi um medicamento que inibe o crescimento de células tumorais, sendo então um importante aliado para o tratamento do câncer. As técnicas usadas para obtenção desse fármaco foram: técnica de western blotting, na preparação da amostra, SDS-PAGE, membrana bloqueio, sondagem com anticorpos e detecção. Para cada etapa do processo foram usados os protocolos e reagentes apropriados para que a equipe conseguisse atingir os resultados de alta qualidade, determinando o componente antineoplásico. A grande importância é que, como os efeitos colaterais são praticamente nulos, os pacientes terão melhor qualidade de vida, conseguindo se alimentar e lutar de forma positiva contra a doença. Assim, a indústria se propôs a fabricar lotes desse medicamento para que logo possa ser comercializado para pacientes que esperam há anos um tratamento eficaz para essa patologia.



Atenção!

Você sabia que existe uma carreira de Biotecnologia? Já ouviu falar?

O profissional formado em Biotecnologia pode aplicar novas tecnologias em diferentes áreas, como: saúde, alimentação, ambiental e química. Quais seriam as aplicações dessa carreira com relação ao mercado de trabalho?

- Você pode trabalhar na busca de novos tipos e variedades de plantas que são consideradas mais resistentes a determinado tratamento, ou herbicida, dificultando sanar problemas da agricultura.
- Pode entender sobre a utilização de microrganismos na produção de produtos úteis à saúde do ser humano.
- Desenvolve técnicas para que se consiga combater microrganismos que são considerados prejudiciais ao ser humano.
- Pesquisa os efeitos e reações adversas que podem ser encontrados em medicamentos e substâncias químicas que atuam em células do organismo humano.
- Entende a importância do melhoramento genético para obtenção de novos produtos que sejam viáveis na agricultura, na saúde do homem e dos animais.
- Associa o emprego de microrganismos com a prevenção de doenças na produção de vacinas e medicamentos.
- Controla o crescimento microbiano que pode acontecer em indústrias alimentícias e farmacêuticas, prejudicando a fabricação de produtos que seriam tóxicos ao organismo humano.
- Pode ser atuante na avaliação e na prevenção da contaminação do solo e da água.
- Aprimora técnicas que possam combater pragas e doenças em animais e na agricultura.
- Desenvolve novos processos biotecnológicos para o aprimoramento da agricultura.

Biotecnologia 177



Lembre-se

O biotecnologista irá atuar no mercado de trabalho não apenas como um cientista, mas como um profissional com qualificação e que tenha interesse em desenvolver produtos. Assim poderá aproveitar, por exemplo, a biodiversidade brasileira, que talvez seja a maior do mundo, porém poucas vezes isso transformou-se em produto.

Avançando na prática



Lembre-se

Antes de começar a ler a situação-problema a seguir é importante que você tenha em mente os conceitos da biotecnologia e as aplicações da importância da Biotecnologia na vida das pessoas, dos animais e do meio ambiente. Foque seus esforços para abrir o leque de aplicações com relação a importância de organismos geneticamente modificados e onde eles podem ser efetivos para a melhoria do meio ambiente e, consequentemente, na saúde das pessoas.

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"Controle da Dengue"	
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.
2. Objetivos de aprendizagem	Os objetivos são entender o conceito da Biotecnologia e suas aplicações nos diversos setores da saúde, agricultura, genética, bioinformática, meio ambiente, dentre outras aplicações.
3. Conteúdos relacionados	Fundamentos de biotecnologia e suas aplicações.
4. Descrição da SP	A cidade de Piracicaba enfrentou uma epidemia da dengue no ano de 2015 assim como em anos anteriores. Então, com o auxílio da Biotecnologia, pesquisadores desenvolveram mosquitos geneticamente modificados para tentar controlar essa epidemia, usando armadilhas de captura e um aplicativo de celular para identificar e monitorar o número de mosquitos capturados, analisando se eram machos e fêmeas e se eram da espécie causadora da dengue. Como acontece esse controle?

(continua)

5. Resolução da SP

Depois de soltar mosquitos Aedes aegypti geneticamente modificados, que devem ajudar a conter a propagação da dengue, a cidade de Piracicaba (a 164 guilômetros de São Paulo) implantou recentemente um projeto-piloto que usa armadilhas de captura e um aplicativo de celular para identificar e monitorar os mosquitos. A "armadilha" é composta por um recipiente com água e uma lâmina com uma substância atraente na qual o mosquito (principalmente a fêmea) entra para botar ovos, mas fica preso e morre. Assim, o aplicativo permite que o agente de saúde identifique imediatamente se o inseto preso na armadilha é macho ou fêmea e transmita em tempo real os dados para o centro de controle. Desta forma, consegue-se usar a biotecnologia a favor do controle de uma epidemia e, conseguentemente, na saúde das pessoas daguela cidade. Posteriormente, após esse projeto, pode-se expandir o uso do aplicativo nas demais regiões do país afetadas pela dengue e outras doenças causadas pelo Aedes aegypti.



Faca você mesmo

Busque mais informações sobre a Biotecnologia que vem sendo trabalhada em função das doenças causadas pelo mosquito *Aedes aegypti* e faça uma relação do investimento no controle dessa epidemia. Leia artigos a respeito para que você possa ter uma maior quantidade de dados com relação a esse assunto:

GUIMARÃES, Maria; NOGUEIRA, Pablo. Um vilão de muitas caras. **Revista Fapesp**, jun., 2015. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2015/06/016-23_CAPA-Dengue_232.pdf?dc5f6f>. Acesso em: 3 abr. 2016.

Faça valer a pena!

1. O termo "Biotecnologia" pode ser definido como	sendo a aplicação
de princípios	envolvendo o
processamento de materiais por parte dos	
tendo em vista a aplicabilidade de	e inovações
biotecnológicas voltadas para a melhora do	da
das pessoas e da proposta de gerar _	
a partir de matérias-primas. Assinale a afirmativa	que apresenta a
resposta correta para completar a sentença:	

a) Básicos e científicos; agentes químicos; tecnologia; bem-estar; saúde; defensivos agrícolas.

- b) Científicos e dinâmicos; agentes físicos; tecnologia; meio ambiente; saúde; estratégias de controle.
- c) Científicos e tecnológicos; agentes químicos; tecnologia; contexto ambiental; economia; produtos.
- d) Científicos e tecnológicos; agentes biológicos; tecnologia; meio ambiente; saúde; produtos.
- e) Básicos e científicos; agentes químicos; tecnologia; ecossistema; saúde; produtos.
- **2.** Para entender um pouco mais sobre a Biotecnologia e suas aplicações, pode-se dividir o foco desse assunto em três aspectos principais:
- I. A preparação da matéria-prima para ser utilizada como fonte para os microrganismos.
- II. O processo de fermentação do material em biorreatores, obtendose a biotransformação e a produção do material desejado.
- III. A purificação do produto final.

Assinale a alternativa correta:

- a) Apenas as afirmativas I e II estão corretas.
- b) As afirmativas I, II e III estão corretas.
- c) Apenas as afirmativas II e III estão corretas.
- d) Apenas a afirmativa I está correta.
- e) Apenas a afirmativa II está correta.
- **3.** A Biotecnologia trabalha no sentido de obter um determinado produto em escalas industriais, ou seja, em grande escala. Assim, a evolução da Biotecnologia depende, em grande parte, de:
- a) Uma otimização do processo de biotransformação, garantindo um aumento de produção significativo.
- b) Um produto de origem natural vindo de microrganismos, plantas e animais.

- c) Condições atmosféricas e ambientais favoráveis.
- d) Uma otimização financeira que garanta que se compre matériaprima para a grande escala de produção.
- e) Um número de espécies animais e vegetais, assim sendo da biodiversidade local.

Seção 4.2

Aplicações biotecnológicas atuais

Diálogo aberto

O laboratório de Denise foi mais uma vez premiado pela magnitude dos resultados obtidos na pesquisa com o *Aedes aegypti*, agente causador da dengue, da *Chikungunya* e do *Zika* vírus. Juntamente com os resultados de patenteamento de fármacos que exercem ação contra o câncer, outro grupo de alunos da equipe de Denise que trabalha no sequenciamento genético do *Zika* vírus foi convidado para apresentar seus resultados em congresso. Na verdade, desde que houve a epidemia de dengue nos anos de 2013 e 2014, a equipe uniu esforços para montar um projeto de maior escala e trabalhar no sequenciamento do material genético do *Zika* vírus.

Vamos, então, acompanhar quais técnicas foram usadas pelo grupo de pesquisa de Denise para realizar o sequenciamento do material genético do agente biológico causador da dengue e Zika vírus e os avanços biotecnológicos que esse sequenciamento pode trazer para a cura de doenças que envolvem o Aedes aegypti.

Não pode faltar

A Biotecnologia abrange um conteúdo multidisciplinar que envolve diferentes áreas de conhecimento, como a bioquímica, genética, microbiologia aplicada e engenharia bioquímica, favorecendo a compreensão sobre os bioprocessos. Ela usa ou trabalha com células ou sistemas bioquímicos em processos de produção de bens ou de prestação de serviços, visando à identificação e otimização de um produto. Além disso, se destaca no que se refere ao conteúdo tecnológico, sempre lembrando que os primeiros processos industriais estiveram fundamentados na ação de microrganismos e a grande maioria daqueles consagrados usa microrganismos originais ou modificados geneticamente.

O trabalho que envolve processos, produtos e serviços usando diferentes microrganismos é importante, por exemplo, na produção de substâncias de

interesse comercial, como: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis por processos fermentativos. Há casos em que o produto pode ser ainda o próprio microrganismo, como no caso da produção de levedura, de panificação e produtos de uso agrícola. Ou ainda, os microrganismos são usados em processos de tratamento de resíduos e efluentes urbanos e industriais, em processos de biorremediação de solos contaminados.

Agentes Biológicos e Bioprocessos Artesanais e Industriais

O agente biológico deve ser selecionado e usado no momento da transferência da realização do bioprocesso quando se tem uma demanda para a escala industrial, em função de qualidades diversas, como:

- Atividade de síntese elevada, ou seja, capacidade de converter rapidamente o substrato em produto com altos rendimentos e elevados valores de produtividade.
- Manutenção da estabilidade sob condições ambientais extremas, mesmo com elevada pressão osmótica do próprio meio. Em elevada temperatura e força iônica, o material ainda é resistente a substâncias tóxicas, que podem aparecer no processo de tratamento da matéria-prima ou já em fase de aplicação do tratamento.

As técnicas da biologia molecular aprendidas até aqui, aliadas à tecnologia, são usadas para melhorar as propriedades de um agente biológico. É importante ressaltar que essas técnicas são usadas quando necessárias, para maximizar o potencial produtor dos agentes biológicos responsáveis pelas transformações e aplicações biotecnológicas.

Você se lembra da penicilina, um antibiótico descoberto anos atrás para tratamento das infecções? Então, ela gerou o impacto de manipulações genéticas, moleculares e químicas que, associadas ao desenvolvimento de meios, favoreceu a melhoria do processo. A combinação de técnicas que otimizaram o processo fermentativo resultou em um aumento no rendimento em penicilina da ordem de três vezes em magnitude (de 0,06 a 26 g/L). Assim, o fato de se conhecer as características ou, ainda, as propriedades físico-químicas desses biocatalisadores visando sua melhoria, forneceu inúmeras vantagens no desenvolvimento de bioprocessos industriais.

Quando usamos células vivas na realização de bioprocessos de interesse, devemos, primeiramente, identificar as características desejadas dos agentes biológicos e buscar as linhagens arquivadas em coleções de cultura por meio do isolamento de amostras naturais, envolvidas nos procedimentos de seleção e melhoramento de linhagens produtoras.

No cultivo de células microbianas, animais e vegetais em laboratório, é necessário, para se conhecer suas características/propriedades, determinar o seu crescimento. Uma variedade de nutrientes é usado para o referido crescimento, incluindo fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, vitaminas e sais minerais.

Organismos Geneticamente Modificados

Os agentes biológicos, principalmente microrganismos usados em processos industriais, devem ser preservados e conservados de maneira adequada. Assim, diferentes áreas de interesse estão envolvidas no estudo de organismos geneticamente modificados:

- A biologia molecular aplicada, que trabalha com a origem, transformação e interação dos genes e seus produtos expressos na forma de proteína, favorecendo o controle do trabalho genético, assim como a confecção de agentes biológicos com excelentes combinações conhecidas como 'células-biorreatoras'.
- A bioengenharia, que combina métodos analíticos e matemáticos para que se quantifique fluxos em modelo in vivo usando animais, com o auxílio de técnicas da biologia molecular, tendo como objetivo a programação das modificações genéticas, que devem melhorar as propriedades celulares e, consequentemente, suas aplicações. Assim, por meio de técnicas específicas, é possível que se mantenha todas as características da população microbiana de interesse, garantindo a qualidade do produto. A manutenção e a preservação de microrganismos são etapas de extrema importância quando se trabalha com os organismos geneticamente modificados. Existe a preocupação para que se assegure a viabilidade e a eficácia de atividade das moléculas obtidas, bem como a prevenção das mudanças genéticas "drásticas" que podem levar à redução ou perda das propriedades fenotípicas desejadas. As técnicas de manutenção e a preservação de microrganismos trabalham com a inclusão de repiques periódicos dos materiais, conservação deste em parafina e em glicerol e, ainda, a liofilização e a criopreservação para garantia da preservação do material.

Após a inoculação, a célula produz a energia que é usada pelo próprio metabolismo para trabalhar as próprias reações de biossintética e de manutenção energética. As moléculas consideradas combustíveis, que são os carboidratos, lipídios e proteínas, são utilizadas pela célula e contêm elevado nível de energia química.

Muitas células vivas precisam do oxigênio para manter seu metabolismo.

Assim, em bioprocessos que trabalham com microrganismos aeróbios, o oxigênio essencial para esses organismos é suprido na forma de bolhas de ar, por meio de um compressor. Já o inverso, em bioprocessos anaeróbicos, os microrganismos obtêm o oxigênio metabólico por meio de substâncias que contêm a molécula de oxigênio ligada molecularmente. Se essas exigências nutricionais não forem atendidas, o processo pode sofrer desvios no metabolismo celular ou até ser interrompido, com perda da viabilidade celular.

Dentro dessa concepção, se o agente biológico do processo for um microrganismo que possui característica que confere agregação (floculação), pode acontecer de se fazer uso de novas configurações de biorreatores mais compactos e menos intensivos em energia, suprimindo equipamentos de separação de células onerosas, viabilizando o processo e tornando-o mais econômico. Ainda podem ocorrer as associações de sistemas reacionais que separam os produtos simultaneamente, sendo também desenvolvidas práticas, como: a separação cromatográfica de enzimas em suportes de colunas cromatográficas, a destilação a vácuo e os sistemas de fermentação que trabalham acoplados a módulos de membrana, com os consequentes benefícios técnicos e econômicos de bioprocessos.

Nutrição dos Microrganismos

As necessidades nutricionais dos diferenciados microrganismos são muitas, uma vez que eles apresentam diferenças peculiares, como a própria capacidade de sintetizar os constituintes celulares a partir de nutrientes simples. A sobrevivência de todos os microrganismos está relacionada com a obtenção de água, de fontes de energia, de carbono, de nitrogênio e de elementos minerais, bem como a disponibilidade de oxigênio.

As fontes de energia para suprir as necessidades nutricionais de microrganismos estão relacionadas com:

• Fontes de Carbono: o carbono é um elemento essencial e necessário para a biossíntese de compostos celulares vitais, como, por exemplo: carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos. A forma de utilização dos compostos está relacionada àquela que cada microrganismo em particular usa para seu próprio suprimento de energia. Os compostos de carbono, como C1 (CO, CO2, formaldeído, metanol, metilamina), as macromoléculas complexas (glicogênio, amido, proteínas, celulose, ácidos nucleicos) e os variados compostos orgânicos da natureza podem ser utilizados como energia por microrganismos, desde que esses organismos possuam os sistemas enzimáticos e de transporte adequados. Compostos orgânicos, como aminoácidos e proteínas, servem tanto como fonte de carbono,

como de nitrogênio. Os carboidratos são as principais fontes de carbono e energia para a grande maioria dos microrganismos, sendo, então, a glicose o combustível utilizado, seguida pela frutose, manose e assim por diante. Com a tecnologia do DNA recombinante, aumenta-se a importância de fontes de carbono pouco utilizadas anteriormente como matéria-prima de microrganismos. Como, por exemplo, tem-se a crescente utilização das leveduras para a produção de enzimas recombinantes, favorecendo o seu crescimento inicial em fontes de carbono e a indução do gene de interesse com metanol

- Fontes de Nitrogênio: o nitrogênio é um constituinte essencial às células, pois está envolvido na formação de aminoácidos e ácidos nucleicos. Com relação à assimilação de fontes de nitrogênio, os microrganismos apresentam grande diversidade na forma de utilização dos compostos. A fonte de nitrogênio é muitas vezes de natureza autótrofa, sendo os microrganismos capazes de utilizar nitrato, amônio e, algumas vezes, nitrogênio gasoso como única fonte de nitrogênio. Outros podem obter suprimento deste elemento na forma de aminoácidos ou de bases purínicas e pirimidínicas.
- Fontes de Minerais: são essenciais para suas funções fisiológicas e estruturais, como os compostos: hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, enxofre e cloro. Além disso, há a necessidade da presença de elementos-traços, que desempenham papel fundamental como constituintes de enzimas e coenzimas. Assim, estão incluídos como elementos-traços: manganês, cobre, zinco, cromo, níquel, cobalto e boro, e são, em geral, necessários em baixas quantidades. Vale lembrar que a água é essencial para a atuação das diferentes enzimas, na dissolução de materiais orgânicos e inorgânicos e, principalmente, como "reagente" na grande maioria dos processos metabólicos. Os nutrientes inorgânicos trabalham com o metabolismo, favorecendo a síntese de compostos fundamentais para o funcionamento celular. Ainda são considerados cofatores para reações enzimáticas, estimulando o metabolismo. Podem, também, inibir o metabolismo e, finalmente, favorecer as propriedades osmóticas da célula.
- Fatores de Crescimento: diversos microrganismos são incapazes de sintetizar substâncias orgânicas simples e complexas, vitaminas ou, até mesmo, aminoácidos, que são verdadeiros precursores e/ou constituintes de enzimas e coenzimas. Sempre que necessário, essas substâncias devem ser supridas ao meio de cultura para que os microrganismos tenham condições de crescer naquelas condições.

Cultivo in vitro de Células Animais

O cultivo de células teve início em 1907 sendo desenvolvido um método que permitisse estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente totalmente controlado. Até hoje essa técnica é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios.

A proliferação *in vitro* é diferente daquela *in vivo*. Por mais próximo que o modelo esteja da realidade, o modelo in vitro ainda pode causar problemas para o desenvolvimento celular, pois é difícil a mimetização do ambiente orgânico.

Ainda existem muitas vantagens no modelo experimental de cultura de células. O controle das condições experimentais, como as condições do ambiente, a homogeneidade da amostra – quando comparada ao uso de animais em experimentos – e a economia, são algumas das grandes vantagens dessa técnica.

À medida que uma cultura de célula é replicada, as células com maior capacidade de se proliferar irão predominar na área de cultivo. Isso acontece devido às células não se adaptarem bem ao cultivo celular. Ainda pode ocorrer algum trauma no processo de desagregação celular, fazendo com que não se atinja uma taxa normal de proliferação celular. No entanto, essas células ainda não perderam suas características de tecido de origem, por apresentar alta proliferação celular. A esse tipo de proliferação celular dá-se o nome de "linhagem celular contínua", sendo muito usada em pesquisa, pois pode ser mantida em cultura por um grande período de tempo (quando comparada às células primárias, guardando características do tecido original). Diferentes linhagens celulares contínuas podem se propagar e crescer sem, no entanto, perder suas características de um tecido original.



Exemplificando

Esse tipo de célula é usada em pesquisa e na fabricação de vacinas, como no caso da linhagem MRC-5, vindo do tecido do pulmão de feto humano para fabricação da vacina contra a rubéola, por exemplo.

Quando você percebe, no entanto, que as células perdem as semelhanças morfológicas e genéticas com relação ao tecido, significa que as características genéticas delas sofreram algum tipo de alteração. Esse tipo de situação dá origem às células conhecidas como "células transformadas".

As células transformadas em cultura, muitas vezes, sofreram a ação de substâncias químicas, de vírus ou de agentes físicos, como a luz ultravioleta. Todos esses agentes podem induzir mutações na linhagem celular, modificando a composição genética e interferindo no controle do ciclo celular, originando os chamados proto-oncogenes e genes supressores de tumor. A mutação pode por

sua vez resultar de uma superexpressão de proto-oncogenes ou da inativação de genes supressores de tumor, levando a uma proliferação exacerbada das células.



Assimile

As células transformadas também podem ser obtidas de tecidos em mutação, como é o caso de tecidos tumorais, por exemplo, e das células HeLa obtidas de um tumor de útero humano. As células de HeLa são morfologicamente e geneticamente diferentes do tecido original e se proliferam infinitamente quando em condições de cultura de células.

Essas células são usadas em estudos de citotoxicidade, controle de qualidade, dentre outros ensaios. As células transformadas não são muito usadas na produção de vacinas, devido à probabilidade do risco de o DNA alterado dessa célula vir a alterar o DNA do indivíduo que faz uso dessa vacina. Uma das células mais usadas na fabricação de vacinas é chamada de VERO, no entanto, o controle com relação à concentração de DNA presente no lote de vacina é rígido, sem poder exceder 10 ng de DNA estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS).



Reflita

Você já pensou o que são e qual seria a função dos marcadores moleculares? Marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos entre organismos geneticamente relacionados, sendo ainda amplamente utilizados em estudo populacional, mapeamento e análises de similaridade e, ainda, distância genética.

Assim, os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de se detectar um polimorfismo genético presente no DNA. Um marcador molecular é definido como uma característica ou fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA. Os referidos marcadores moleculares são características de DNA que mostram a diferença entre dois ou mais indivíduos, sendo uma característica herdada geneticamente. Existem importantes razões para que os marcadores moleculares sejam vantajosos em relação aos marcadores morfológicos convencionais.

No entanto, o uso dos marcadores moleculares permite que a seleção e os novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração populacional, aumentando a viabilidade e a eficiência de um programa de melhoramento genético. Podem ser associados ou não a um gene, ou a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que as gerações subsequentes possam obter essas características,

comprovando e garantindo sua natureza genética. Marcadores moleculares de DNA são usados para sinalizar genes de resistência a doenças; vetores, como insetos e pragas; melhoramento genético dos pais; desenvolvimento de mapas genéticos; seleção de resistência a patógenos ainda inexistentes em determinada região; estudos de interação genótipo com relação ao ambiente em que vivem; processos legais; dentre outros.



Vocabulário

Polimorfismo genético: é uma variedade fenotípica que pode ser separada em classes definidas e distintas. Envolve um controle genético sem sofrer grandes influências de fatores ambientais. Exemplos: sistema sanguíneo ABO (4 fenótipos: A, B, AB, O), diferença entre destro e canhoto, presença ou não do dente 3º molar, entre várias outras opções.

Entomologia: ciência que estuda os insetos sob os mais variados aspectos e relações, seja com o homem, as plantas, os animais e o meio ambiente.

Micropropagação de Vegetais

A propagação vegetativa trabalha com a multiplicação assexuada de partes de plantas, como as células, os tecidos e os órgãos, originando indivíduos que podem ser idênticos à referida planta-mãe. É uma técnica que obtém os dados genéticos por meio de programas de melhoramento genético.

As principais vantagens da propagação vegetativa de espécies florestais e vegetativas incluem a formação de plantios clonais de alta produtividade e certa uniformidade, visando, assim, a melhoria da qualidade da madeira e de seus produtos, além da multiplicação de organismos que são resistentes às pragas e doenças e aos componentes genéticos aditivos e não aditivos, resultando em ganhos dentro de uma mesma geração de seleção.

A micropropagação é considerada uma técnica de reprodução de plantas a partir de órgãos diferenciados, que são: gemas, embriões e partes de órgãos ou células em cultura estéril e "in vitro". É uma técnica com diferentes possibilidades para propagação comercial de plantas, possibilitando a multiplicação de um grande número de indivíduos a partir de poucas mudas ou matrizes em um pequeno espaço de tempo e pequena área de laboratório. A micropropagação ainda pode auxiliar nos programas de melhoramento genético, antecipando a resolução de um possível problema em determinada espécie.

A micropropagação usada na produção comercial de mudas e de espécies

florestais deu um resultado bastante satisfatório para espécies e híbridos de *Eucalyptus* de alto valor comercial e de difícil enraizamento, favorecendo o reflorestamento e a manutenção do ambiente vegetativo.



Pesquise mais

Para aprofundar o assunto a respeito da micropropagação vegetal, leia o texto a seguir:

WENDLING, Ivar. Propagação Vegetativa. **I Semana do Estudante Universitário**, Corumbá, 2003. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50925/1/Wendling.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.

Leia o texto que se refere ao cultivo de células:

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina R. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia; CAPUTO, Luzia; AMENDOEIRA, Regina. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde. v. 2. EPSJV: Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf. Acesso em: 3 abr. 2016.

Sem medo de errar

A equipe de pesquisa da professora Denise trabalha no sequenciamento genético do *Zika* vírus. Na verdade, desde que houve a epidemia de dengue dos anos de 2013 e 2014, a equipe uniu esforços para montar um projeto de maior escala e trabalhar no sequenciamento do material genético do *Zika* vírus. Vamos acompanhar quais as técnicas foram usadas pelo grupo de pesquisa de Denise para realizar o sequenciamento do material genético do agente biológico causador da dengue e do *Zika* vírus.

A referida professora e sua equipe sequenciaram o material genético do *Zika* extraído de uma pessoa que desenvolveu a doença em Campinas. O sequenciamento do material genético do vírus revelou um genoma enxuto. Determinou-se a ordem correta das bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA do *Zika* vírus. São cerca de 10,6 mil unidades (nucleotídeos) compondo uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA). Essa fita abriga ao todo apena seis genes, que são capazes de produzir 10 diferentes proteínas. Sabe-se ainda que alguns genes são polivalentes.



Atenção!

Leia a respeito dos marcadores moleculares e sua influência biotecnológica:

EMBRAPA. **Marcadores moleculares** – **DNA**. n. 3., dez. 2000. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03_4. htm e a reportagem a respeito do genoma do Zika vírus em: http://agencia.fapesp.br/2016/02/19/zika-em-expansao/ e ainda em: http://agencia.fapesp.br/epidemia_de_zika_agiliza_mecanismos_de_financiamento_de_pesquisa_no_pais/22679/. Acesso: 3 abr. 2016.



Lembre-se

Um dos grupos mais usados como marcador molecular, e que foi desenvolvido no início deste tipo de estudo, foi o Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLPs). Quando clivados com enzimas de restrição, expressam, por eletroforese, as diferenças de comprimento de fragmentos de DNA, observadas por meio da hibridização desses fragmentos com sequências homólogas do DNA marcado com radioatividade ou por luminescência.

Avançando na prática

Pratic	

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"A Microcefalia e o <i>Zika</i> vírus"				
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.			
2. Objetivos de aprendizagem	Conhecer os procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA; conhecer as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas; e conhecer os fundamentos e aplicações da Biotecnologia.			
3. Conteúdos relacionados	Agentes biológicos usados em aplicações biotecnológicas; bioprocessos artesanais e industriais; cultivo <i>in vitro</i> de células animais; marcadores moleculares; micropropagação de vegetais; organismos geneticamente modificados.			

(continua)

4. Descrição da SP	Sabe-se que existe uma suspeita do <i>Zika</i> vírus estar relacionado com dados de microcefalia em diversas regiões do Brasil, principalmente na região nordeste. Dessa forma, a equipe coletou o líquido amniótico de gestantes para realizar o teste e verificar se há a relação entre a microcefalia e o aparecimento do <i>Zika</i> vírus. Qual a análise deve ser feita neste caso?
5. Resolução da SP	O mapeamento genético do vírus foi feito em um laboratório da professora Denise. Os pesquisadores coletaram amostras de líquido amniótico, que é o líquido que envolve o bebê durante a gestação, dentro da barriga da mãe. O material foi retirado de duas mulheres grávidas de bebês diagnosticados com microcefalia. O líquido amniótico passa por um teste para identificar a presença de microrganismos e, nesse caso, um vírus que foi encontrado em grande quantidade foi o do Zika vírus. A coleta do líquido amniótico é feita com mais de dois meses depois que as gestantes já estiverem com os sintomas do vírus. E os vírus continuavam ativos. Neste caso, a equipe coordenada pela professora Denise primeiro realizou exames do tipo PCR, que identificam o DNA viral no sangue e, depois, por meio de um maquinário de sequenciamento genético, conseguiram montar toda a sequência genética, a verdadeira identidade do vírus. Assim, o DNA completo do vírus foi decifrado e realmente é encontrado no líquido amniótico de gestantes com microcefalia no Brasil. O que foi descoberto é que o vírus que infectou as gestantes na Paraíba é idêntico ao que apareceu na Polinésia Francesa, em 2013.



Lembre-se

Ainda existe uma questão a entender em relação ao vírus com a microcefalia. São os dois temas fundamentais do ponto de vista da urgência. Pensa-se assim no desenvolvimento de uma vacina, por meio de estudos de entomologia, para entender a genética do mosquito e sua capacidade de infectar as pessoas.



Faça você mesmo

Agora que você já conhece bem a importância do sequenciamento genético de um determinado microrganismo e sua aplicação no controle de doenças, relate aqui qual seriam outras doenças que poderiam ser trabalhadas desta forma. Consulte o material que você trabalhou até agora e liste 3 situações que podem ocorrer em humanos, animais e na agricultura/plantas, colocando o que já vem sendo estudado com o auxílio da Biologia Molecular e da Biotecnologia.

Faça valer a pena!

- **1.** A Biotecnologia abrange um conteúdo multidisciplinar que usa ou trabalha com células ou sistemas bioquímicos em processos de produção de bens ou de prestação de serviços, tendo como objetivo:
- a) O aumento de cromossomos de uma célula visando à reprodução celular
- b) Prestação de serviço visando à identificação e otimização de um produto.
- c) Obtenção de mais resultados dentro de um laboratório.
- d) Realização de experimentos e replicação dos dados.
- e) O aumento de material genético que deve ser consumido com o metabolismo.
- **2.** A Biotecnologia se destaca no que se refere ao conteúdo tecnológico, sempre lembrando que os primeiros processos industriais estiveram fundamentados na ação de microrganismos. Assim, é correto afirmar que:
- I. A grande maioria usa microrganismos originais ou modificados geneticamente.
- II. O trabalho que envolve processos, produtos e serviços usa sempre os mesmos microrganismos.
- III. Os resultados visam a produção de substâncias de interesse comercial, como: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis por processos fermentativos.
- a) A afirmativa I está correta.
- b) A afirmativa II está correta.
- c) A afirmativa III está correta.
- d) As afirmativas I, II e III estão corretas.
- e) As afirmativas I e III estão corretas.

- **3.** Sobre os agentes biológicos envolvidos com a Biotecnologia, é correto afirmar que:
- I. O agente biológico deve ser selecionado e usado no momento da transferência da realização do bioprocesso.
- II. O bioprocesso acontece quando se tem uma demanda para a escala industrial.
- III. A qualidade da atividade de síntese elevada deve manter a estabilidade do bioprocesso mesmo encontrando condições adversas, como elevada pressão osmótica do próprio meio, elevada temperatura, entre outras coisas.

Assinale a alternativa correta:

- a) Somente a afirmativa I está correta.
- b) Somente a afirmativa II está correta.
- c) Somente as afirmativas I e II estão corretas.
- d) As afirmativas I, II e III estão corretas.
- e) Somente a afirmativa III está correta.

Seção 4.3

Avanços científicos proporcionados pela Biotecnologia

Diálogo aberto

Outro assunto que o grupo de pesquisa que a professora Denise está estudando é a associação do uso de células-tronco na regeneração de células-beta de pâncreas de diabéticos. Um grupo de pacientes diabéticos está recebendo células-tronco, pois apresenta um quadro de diabetes estabilizado, recém-descoberto, no entanto, já dependentes de insulina, com drástica restrição alimentar. Qual o efeito das células-tronco no organismo dos pacientes? Que tipo de células-tronco são inoculadas no pâncreas desses pacientes?

Vamos acompanhar quais os procedimentos serão usados pelo grupo de pesquisa de Denise para realizar o implante de células-tronco nesses pacientes e quais os possíveis efeitos dessa técnica da Biotecnologia.

Não pode faltar

As células-tronco são células capazes de se autorrenovar, dividir e de se diferenciar em variados tipos de células. Além disso, podem ser programadas para atuar em funções específicas, quando ainda não são especializadas para determinada função. Assim, as células-tronco podem sofrer autorreplicação, ou seja, se duplicar, gerando uma ou mais células-tronco.

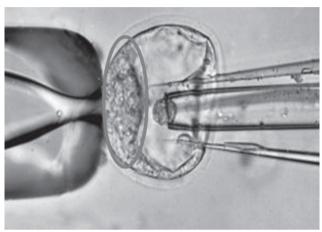
Os principais tipos de células-tronco são: as células embrionárias e as adultas, que podem ser encontradas na medula óssea e no cordão umbilical (origem natural), ou ainda aquelas chamadas de pluripotentes induzidas, que foram obtidas por cientistas em laboratório, em 2007.

Células-tronco Embrionárias

As células conhecidas como embrionárias, ou pluripotentes, possuem a

capacidade de se transformar em qualquer tipo de célula adulta e por isso recebem esse nome. Após a fecundação entre o 4º e 5º dia, essas células se encontram no estágio de blastocisto e são então denominadas como célulastronco embrionárias. Veja a figura que segue e localize esse importante tipo de célula capaz de regenerar tecidos e dar origem a variados tipos de células.





Fonte: Instituto de Pesquisa com Células-tronco. Disponível em: http://celulastroncors.org.br/celulas-tronco-2/>. Acesso em: 3 abr. 2016.

O corpo humano contém um número próximo de 216 tipos diferentes de células e as células-tronco embrionárias, por serem pluripotentes, podem se transformar em qualquer uma delas.

Sabe-se que na fase adulta a maior parte das células-tronco é encontrada na medula óssea e, também, no sangue do cordão umbilical. No entanto, cada órgão do nosso corpo contém determinada quantidade de células-tronco para então poder renovar as células durante toda a vida. Elas podem sempre se dividir para gerar uma célula nova ou, então, outra célula diferenciada. As células-tronco adultas são chamadas de multipotentes por serem tão versáteis, quando comparadas às células embrionárias

Dados revelam que as primeiras células-tronco humanas induzidas apareceram a partir da pele, no ano de 2007. A partir das células-tronco, o processo de reprogramação celular acontece pela inserção de um vírus que contenha 4 genes. Estes genes são colocados no DNA de determinada célula adulta, como a célula da pele, e reprogramam o código genético. Por meio desse novo programa, as células retornam à fase de célula-tronco embrionária, abrangendo as características de autorrenovação e capacidade de se diferenciarem em qualquer tecido. As células-tronco induzidas são células pluripontentes (IPS) e podem se autorrenovar e se diferenciar em diferentes células e tecidos.

Figura 4.2 | Fonte de Células-tronco

Fontes de Células-tronco Tecido Polpa Nervoso e Dentária Blastocisto Córnea Embrião Sangue Periférico Pele e Anexos Tecido Adiposo Músculo Medula Óssea Cordão Umbilical Placenta Membrana Amniótica Líquido Amniótico Saco Vitelínico Tecidos Fetais

Fonte: http://www.ccb.med.br/arquivos/images/001.jpg. Acesso em: 3 abr. 2016.

Como as células-tronco podem ser usadas?

Hoje, a pesquisa com as células-tronco é de grande importância para que se entenda como essas células podem se renovar e manter o funcionamento e o crescimento dos organismos. Ainda vale refletir o que pode acontecer com o nosso organismo durante o desenvolvimento de uma doença. As células-tronco fornecem aos cientistas diversos tipos de ferramentas que trabalham a favor da cura de doenças, testando medicamentos e desenvolvendo terapias que fornecem resultados efetivos.

A terapia celular consiste exatamente na troca ou substituição de células doentes por células novas e saudáveis. De certa forma, na teoria, qualquer doença que tenha degeneração de tecidos em nosso organismo poderia ser tratada por meio da terapia celular. Quando se trata de pesquisa com células-tronco, toda e qualquer tipo de célula é importante para análise, pois cada uma delas têm um potencial específico para ser estudado e usado em diferentes tipos de terapia celular.

Ainda após a criação das células-tronco induzidas (IPS), continuamos a desenvolver a reprogramação celular, favorecendo o crescimento de células e tecidos, renovando a estrutura e o funcionamento dos órgãos. Os resultados desses estudos são bastante promissores, no entanto, as pesquisas com células

embrionárias, assim como com as IPS, ainda apresentam certa margem de insegurança com relação ao seu uso. Quando as células-tronco são isoladas, é necessário fornecer as condições ideais para que elas possam se transformar em células específicas para determinado tratamento escolhido. Ainda é necessário que as células de determinada especificidade do corpo sejam implantadas e estimuladas para funcionar e interagir com as células naturais do corpo humano, trabalhando como se fossem elas.

As células-tronco podem ser usadas no sentido de substituir as células que o organismo, por algum motivo, deixou de produzir, por alguma alteração ou deficiência em tecidos lesionados ou doentes. As pesquisas com células-tronco sustentam e trabalham na esperança de se encontrar tratamento ou até a cura para doenças como: diabetes, infarto, esclerose múltipla, distrofia muscular e doenças degenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Assim, as células-tronco da medula óssea do doador darão origem a novas células sanguíneas sadias.



Pesquise mais

Para que você entenda um pouco mais sobre as células-tronco, leia os artigos a seguir:

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, supl. 1, São Paulo, maio, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 3 abr. 2016.

ROSSI, Maria Isabel D; BOROJEVIC, Radovan. Terapias celulares do miocárdio com células da medula óssea: critérios de qualidade e perspectivas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, supl. 1, São Paulo, maio, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700013&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 3 abr. 2016.

Organismos Transgênicos

Os organismos transgênicos são organismos geneticamente modificados que aparecem de modo artificial, ou seja, não acontecem normalmente na natureza. Por meio do empenho da engenharia genética criam-se, por exemplo: sementes resistentes a seus próprios agrotóxicos ou, ainda, sementes que produzem plantas inseticidas. De qualquer forma, as empresas ganham com isso, mas diversos riscos estão envolvidos com a saúde e com relação ao ambiente em que vivemos.



Assimile

Algumas soluções são propostas com relação aos transgênicos:

- Pensar na proibição de aprovações de novas culturas transgênicas, principalmente aquelas vinculadas à alimentação da população.
- Fazer uso de rótulos em produtos transgênicos para atender a um direito do consumidor de saber o que está comprando, o que está comendo e se tem alergia a determinado componente, evitando, assim, danos mais sérios à própria saúde.
- Trabalhar na fiscalização e no cuidado de todo o processo de desenvolvimento dos produtos, para que não haja contaminação.

O modelo agrícola que utiliza sementes transgênicas é um caminho insustentável, pois, como o uso de agroquímicos aumenta muito devido ao plantio de transgênicos, haverá sempre um risco futuro de afetar nossos solos e nossa biodiversidade agrícola. Diante dos riscos e da crise climática em que vivemos há anos, podemos afirmar que a preservação da biodiversidade funcionaria como uma garantia de que, se a preservarmos, ainda teremos opções viáveis de produção de alimentos no futuro, estando atentos aos efeitos das mudanças climáticas sobre a agricultura.

O Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos no ano de 2008 e teve a primeira lavoura transgênica por meio do plantio da soja. Assim, os transgênicos acabaram trazendo um duplo risco para todos nós e para o nosso ambiente, em um primeiro momento, por serem resistentes a agrotóxicos, ou propriedades similares de inseticidas. O uso contínuo de sementes transgênicas traz resistência no controle de insetos e plantas daninhas, fazendo com que o agricultor aumente a dose de agrotóxicos, prejudicando a saúde e o meio ambiente. Além disso, uso de transgênicos atua no desiquilíbrio da biodiversidade, tanto por aumentar o uso de agrotóxicos, como pela contaminação de sementes naturais por aquelas transgênicas.



Exemplificando

Neste caso, um exemplo de alimento em ameaça é o arroz. A diversidade do arroz brasileiro vai, desde o arroz branco, plantado no Rio Grande do Sul, que se adapta a temperaturas amenas, até outro tipo, plantado no interior do nordeste, vermelho, que está acostumado com o clima seco e quente.

Existem hoje diferentes alimentos transgênicos, produzidos com o intuito de matar insetos e determinar a resistência aos agrotóxicos, mas você já pensou como são os procedimentos para que os transgênicos sejam liberados?

Não há ainda um consenso na comunidade científica com relação à segurança dos transgênicos para com a saúde humana e o meio ambiente. O Greenpeace considera que a liberação de transgênicos é considerada uma afronta a toda precaução com o futuro da agricultura, do meio ambiente e do planeta. Houve e ainda há certa resistência das empresas em deixar de identificar a presença de transgênicos em seus produtos.

O cenário melhorou quando o Greenpeace, em 2005, denunciou que as empresas Bunge e Cargill usavam transgênicos sem rotular. O Ministério Público Federal investigou e a justiça entrou em ação, determinando que as empresas rotulassem seus produtos; isso começou em 2008.



Reflita

A rotulagem de produtos transgênicos é um direito básico dos consumidores. Todos têm o pleno direito de saber o que consomem, para que isso não venha causar um mal maior à saúde.

Para a maioria dos agricultores que trabalham em plantações convencionais ou orgânicas, as sementes transgênicas no mercado têm lhes trazido certo prejuízo. Eles, na verdade, perderam o direito de vender suas safras como antigamente. Já aqueles que defendem os transgênicos relatam que eles podem ser uma solução ao problema da fome no mundo, pois podem favorecer o aumento da produção de alimentos. No entanto, na realidade não é bem assim.

A produtividade dos transgênicos não acaba sendo superior à produtividade das plantações convencionais e orgânicas e ainda por cima a semente é mais cara por conta dos "royalties" a serem pagos, aumentando o custo de produção. Diante de toda essa realidade e os impactos sobre a biodiversidade agrícola, há um aumento no uso de agrotóxicos, levando a crer que os transgênicos são um problema e não a solução para a fome no mundo.



Vocabulário

Greenpeace: organização não governamental do meio ambiente, com sede em Amsterdã e outros escritórios espalhados em mais de 40 países. Foi fundado em 1971, em Vancouver, no Canadá. Sua ação principal está vinculada à proteção ambiental, ou seja, à preservação da fauna e da flora.

Transplante Autólogo: células-tronco do próprio paciente são retiradas dos ossos do quadril, por exemplo, e reimplantados na regeneração de determinado tecido.

Vacinas de DNA

As vacinas produzidas a partir de bactérias ou vírus causadores de determinada doença têm a função de estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos para combater determinado antígeno. Ao contrário das vacinas tradicionais, as vacinas de DNA possuem a propriedade de fornecer determinada resposta imune celular e humoral e seu material se fundamenta no uso de sequências de material genético do agente que se quer destruir. Quando a vacina é administrada, o DNA é reconhecido pelas células de uma pessoa, que por sua vez produz substâncias que seriam normalmente produzidas por vírus, bactérias, entre outros agentes. Isto faz com que o organismo hospedeiro possa reconhecer as substâncias genéticas introduzidas no organismo, produzindo imunidade contra essas substâncias, criando a memória imunológica.

As vacinas de DNA apresentam mais vantagens econômicas e técnicas quando comparadas às vacinas tradicionais, pois seu controle de qualidade é mais simples e não é necessária a refrigeração para seu transporte, já que elas são substâncias estáveis em temperatura ambiente. Além disso, possuem baixo custo de produção e manutenção. Uma vantagem dessas vacinas é que elas estimulam a produção de linfócitos T, células responsáveis em identificar e matar as células infectadas, como no caso das células T killer.

No entanto, há algumas desvantagens das vacinas de DNA, entre elas: dificuldade em reconhecer todas as sequências do DNA do agente que se quer combater, dificultando a correlação dessas moléculas com a necessidade do organismo; possibilidade da indução de uma doença autoimune, já que o organismo pode entender que é para atacar e não defender nosso corpo; integração do DNA no cromossomo do hospedeiro, proporcionando o aparecimento de mutações que podem levar ao câncer; e o aparecimento da tolerância do hospedeiro com relação às substâncias estimuladas pelo DNA. A injeção intramuscular é a forma mais utilizada para as vacinas de DNA, no entanto, pode ser administrada por diferentes vias



Pesquise mais

Leia mais sobre as vacinas de DNA:

DINIZ, Mariana de Oliveira; FERREIRA, Luís Carlos de Souza. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Revista Estudos Avançados**, 24 (70), São Paulo, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/a03v2470.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.



Faca você mesmo

Diante de todos esses detalhes sobre o uso e a importância dos transgênicos, pesquise quais são os alimentos mais estudados para serem um produto transgênico e quais já são. Relate e evidencie se já existe algum problema relacionado à saúde da população, se há proibição de venda desses produtos, dentre outras características que achar relevante.

Sem medo de errar

A equipe de pesquisa da professora Denise trabalha no estudo de célulastronco envolvidas na recuperação de um paciente diabético. Um grupo de pacientes diabéticos está recebendo células-tronco, pois apresenta um quadro de diabetes estabilizado recém-diagnosticado, no entanto, dependente de insulina, com drástica restrição alimentar. Qual o efeito das células-tronco no organismo dos pacientes? Que tipo de células-tronco são inoculadas no pâncreas desses pacientes?

O protocolo usado foi o "Transplante Autólogo de Células-tronco Hematopoiéticas em Pacientes com DM1 Recém-Diagnosticado". É feita inicialmente uma coleta de células-tronco hematopoiéticas que são congeladas. Após 15 dias, torna-se necessária a imunossupressão severa, com o objetivo de destruir completamente o sistema imunológico que se apresenta defeituoso no paciente diabético. O grupo de pesquisa explica que é como se fosse realizado um desligamento do sistema imunológico, por meio da quimioterapia, no hospital e não no consultório, fazendo uso de medicamentos, como a ciclofosfamida e globulina antimonocitária por via endovenosa, durante cinco dias.

Após esse processo, o sistema imunológico é "religado" com o uso das células-tronco hematopoiéticas do próprio paciente. Ocorre o que chamamos de 'reset imunológico', ou seja, o sistema imunológico para de atacar as células-beta pancreáticas. Assim, o que restou das células-beta, e que ainda não foram

destruídas, deverá produzir a insulina de forma adequada novamente. É por isso que se deve trabalhar apenas com pessoas no início da diabetes, com idade entre 12 e 35 anos, com 1 mês a 2 meses de diagnóstico.

Os resultados foram muito bons, já que das 23 pessoas que participaram do processo, 20 deixaram de usar insulina, 12 mantiveram a liberdade continuamente do uso da insulina e 8 de vez em quando usavam a insulina como tratamento.



Atenção!

Neste caso do estudo da professora Denise os pacientes não estão curados, mas, sim, com a diabetes controlada e livres da administração de insulina. Eles devem trabalhar com uma reeducação alimentar e manter a monitoração da glicemia diariamente, sem se esquecer de praticar atividades físicas ao menos 3 vezes por semana.



Lembre-se

O segundo protocolo que pode ser usado é o que usa a infusão de células-tronco mesenquimais retiradas da medula óssea de um parente próximo, que tenha um parentesco de primeiro grau com relação ao paciente. De acordo com o Dr. Eduardo Couri, em pesquisas com animais, essas células apresentam intensa atividade de bloqueio no que se refere à função de autoimunidade, promovendo a regeneração de células-beta, revertendo a patologia da diabetes tipo 1.

Leia mais a respeito:

MORAES, Pablo de. **Pesquisas com células-tronco no tratamento do diabetes**. Disponível em: http://www.endocrino.org.br/pesquisas-com-celulas-tronco-no-tratamento-do-diabetes/>. Acesso: 3 abr. 2016.

Avançando na prática

Pratique mais! Instrução Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"A Importância das Células-tronco"			
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capaz de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas de Biologia Molecular e da Biotecnologia.		

(continua)

2. Objetivos de aprendizagem	Conhecer os procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA; as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas; os fundamentos e aplicações da Biotecnologia.
3. Conteúdos relacionados	Como são produzidos os transgênicos, suas características e efeitos; transgênicos de importância agronômica; vacinas de DNA; o avanço proporcionado por pesquisas com célulastronco.
4. Descrição da SP	Sabe-se que o estudo com células-tronco é de grande importância na reestruturação celular e nos tecidos dos diversos órgãos de nosso corpo. A professora e pesquisadora Denise foi convidada para esclarecer dúvidas sobre a ação de células-tronco que estavam sendo colocadas em joelhos de pacientes do HC de uma universidade. Na região da patela (joelho) foi retirado um tumor e no lugar foi implantado um material biocompatível, juntamente com as células-tronco. O que deve acontecer no decorrer do tempo nesse local em que foi adicionada as células-tronco juntamente com o implante biossintético? Como a pesquisadora pode ajudar ou explicar aos pacientes o que está ocorrendo?
5. Resolução da SP:	Denise compareceu ao encontro de pesquisadores do HC de uma universidade para poder ajudar os pacientes a entender como o processo de regeneração do tecido ósseo está acontecendo em seus organismos. Ela explica que, como havia o tumor de natureza maligna, o tecido ósseo foi em sua grande parte retirado da região da "rótula" do joelho, ficando ali um espaço vazio, um buraco. No local, durante a cirurgia, foi colocado o implante sintético que necessita de "ajuda" para sustentar a articulação e favorecer os movimentos para andar, sentar, deitar. Para isso, foi aplicado um tipo de terapia regenerativa ortopédica, que é o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), juntamente ao implante que deve aos poucos preencher esse vazio, devolvendo a sustentação ao joelho. Como o joelho suporta todo o peso do corpo e o tecido ósseo tem seu crescimento lento, os resultados demoram a aparecer, sendo necessário paciência e colaboração desses pacientes. Aos poucos são realizadas as tomografias para acompanhar o preenchimento do "buraco" que se formou ao retirar o tumor. Os pacientes agradeceram e os pesquisadores também, pois entendem que a melhora não será imediata, no entanto, estão no caminho certo.



Lembre-se

A terapia com PRP pode regenerar tendões e auxiliar em tratamentos de lesão da cartilagem com sucesso. Essa regeneração acontece, pois as plaquetas ativam outras células que se reproduzem, recuperando o local afetado.



Faça você mesmo

Faça um levantamento de 5 situações nas quais o uso de células-tronco pode ser efetivo na clínica (doenças, tratamentos) ou na pesquisa. Para isso, você pode usar o material disponibilizado ou buscar novas fontes de pesquisa.

Faça valer a pena!

- 1. As células-tronco são células que:
- a) Não se renovam, mas estão presentes na medula espinhal e no cordão umbilical.
- b) Renovam-se, mas não se dividem e nem se diferenciam em células distintas.
- c) Autorrenovam-se, diferenciam-se e sofrem autorreplicação.
- d) Autoduplicam-se e dividem-se apenas na fase inicial de seu uso.
- e) Não apresentam capacidade de se reproduzir, mas são encontradas nos diferentes órgãos e sistemas, facilitando sua obtenção.
- 2. Os principais tipos de células-tronco são:
- a) As células embrionárias e as adultas, que são encontradas na medula óssea e no cordão umbilical (origem natural).
- b) As células pluripotentes induzidas, que são as que foram obtidas por cientistas em laboratório.
- c) As células embrionárias adultas produzidas em laboratório.
- d) As células pluripotentes de origem natural.
- e) As células embrionárias e as adultas, que são encontradas na medula óssea e no cordão umbilical, e as pluripotentes induzidas, obtidas por cientistas em laboratório.
- 3. As células retornam à fase de célula-tronco embrionária abrangendo

as ca	aracterísticas	de			е	capacida	ade
de			em	qualquer	tecido.	Assim,	as
célula	s-tronco indu	uzidas são			(IPS	3) e pod	lem
se au	torrenovar e	se diferenciar	em	diferentes	células	e tecidos	s. A
alterna	ativa que com	pleta a senter	ıça é				

- a) Autorrenovação, se diferenciarem, células pluripotentes.
- b) Autoduplicação, se diferenciarem, células multipotentes.
- c) Autorrenovação, se dividirem, multipotentes.
- d) Autoduplicação, se destruírem, células apoptóticas.
- e) Autorrenovação, se destruírem, células apoptóticas.

Seção 4.4

Perspectivas da Biotecnologia

Diálogo aberto

Vamos falar agora de outro assunto importante que sempre é usado nos laboratórios clínicos e nos laboratórios de pesquisa. É a importância da bioinformática para a compreensão de dados e técnicas moleculares, farmacológicas, fisiológicas, ambientais, dentre muitas outras. É com o uso da bioinformática que os dados envolvidos nos resultados do laboratório da professora Denise, por exemplo, podem ser interpretados. Isso deve facilitar o entendimento de como os dados experimentais e clínicos podem ser aplicados de maneira precisa a respeito de uma determinada doença. Além disso, vamos entender como produtos e processos biotecnológicos podem ter aplicação também no meio ambiente. Esses assuntos devem complementar as variadas áreas de estudo da Biotecnologia.

O laboratório de pesquisa da professora Denise se reuniu para analisar os dados obtidos em determinada pesquisa realizada na última semana. Após a obtenção de resultados de um gel de PCR, verificando a expressão de uma determinada proteína na qual aparecem bandas mais evidentes, o grupo resolveu quantificar a expressão dessas bandas, pois, dessa forma, os dados apresentavam-se significantes de uma maneira quantitativa, caracterizando a importância clínica envolvida no processo de cicatrização de um caso inflamatório crônico. Mas como podemos quantificar esses dados?

Vamos acompanhar quais os procedimentos serão usados pelo grupo de pesquisa de Denise para realizar o estudo dos dados com o auxílio da bioinformática.

Não pode faltar

Os principais materiais usados na bioinformática são os dados biológicos que obtemos de diversos experimentos, dando origem aos chamados dados quantitativos e qualitativos. Com essa necessidade da avaliação e aplicação de análise de dados disponíveis, existe uma pressão em cima da informática no desenvolvimento de programas, softwares e metodologias para que cada vez mais se aumente o investimento nessa área. Ainda é com a aplicação dos conceitos dessa área que conseguimos entender qual a significância de nossos dados.

Desta forma, a bioinformática trabalha com a criação, o desenvolvimento e a operação de determinado banco de dados e outros componentes que ajudam na coleta, na organização e na interpretação dos dados. Diversas áreas da biologia precisam desses métodos que trabalham com sequenciamento de genes, como a biologia celular e estrutural, com o desenvolvimento de fármacos envolvendo estruturas químicas e moleculares diversas.

Para que se saiba cada vez mais sobre a necessidade da análise de dados por meio de equipamentos e inovações tecnológicas diversas, torna-se necessária a atenção no trabalho de programas de computadores, tornando a análise dos dados um verdadeiro avanço dinâmico, acompanhado do avanço tecnológico.

A bioinformática é definida como uma disciplina de caráter biológico e científico, que trabalha os aspectos da biologia, da obtenção, do processamento, do armazenamento, da distribuição, da análise e da interpretação dos dados, isso juntamente com a ajuda da matemática e da computação, para que se entenda a significância dos dados biológicos. Desde 1977 até os anos 1990, houve um significativo aumento na melhora e na eficácia do sequenciamento de DNA, surgindo sequenciadores automáticos. Ainda foi pela análise de proteínas por espectrometria de massas que muitos dados que envolviam a análise de proteínas foram realizados. Além disso, marcadores moleculares e mapas genéticos mostraram problemas na organização e no armazenamento de dados. Nessa fase, computadores foram acoplados a equipamentos de análise de biologia molecular, microscópios eletrônicos, deixando os laboratórios com a capacidade de analisar muito mais dados em muito menos tempo do que antigamente. Hoje, há um intercâmbio entre os programas de bioinformática que usam banco de dados internos e outros fazendo contato com dados externos, mas todos têm a capacidade de organizar e armazenar os múltiplos blocos ou arquivos de dados.



Assimile

Entenda um pouco mais sobre a bioinformática, compreendendo conceitos da biologia, da informática e da internet:

QUEIROZ, Alexandre. **Apostila de Introdução à Bioinformática**. Caiacó: UFRN, 2002. Disponível em: http://genfis40.esalq.usp.br/genfis/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=10:introducao-a-bioinformatica&id=7:apostilas-e-artigos&Itemid=68>. Acesso em: 3 abr. 2016.

Programas para Bioinformática

Os principais programas utilizados nos laboratórios pertencem a uma "família" de programas de nome *Blast*. Você sabia que esses programas foram desenvolvidos para comparar sequências genéticas que envolvem DNA, RNA ou proteína com grande rapidez e sem perder as características de sensibilidade? Isso mesmo, de uma maneira rápida e usando dados eletrônicos e computacionais, os valores dos dados biológicos obtidos permitem interpretarmos de forma estatística e facilitam a escolha real dos dados com significância biológica e a análise das semelhanças que acontecem ao acaso. O programa *Blast* trabalha buscando semelhanças locais e não gerais, sendo possível identificar relações entre as sequências que compartilham regiões de similaridade. Com isso, comparam-se sequências genéticas do homem com rato, camundongo, porco, cachorro, coelho, cobaias, entre outras espécies de interesse agronômico, como sementes e arroz, por exemplo.



Exemplificando

Conheça os diferentes programas que contêm bancos de dados que já estão sequenciados e podem ser usados como molde ou como comparação para determinação de novos estudos de sequenciamento genético:

LABORATÓRIO MAX FEFFER. **Programas para Bioinformática**. Disponível em: http://genfis40.esalq.usp.br/genfis/index.php?option=com_content&view=article&id=60&Itemid=69>. Acesso em: 3 abr. 2016.



Reflita

Quando nos lembramos da epidemia da dengue que vivemos e agora os casos de microcefalia e as mortes causadas pelo *Zika* vírus, poderíamos nos perguntar caso existisse um banco de genes da variedade do agente causador dessas doenças, com certeza estaríamos bem avançados na prevenção com a produção de vacinas e no tratamento das patologias citadas se isso já existisse.

Novas aplicações biológicas em saúde

O avanço tecnológico das últimas décadas mostra os inúmeros benefícios para o uso da bioinformática e também apresenta resultados significativos na medicina. Hoje, muitas empresas na área de saúde investem bilhões de dólares em pesquisas na obtenção de equipamentos que favorecem os estudos e diagnósticos envolvidos nas mais diversas patologias.

A medicina tradicional hoje possui médicos que são verdadeiros cientistas que dedicam horas, dias ou até anos para a realização de pesquisas visando o aprimoramento da medicina atual. O aprimoramento de técnicas, aliado à Biotecnologia presente nos métodos usados na medicina, faz crescer uma certeza de que a medicina pode ir além, curando os mais diversos males. A Biotecnologia é vista como uma ciência que se originou na medicina tradicional e que trouxe inúmeros benefícios para variados tipos de problemas que antigamente não apresentavam solução.

Como vimos durante a disciplina de Biologia Molecular e Biotecnologia, alguns exemplos da importância da Biotecnologia são aplicados na medicina, envolvendo, em grande parte, a manipulação de células e proteínas na produção de vacinas, no isolamento de material genético, permitindo um estudo mais detalhado daquela proteína envolvida em determinada doença. Além disso, vale ressaltar a possibilidade de manuseio de embriões humanos para que ocorra a fecundação artificial ou *in vitro*, permitindo às pessoas que não têm filhos, ou que não conseguem ter filhos, a possibilidade de fertilizar e ter uma gestação.



Reflita

Você já parou para pensar se não houvesse a biotecnologia para realizar a fecundação *in vitro* ou a reprodução assistida? As pessoas não teriam nenhuma chance de poder ter um filho. Leia o artigo e reflita sobre a reprodução assistida:

SILVA, Isabela Machado da; LOPES, Rita de Cássia Sobreira. Reprodução assistida e relação conjugal durante a gravidez e após o nascimento do bebê: uma revisão da literatura. **Estud. Psicol.**, v. 14, n. 3, Natal, set./dez., 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-294X2009000300006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 3 abr. 2016.

Outro tipo de tecnologia usada hoje em dia são as células-tronco na reconstituição de órgãos. Na seção anterior nós estudamos a importância das células-tronco para renovação de tecido pancreático em paciente diabético e,

também, a regeneração de tecido ósseo em lesões graves de joelho. Essa tecnologia permite que o paciente tenha nova chance de viver e se adaptar às novas condições de vida.

A questão ética estará sempre envolvida no uso dessas tecnologias, porém uma coisa é certa: é por meio da Biotecnologia na medicina que doenças que antes eram vistas como incuráveis, hoje, se diagnosticadas com certa antecedência, rapidez ou eficiência, podem ter um índice de cura bastante alto.

A Biotecnologia em saúde humana tem demonstrado de modo certeiro ser uma área de pesquisa bastante promissora para o progresso da ciência e da economia do país. Pela natureza científica, a Biotecnologia tem a capacidade de impactar na melhoria da qualidade de vida da população. Para isso, são necessárias iniciativas para que se obtenha o progresso científico no Brasil.

Os desafios na área de Biotecnologia em saúde humana são muitos, pois há muitas doenças e agentes indutores de doenças que precisam ser investigados. Isso demanda tempo e investimento financeiro. No entanto, é por meio da inovação tecnológica que as melhoras nas condições de vida das pessoas podem ser impulsionadas. Tudo o que falamos reflete nas condições econômicas do país, que hoje apresenta sérias dificuldades. No entanto, não é permitido pararmos, pois a vida depende da solução dessas dúvidas que a pesquisa, aliada à ciência e à tecnologia, pode resolver.



Pesquise mais

Leia o artigo de grande importância com relação às inovações na área de Biotecnologia na saúde humana:

OLIVEIRA, Henrique S. de; SPENGLER, Rafael Luís. Inovaçõs na área de Biotecnologia em saúde humana em países em desenvolvimento e sua importância econômica e social: uma reflexão sobre o cenário atual e perspectivas futuras. **Caderno Pedagógico, Lajeado.**, v. 11, n. 1, p. 99-116, 2014. Disponível em: <www.univates.br/revistas/index.php/cadped/article/viewFile/971/564>. Acesso em: 3 abr. 2016.

Leia também o texto que fala de inovação tecnológica e entenda a importância dos recursos microbiológicos para Biotecnologia:

CANHOS, Vanderlei Perez; MANFIO, Gilson Paulo. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. Disponível em: <www.mct.gov. br/upd_blob/0000/439.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.

Produtos e processos biotecnológicos com potencial de aplicação em meio ambiente

Você imaginou os avanços que a área da ecologia microbiana e da bioinformática podem trazer para favorecer o desenvolvimento da Biotecnologia?

A diversidade microbiana é considerada uma fonte importante de material genético que trabalha no avanço da Biotecnologia. Estudos em ecologia molecular microbiana mostram que sua diversidade na natureza é muito maior do que se imaginava. Dessa forma, é necessário que estratégias tradicionais de isolamento e seleção de microrganismos sejam realizadas para garantir o desenvolvimento de fármacos e que esses sejam usados nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente. Outras abordagens de trabalho, as quais envolvem metodologias da bioinformática e da biologia molecular, permitem o acesso às informações a partir de dados genômicos em bases de dados e, consequentemente, a análise de microrganismos sem a necessidade de isolamento e cultivo, a partir da metodologia de clonagem direta de DNA de amostras ambientais. Desta forma foram caracterizados novos genes, enzimas e, ainda, fármacos obtidos da natureza e que estão envolvidos no desenvolvimento de novas estratégias de seleção, novos produtos bioativos, assim como alvos e ensaios que estão sendo aplicados a partir do conhecimento da genômica e da expressão gênica de diferentes organismos.

A grande maioria dos estudos e o uso sustentável da biodiversidade tendo como foco os macrorganismos e invertebrados indicam que esses seres formam por volta de 90% das espécies da biosfera, que por sua vez mostram um papel fundamental nos ecossistemas. Além disso, a evolução das metodologias usadas na biologia molecular com aplicação no estudo do meio ambiente contribui de maneira significativa para o avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados importantes com base em amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes relatam que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é muito alta. No entanto, apenas uma pequena quantidade em ambientes aquáticos é recuperada em estudos de isolamento e cultivo.

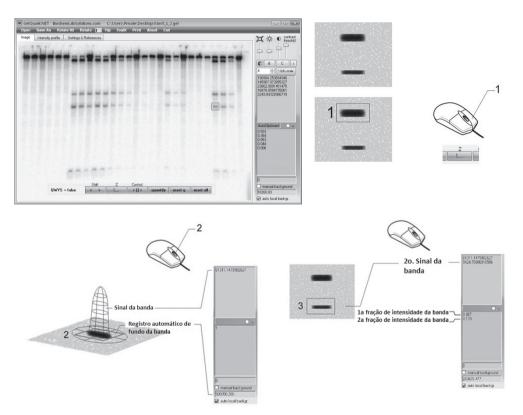
Sem medo de errar

Retomando a situação-problema desta seção: o laboratório de pesquisa da professora Denise se reuniu para analisar os dados obtidos em determinada pesquisa realizada na última semana. Após a obtenção de resultados de um gel de PCR, verificando a expressão de uma determinada proteína na qual aparecem bandas mais evidentes, o grupo resolveu quantificar a expressão dessas bandas, pois seus dados apresentavam-se significantes de uma maneira quantitativa, caracterizando a importância clínica envolvida no processo de cicatrização de um caso inflamatório crônico. Como podemos quantificar esses dados?

Foi verificado que determinada região do joelho estava em processo de cicatrização. A imagem externa da lesão estava praticamente cicatrizada. A expressão de fator de crescimento epidermal também mostrava bandas muito expressivas, sem gerar dúvida nos resultados. No entanto, a análise quantitativa da referida banda se dá pela análise de um programa de computador no qual os dados devem ser minuciosamente medidos. Mas como seria essa medida?

Por meio do uso da Biotecnologia, com o auxílio de um programa de análise conhecido como "ImageJ versão 1,46r", foi possível caracterizar banda por banda do gel de eletroforese analisado. A análise foi feita da seguinte forma: com o sinal do "mouse" do computador nas referidas bandas (maior e menor) é possível observar os valores de EGF expressos nas bandas. Veja as figuras a seguir que imitam uma situação como se você estivesse analisando os dados obtidos por um programa instalado no computador:

Figura 4.3 (Imagens 1, 2 e 3) | Análise de bandas de gel de eletroforese



Fonte: http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html. Acesso em: 3 abr. 2016.

Biotecnologia 215



Atenção!

Com esse estudo de bioinformática, os dados obtidos em gel de eletroforese constataram a expressão significativa do fator de crescimento epidermal na recuperação da lesão. A bioinformática é importante para fechar o diagnóstico de dados de toda pesquisa; sem ela muitos dados ficam "perdidos", sem significância e, assim, não se pode afirmar a veracidade desses dados.



Lembre-se

As ferramentas de bioinformática têm sido usadas para o melhor entendimento de diversos dados. Nos trabalhos realizados em laboratórios, essas ferramentas avaliam diferentes questões biológicas.

Avançando na prática

Pratique mais!

Instrução

Desafiamos você a praticar o que aprendeu, transferindo seus conhecimentos para novas situações que pode encontrar no ambiente de trabalho. Realize as atividades e depois compare-as com a de seus colegas.

"A Importância da Biotecnologia na Ciência"		
1. Competência Geral	A competência geral desta disciplina é conhecer e ser capa de aplicar a diferentes contextos as principais técnicas d Biologia Molecular e da Biotecnologia.	
2. Objetivos de aprendizagem	Conheceros procedimentos para clonagem e sequenciamento de DNA, as técnicas de análise de DNA, RNA e proteínas e os fundamentos e aplicações da Biotecnologia.	
3. Conteúdos relacionados	Bioinformática na identificação de novos produtos biotecnológicos; novas aplicações biotecnológicas em saúde; produtos e processos biotecnológicos com potencial aplicação em meio ambiente.	
4. Descrição da SP	Foi realizado no laboratório da professora Denise um estudo de cicatrização do tendão calcâneo em animais. Esses animais foram submetidos a uma terapia com laser que possui ação cicatrizante e tiveram uma concentração de plasma rico em plaquetas (PRP) implantadas na região que estava com lesão. Para dosagem da área de cicatrização, após o tempo necessário para regeneração, foi usado o método de Biotecnologia conhecido como histometria, que consegue quantificar fibroblastos, e outro conhecido como espectroscopia Raman, que determina a presença de colágeno tipo I e III. Ambos os tipos celulares devem estar	

(continua)

	envolvidos no processo de cicatrização. As lesões estavam localizadas no terço médio do tendão calcâneo e foram tratadas com laser que irradiou com energia de 7,0 J/cm2 em cada um de três pontos da lesão. A análise histométrica foi realizada nos cortes histológicos que foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). As lâminas de histologia que mostrarem a presença dessas células devem ser digitalizadas e avaliadas pelo programa "Image J versão 1.46r®".
5. Resolução da SP	Os resultados obtidos de animais tratados com <i>laser</i> , mostrou uma concentração relativamente alta de colágeno I, II e III, quando comparada ao grupo controle. O tratamento com PRP junto ao <i>laser</i> (830 nm) demonstrou resultados ainda melhores tanto para a formação de fibroblastos quanto para a concentração de colágeno I, acelerando o processo de cicatrização no tratamento de lesões no tendão.



Lembre-se

A terapia do PRP com o *laser* favorece a regeneração de tendões no processo inflamatório, dando condições para o tecido se regenerar. Essa regeneração permite a ação das plaquetas que ativam outras células que se reproduzem, formam novos vasos sanguíneos no local e possibilitam a chamada "angiogênese", melhorando a nutrição do tecido e recuperando a lesão.



Faça você mesmo

Chegamos em nossa última seção da disciplina de Biologia Molecular e Biotecnologia e é importante saber usar a Biotecnologia para o bem, aplicando os conhecimentos vivenciados nesta disciplina. Sendo assim, vamos encerrar relembrando um pouco daquilo que contribui para a melhora da qualidade de vida das pessoas e do meio ambiente confeccionando um *folder* do que seria essencial para que pudéssemos impulsionar o avanço tecnológico da saúde e meio ambiente, diante da situação que encontramos hoje em nossa realidade.

Faça valer a pena!

- **1.** Os principais materiais usados na bioinformática são os dados biológicos dos diversos experimentos, chamados dados quantitativos e qualitativos. Com essa necessidade da avaliação e aplicação de análise de dados disponíveis, busca-se:
- a) O cultivo de células in vitro para realização de experimentos.

Biotecnologia **2.17**

- b) O auxílio da informática no desenvolvimento de programas de computadores e softwares.
- c) O auxílio do cDNA para produção de proteínas.
- d) O uso de metodologias como o PCR e o RT-PCR.
- e) O uso do gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).

operação de determinado e compo	onentes que
ajudam na e na e na	
dos dados. Para que se saiba cada vez mais sobre a nec	cessidade da
análise de dados por meio de	
tecnológicas diversas, torna-se necessário a atenção no	trabalho de
programas de computadores, acompanhado do avanço	tecnológico.
Assinale a alternativa que completa corretamente a senteno	ça:

- a) Banco de dados coleta organização interpretação equipamentos.
- b) Banco de dados forma organização relação experimentos.
- c) Relatório coleta organização qualidade equipamentos.
- d) Relatório forma interpretação qualidade experimentos.
- e) Banco de dados coleta distribuição qualidade experimentos.
- **3.** A bioinformática é definida como uma disciplina de caráter biológico e científico, que trabalha:
- a) Os aspectos do gene, bem como a coleta e a interpretação dos dados.
- b) Os aspectos da biologia, bem como a análise e a interpretação dos dados.
- c) Os aspectos da célula, bem como o processamento de RNA e DNA.
- d) Os aspectos do gene, bem como a confecção do cDNA.
- e) Os aspectos da biologia, da membrana, do núcleo e do citoplasma celular.

Referências

AGEITEC. **Fixação biológica do nitrogênio**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_31_711200516717. html>. Acesso: 3 abr. 2016.

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina R. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia; CAPUTO, Luzia; AMENDOEIRA, Regina. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde**. v. 2. EPSJV: Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.

BALDI, Brigitte; MOORE, David S. A prática da estatística nas ciências da vida. 2. ed. Grupo GEN: Rio de Janeiro, 2014.

BYDLOWSKI, Sérgio. P. Características biológicas das células-tronco mesenquimais **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, supl. 1, São Paulo, maio, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 3 abr. 2016.

CANHOS, Vanderlei Perez; MANFIO, Gilson Paulo. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. Disponível em: <www.mct.gov.br/upd_blob/0000/439.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.

CARVALHO, Cristina Valleta; RICCI, Giannina; AFFONSO, Regina. **Guia de práticas em biologia molecular**. Yendis: São Caetano do Sul, 2010.

DINIZ, Mariana de Oliveira; FERREIRA, Luís Carlos de Souza. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Revista Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/a03v2470.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.

ESTRELA, Carlos. Metodologia científica. 2. ed. Artes Médicas: São Paulo, 2005.

GUERIN-MARCHAND, Caludine. Manipulações genéticas. EDUSC: Bauru, 1999.

GUIMARÃES, Maria; NOGUEIRA, Pablo. Um vilão de muitas caras. **Revista Fapesp**, jun., 2015. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2015/06/016-23_CAPA-Dengue_232.pdf?dc5f6f. Acesso em: 3 abr. 2016.

LABORATÓRIO MAX FEFFER. **Programas para bioinformática**. Disponível em: http://genfis40.esalq.usp.br/genfis/index.php?option=com_content&view=articl

Biotecnologia 219

e&id=60&Itemid=69>. Acesso em: 3 abr. 2016.

LESK, Arthur M. Introdução à bioinformática. 2. ed. Artmed: Porto Alegre, 2008.

MALAJOVICH, Maria Antonia. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro: BTeduc, 2011. Disponível em: http://www.bteduc.bio.br/livros/Biotecnologia_2012.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.

MONTEIRO-LOMELI, Monica; RUMJANEK, Franklin. D. **Técnicas em Biociências** -**Protocolos comentados para o laboratório**. Medbook: Rio de janeiro, 2013.

MORAES, Pablo de. **Pesquisas com células-tronco no tratamento do diabetes**. Disponível em: http://www.endocrino.org.br/pesquisas-com-celulas-tronco-no-tratamento-do-diabetes/>. Acesso: 3 abr. 2016.

OLIVEIRA, Valéria Maia de; SETTE, Lara Durães; FANTINATTI-GARBOGGINI Fabiana. Preservação e Prospecção de Recursos. **Multiciência**, Unicamp – DRM, Campinas, out., 2006. Disponível em: https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_08_7.pdf. Acesso em: 3 abr. 2016.

QUEIROZ, Alexandre. **Apostila de Introdução à Bioinformática**. Caiacó: UFRN, 2002. Disponível em: . Acesso em: 3 abr. 2016.

ROSSI, Maria Isabel D. BOROJEVIC, Radovan. Terapias celulares do miocárdio com células da medula óssea: critérios de qualidade e perspectivas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, supl. 1, São Paulo, maio, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700013&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 3 abr. 2016.

SILVA, Isabela Machado da; LOPES, Rita de Cássia Sobreira. Reprodução assistida e relação conjugal durante a gravidez e após o nascimento do bebê: uma revisão da literatura. **Estud. Psicol.**, v. 14, n. 3, Natal, set./dez., 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-294X2009000300006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 3 abr. 2016.

VERLI, Hugo. **Bioinformática**: da biologia à flexibilidade moleculares. SBBq: São Paulo, 2014. Disponível em: http://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>. Acesso em: 3 abr. 2016.

VITOLO, Michele. Biotecnologia Farmacêutica. São Paulo: Blucher, 2015.

UFRGS. **Bioprospecção**. Disponível em: http://www.ufrgs.br/patrimoniogenetico/conceitos-e-definicoes/bioprospeccao. Acesso em: 3 abr. 2016.

WENDLING, Ivar. Propagação Vegetativa. I Semana do Estudante Universitário, Corumbá, 2003. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50925/1/Wendling.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2016.



