



Biologia Celular e Molecular

Biologia Celular e Molecular

Lucas Detogni Simi

© 2018 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 e de Educação Básica

Mário Ghio Júnior

Conselho Acadêmico

Ana Lucia Jankovic Barduchi

Camila Cardoso Rotella

Danielly Nunes Andrade Noé

Grasiele Aparecida Lourenço

Isabel Cristina Chagas Barbin

Lidiane Cristina Vivaldini Olo

Thatiane Cristina dos Santos de Carvalho Ribeiro

Revisão Técnica

Rafaela Benatti de Oliveira

Editorial

Camila Cardoso Rotella (Diretora)

Lidiane Cristina Vivaldini Olo (Gerente)

Elmir Carvalho da Silva (Coordenador)

Leticia Bento Pieroni (Coordenadora)

Renata Jéssica Galdino (Coordenadora)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Simi, Lucas Detogni
S589b Biologia celular e molecular / Lucas Detogni Simi. –
Londrina : Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2018.
208 p.

ISBN 978-85-522-0532-6

1. Citologia. 2. Biologia molecular. I. Simi, Lucas
Detogni. II. Título.

CDD 571.6

Thamiris Mantovani CRB-8/9491

2018
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 Introdução à citologia | 9 |
| Seção 1.1 - Origem e evolução das células: histórico e evolução da citologia como ciência | 11 |
| Seção 1.2 - Noções gerais de microscopia | 25 |
| Seção 1.3 - Estruturas das células | 39 |
| | |
| Unidade 2 Células eucarióticas e procarióticas | 55 |
| Seção 2.1 - Células procarióticas | 57 |
| Seção 2.2 - Células eucarióticas | 71 |
| Seção 2.3 - Ciclo e diferenciação celular | 86 |
| | |
| Unidade 3 Fundamentos da Biologia molecular | 106 |
| Seção 3.1 - Estrutura e função do DNA e RNA | 108 |
| Seção 3.2 - Replicação, transcrição e tradução | 122 |
| Seção 3.3 - Regulação da expressão gênica | 136 |
| | |
| Unidade 4 Biologia molecular e suas aplicações | 154 |
| Seção 4.1 - Biologia molecular e suas aplicações | 156 |
| Seção 4.2 - Técnicas de extração do DNA | 174 |
| Seção 4.3 - Bioética e Biossegurança | 188 |

Palavras do autor

Caro aluno, apresentamos a você o livro didático que será utilizado na disciplina de Biologia Celular e Molecular, trazendo os principais conceitos e novas informações sobre a unidade de toda forma de vida: a célula. A biologia celular e molecular, também denominada citologia, é o ramo da ciência que estuda as células procariotas e eucariotas, seus mecanismos de controle e funcionamento, suas organelas e estruturas, entre outros detalhes do incrível mundo microscópico, que só foi possível de ser observado após muita evolução da ciência.

Ao final da nossa disciplina, você estará apto a conhecer e saber utilizar os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e a diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula.

Iniciaremos nossos estudos em nossa primeira unidade apresentando os principais conceitos da citologia, trazendo informações sobre a evolução dessa ciência, bem como as técnicas básicas. Nossa segunda unidade será destinada a apresentar as células procariota e eucariota, conhecendo suas semelhanças e diferenças. Depois de conhecer o alvo de nossos estudos, aprofundaremos seus conhecimentos sobre a biologia molecular e você conhecerá um pouco mais sobre o funcionamento básico do meio intracelular. Após adquirir uma boa bagagem, poderemos finalizar nossos estudos tratando sobre as aplicações da biologia molecular, apresentando as principais utilizações dessa ciência, seus desafios e limitações e as normas envolvidas.

O estudo de células, tecidos e suas funções depende do avanço contínuo de técnicas de análise e observação, além de afino nos estudos. Ele deve ainda ser meticuloso para que o pesquisador possa compreender os conceitos referentes à área. Esperamos que nossa caminhada lhe desperte interesse, aumentando sua gana para adquirir mais conhecimentos sobre este tema, tão fundamental para o entendimento dos seres vivos.

Introdução à citologia

Convite ao estudo

Você já se perguntou quantas estrelas existem no céu? Somente em nossa galáxia, a Via Láctea, estima-se que existam 200 a 400 bilhões de estrelas. É um número fantástico, que faz com que se um homem passasse 100 anos contando, chegaria a somente 5% do total. Mas e se lhe dissessemos que seu próprio corpo é um universo de pequenas células, que supera muito este número? Segundo estimativas dos últimos estudos, o corpo de um homem de estatura mediana, possui cerca de 30 trilhões de células. Você consegue imaginar essa microscópica grandiosidade?

É sobre isso que trataremos nesta unidade, introduzindo os primeiros conceitos da citologia e acompanhando os passos do homem até descobrir esse pequeno universo microscópico existente em cada um de nós. Nosso intuito é que você conheça e saiba utilizar os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula. Estes são os conhecimentos básicos sobre cada célula que forma desde uma bactéria presente na sua pele até corpos gigantescos como o da baleia-azul, com mais de 180 toneladas.

Para acompanhar nossos estudos, você assumirá o papel de um microscopista, um profissional cada vez mais procurado pelo mercado de trabalho. Você ocupa seu cargo em uma multinacional do ramo agrônomo, especializada no desenvolvimento de novas variedades de plantas, com resistência a diversos tipos de intempéries. Para desempenhar sua função, você necessita de vasta experiência na evolução dos microscópios e suas partes, conhecimento amplo sobre os avanços na citologia e biologia molecular e saberes sobre novas descobertas e técnicas de uso do microscópio. Com isso, é fundamental conhecer e utilizar os principais conceitos e

definições referentes à biologia celular e molecular, aplicando seus conhecimentos na capacidade de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula. Quantos tipos de microscópio você conhece? Você saberia identificar as diferentes partes e funções do microscópio? Conhece a importância histórica desse equipamento para a ciência e a civilização?

Nesta unidade, realizaremos uma introdução à citologia, tratando dos principais conceitos da biologia celular e molecular. Em nossa Seção 1.1, você conhecerá um pouco mais sobre o histórico e os avanços da citologia e a relevância das descobertas para a ciência. Na Seção 1.2, desbravaremos o microscópio, instrumento essencial no estudo da citologia, apresentando seus diferentes tipos, componentes e técnicas de uso. Finalizando com nossa Seção 1.3, conheceremos algumas estruturas celulares e suas funções essenciais ao funcionamento e à manutenção da vida. Vamos juntos aumentar os saberes sobre esse ramo da ciência, que tornou possível o incremento da qualidade e da expectativa de vida da população.

Seção 1.1

Origem e evolução das células: histórico e evolução da citologia como ciência

Diálogo aberto

Caro aluno, vamos começar a experimentar sua profissão como microscopista de uma multinacional do ramo agrônomo, especializada no desenvolvimento de novas variedades de plantas. Seu instrumento de trabalho é um equipamento que levou muitos anos para ser desenvolvido, começando como um instrumento para aumentar pequenas imagens e objetos, chegando aos mais modernos microscópios capazes de observar átomos.

Uma incumbência surge para você após a contratação de novos empregados no departamento. O chefe do departamento atribui a função de realizar o treinamento dos novos funcionários a você, confiando em sua experiência e nos conhecimentos que você adquiriu no laboratório. Acompanharemos o desenvolvimento e treinamento desses funcionários ao longo de nossas seções desta unidade, avaliando do início ao fim o desempenho de todos.

Nessa fase inicial do treinamento, você deve preparar uma palestra introdutória sobre a microscopia, incluindo alguns temas relevantes. Quando surgiu a microscopia? Por que a célula possui esse nome? Qual a relevância da microscopia para a ciência? Quais as principais evoluções e os avanços da citologia?

Prepare uma linha do tempo com a evolução da microscopia, com os principais acontecimentos, preparando também uma linha do tempo explicativa com os assuntos que serão tratados na palestra introdutória.

Não pode faltar

As primeiras teorias sobre a origem da vida buscavam justificar o surgimento de novos seres vivos a partir do empirismo. Aristóteles (384 a.C. – 322 d.C.), filósofo grego, foi um dos primeiros estudiosos a investigar o surgimento da vida.

Apesar de atualmente a ciência possuir conhecimentos bem estabelecidos sobre a evolução das espécies, destacando a publicação de Charles Darwin (1809 – 1882): “Origem das espécies por meio da seleção natural”, as obras evolucionistas e os conceitos solidificados do neodarwinismo não explicam a origem dos primeiros seres vivos, bem como os meios pelos quais seres simples e primordiais tornaram-se complexos indivíduos multicelulares.

A citologia (do grego, *kytos*: célula e *logos*: estudo), designada atualmente como biologia celular, é a ciência responsável pelo estudo da unidade funcional de todo ser vivo, a célula. A biologia celular investiga fisiologia, composição e estruturas celulares, e possui sua origem intimamente ligada à origem dos primeiros equipamentos de visualização microscópica. Este fato se deve às limitações do olho humano, que possui limite de resolução de 0,2 milímetros, sendo impossível observar as células e seus componentes sem o auxílio de um equipamento. Para facilitar nossos estudos, realizaremos uma linha do tempo, explicando os eventos e avanços ocorridos no ramo da biologia celular desde sua origem até os eventos mais recentes.

- 1590: os holandeses Hans Janssen e Zacharias Janssen, fabricantes de óculos, criam um equipamento cilíndrico com duas lentes capazes de ampliar imagens em cerca de 30x, servindo para observar pequenos objetos e figuras, oferecendo uma visão de detalhes impossíveis de serem detectados a olho nu. Contudo, a invenção não foi utilizada para fins científicos.

- 1609: paralelamente, o famoso cientista Galileu Galilei (1564-1642) apresenta um artefato para observação, menos potente que o da família Janssen, que proporcionava um aumento de 20 a 30 vezes, denominado *ochiollino* (pequeno olho), fazendo melhorias no equipamento até 1624. O termo “microscópio” é creditado ao alemão Giovanni Faber, um famoso botânico, amigo de Galileu.

- 1665: o cientista inglês Robert Hooke (1635-1703) inventa o microscópio composto (com lente ocular e objetiva). Nesse mesmo ano, lança seu livro “*Micrographia*”, que teve grande impacto na ciência, apresentando descrições de observações ao microscópio, além de ilustrações de alta qualidade feitas pelo próprio cientista,

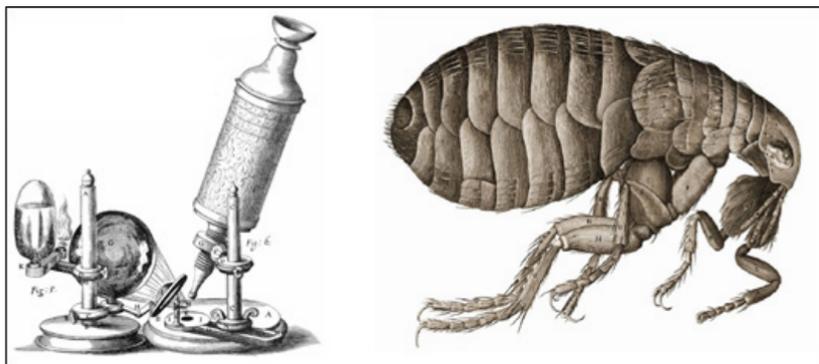
das quais uma das mais famosas é a prancha de uma pulga (Figura 1.1). No mesmo livro, ao observar tecido de cortiça, o cientista inglês cunha o termo "célula" (pequeno compartimento). Vale lembrar que o tecido observado era de um súber de árvore, portanto não se tratava de material biológico vivo e, sim, dos espaços deixados pelas células mortas, circundadas pela parede celular.



Reflita

A palavra "célula" tem origem no termo "cela" já que o cientista observou somente compartimentos vazios. O que ocorreu com as demais estruturas que estavam no meio intracelular?

Figura 1.1 | O microscópio de Hooke, ao lado de Ilustração de uma pulga vista ao microscópio, contida no "Micrographia", de R. Hooke



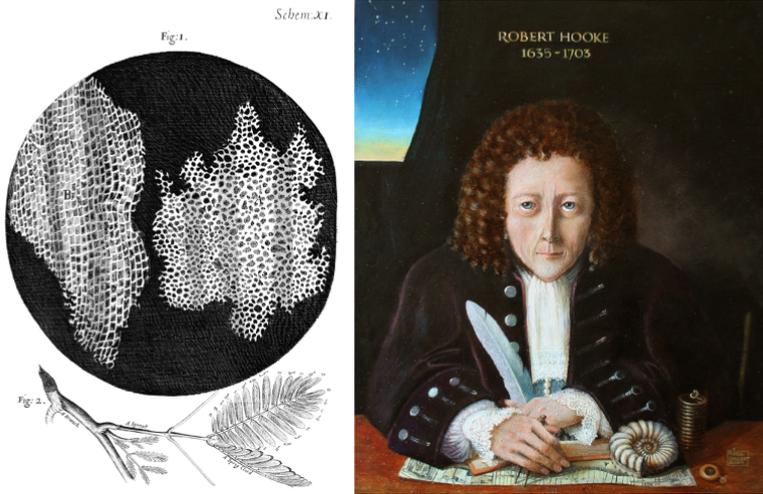
Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke#/media/File:Hooke-microscope.png>. Acesso em: 3 out. 2017; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke#/media/File:HookeFlea01.jpg>. Acesso em: 11 set. 2017.



Assimile

Robert Hooke também foi criador da lei da elasticidade, do relógio portátil de corda, além de reformular a teoria do movimento elíptico dos planetas. O cientista tinha uma relação conturbada com Isaac Newton e, segundo uma história não confirmada, discípulos de Newton destruíram o único retrato de Hooke, exposto na Royal Society. Atualmente só existem concepções artísticas da face do homem mais importante da ciência no século XVIII, todas baseadas em descrições.

Figura 1.2 | Micrografia ilustrada por Hooke, com o sùber de tecido vegetal. Ao lado direito, uma concepção artística do rosto de Hooke



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Teoria_celular#/media/File:Cork_Micrographia_Hooke.png>;<https://pt.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke#/media/File:13_Portrait_of_Robert_Hooke.JPG>. Acesso em: 11 set. 2017.

- 1673: o cientista e comerciante de tecidos holandês Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723) construiu seu próprio microscópio simples, que media 6,7 cm e proporcionava um aumento de 200x. Inicialmente, ele utilizava seus microscópios para avaliar a qualidade dos fios dos tecidos, mas por curiosidade passou a observar material biológico, conseguindo visualizar pela primeira vez células vivas, com amostras de pele, sangue, tecido muscular, cabelo, cortiça, marfim, olhos e asas de insetos. Seus relatos foram enviados a Royal Society. Leeuwenhoek enviou todos seus relatos à Robert Hooke, que traduziu os documentos e publicou os relatos pela Royal Society.

Figura 1.3 | Réplica do microscópio de Leeuwenhoek



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Antonie_van_Leeuwenhoek#/media/File:Leeuwenhoek_Microscope.png>. Acesso em: 29 ago. 2017.

- 1674: ao observar uma gota de água estagnada de um lago, Leeuwenhoek descreveu pela primeira vez os microrganismos, calculando que em apenas uma gota vivia milhões de pequenos organismos, relato que foi desacreditado pela Royal Society. O cientista enviou 20 de seus microscópios para comprovar a descoberta. Seis anos depois ele foi eleito membro da Royal Society. Leeuwenhoek foi um dos primeiros a contrariar a ideia da geração espontânea, que dizia que a vida viria de substâncias inanimadas, e não vinda de outros seres vivos.



Exemplificando

A geração espontânea foi aceita pela comunidade científica por muitos anos, até cerca de meados do século XIX. As moscas, por exemplo, seriam originadas de carne em putrefação, e cobras e crocodilos de lodo de rios e lagos. Com experimentos importantes, como de Redi e Pasteur, a teoria foi desconsiderada, dando origem à biogênese.

Figura 1.4 | Retrato de Anton Van Leeuwenhoek, ao lado de uma de suas pranchas, com ilustrações de glóbulos vermelhos do sangue



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Anton_van_Leeuwenhoek#/media/File:Jan_Verkolje_-_Antonie_van_Leeuwenhoek.jpg>. Acesso em: 3 out. 2017; <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=Anton+van+Leeuwenhoek&uselang=pt#/media/File:Leeuwenhoek1719RedBloodCells.jpg>>. Acesso em: 11 set. 2017.

- 1831: o botânico escocês Robert Brown (1773-1858) descobre a existência de o núcleo celular, presente nas células eucariotas. Apesar do núcleo ter sido observado anteriormente por outros estudiosos, Brown reconheceu a importância dessa estrutura nas células. A elas deu-lhes o nome núcleo (do grego, *nux* = semente), fazendo uma analogia à semente dos frutos vegetais.

- 1835: surgem os primeiros ateliers especializados na fabricação de microscópios, já utilizando lentes de alta qualidade, com destaque ao de Camille-Sébastien Nacet, montado em Paris, e ao de Karl Zeiss, aberto na Alemanha 11 anos após, em 1846.

- 1838: o botânico alemão Matthias Jacob Schleiden defende em sua obra "*Contributions to Phytogenesis*" que as plantas e seus órgãos eram formados por células, o que era apenas uma crença entre os cientistas. Na mesma obra, Schleiden também relaciona o núcleo, recém descoberto por Robert Brown, como estrutura ligada à divisão celular. Com isso, juntamente com Theodor Schwann iriam propor a teoria celular.

- 1839: Theodor Schwann, um fisiologista alemão, realiza diversos estudos com tecidos animais, descobrindo a enzima pepsina, metabolismo celular e a fisiologia de células musculares e nervosas. É considerado o pai da histologia animal, e co-fundador da teoria celular.

A teoria celular, um dos fundamentos da biologia, diz que todos os indivíduos são compostos por células, sendo estas unidades morfológicas dos seres vivos. Cada célula possui atividades que são fundamentais à vida, sendo, portanto, a unidade funcional da vida. Além disso, a teoria também postula que por processos de divisão, toda célula é proveniente de outra célula preexistente, essa última ideia proposta mais tarde pelo cientista Rudolph Virchow.

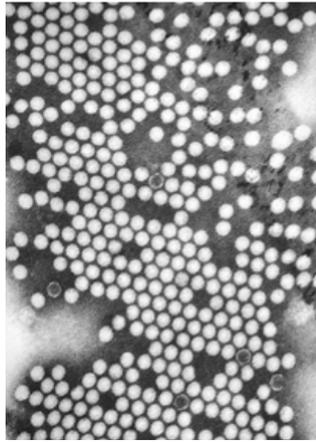
Figura 1.5 | Matthias Jacob Schleiden e Theodor Schwann, fundadores da teoria celular



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Matthias_Schleiden#/media/File:Matthias_Jacob_Schleiden.jpg>; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Theodor_Schwann>. Acesso em: 11 set. 2017.

- 1855: o médico polonês Rudolph Virchow descobre a divisão celular. A ele é atribuída a frase “Omnis cellula ex cellula”, que significa que toda célula é originária de outra célula. O médico foi o primeiro a constatar que as doenças eram mudanças ocorridas nas células e por este feito foi considerado o pai da patologia.
- 1869: o bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher descobre a existência de um composto ácido, resistente à ação da pepsina, presente no núcleo de glóbulos brancos. Tratava-se da descoberta do ácido desoxirribonucleico (DNA), nosso material genético, chamado por Miescher de nucleína.
- 1931: o físico alemão Ernst Ruska e o engenheiro elétrico Max Knoll apresentam o microscópio eletrônico, capaz de ampliar um objeto em 500 mil vezes. Este instrumento revolucionou a ciência, revelando estruturas de moléculas orgânicas e até vírus. Ao invés de trabalhar com feixe de luz (como o microscópio óptico), o microscópio eletrônico utiliza uma emissão de elétrons para formar imagens.

Figura 1.6 | Imagem do vírus da poliomielite (30 nm) obtida a partir de um microscópio eletrônico de transmissão



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Microsc%C3%B3pio_eletr%C3%B4nico_de_transmiss%C3%A3o#/media/File:Polio_EM_PHIL_1875_lores.PNG>. Acesso em: 11 set. 2017.

- 1953: os cientistas Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins descobrem a estrutura tridimensional da molécula de DNA, trazendo à comunidade científica o famoso modelo de dupla hélice. A descoberta não despertou muito interesse, até 1957.
- 1957: assim como era previsto por Watson, Crick e Wilkin, é descoberto que a molécula de DNA tem a capacidade de se autoduplicar, o que chama atenção da comunidade para o modelo proposto nos anos anteriores, o que lhes rendeu o Prêmio Nobel em 1962. No mesmo ano, Crick estabelece o fundamento do fluxo de informação celular, indo de DNA para RNA e finalmente sendo convertido em proteínas.
- 1969: é descoberta a polimerase de ADN da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, que consegue suportar altas temperaturas e pode ser utilizada em processos para a replicação de material genético em grandes quantidades. A enzima é chamada de *Taq polimerase*.
- 1981: a bióloga estadunidense Lynn Margulis propõe a teoria da endossimbiose, em que algumas organelas de células eucariotas, como a mitocôndria e o cloroplasto, teriam se originado a partir de células procariotas, que foram englobadas e mantidas

no meio intracelular. Essas organelas possuem material genético e ribossomos próprios, distintos dos encontrados na célula eucariota, além de se autoduplicarem.

- 1983: Kary Mullis inventa a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), que amplifica moléculas de DNA em milhares ou milhões de moléculas, sendo possível assim analisar cadeias do DNA.

- 1985: Perkin Elmer e Cetus, grandes empresas do ramo da saúde e medicina, obtêm a patente da técnica de PCR, desenvolvem também o termociclador, que automatiza o processo de replicação do material genético.

- 1990: se inicia o projeto Genoma Humano, com o objetivo de mapear toda a sequência genética da célula humana. O projeto foi concluído em 2003, com sequenciamento de 99% dos nucleotídeos. Algumas partes não foram sequenciadas pela dificuldade de obter amostras, como de telômeros e centrômeros de cromossomos.

- 1994: chega ao mercado o primeiro alimento transgênico. Os Estados Unidos da América lançam um tomate com amadurecimento tardio.

- 1996: Dolly, uma ovelha se torna o primeiro mamífero clonado com sucesso, pelo Instituto Roslin, na Escócia. O experimento veio a público em 1997 e a técnica de transferência somática de um núcleo de uma célula de glândula mamária para um óvulo sem material genético nuclear foi explicada. A ovelha apresentou um envelhecimento precoce, pois seus telômeros cromossômicos eram mais curtos.

- 2015: a empresa Hitachi desenvolve o microscópio mais potente do mundo, utilizando o método de transmissão de feixe e elétrons. O equipamento é capaz de gerar imagens com uma resolução de 43 picômetros (bilionésima parte de um metro). Essa medida é menos da metade de um raio de um átomo, permitindo assim o estudo da posição destes em materiais diversos.

O microscópio foi um instrumento essencial para o desenvolvimento da citologia, pois possibilitou o estudo microscópico, desde células, microrganismos, até diversas estruturas e moléculas do meio intracelular. Com o avanço da microscopia, foi possível um aprofundamento no conhecimento técnico de células, tecidos e órgãos, que serviram como pesquisa de base para aplicações na medicina, botânica, fisiologia, morfologia, anatomia, genética, entre outras áreas da pesquisa básica e aplicada. Indo mais além, atualmente, microscópios eletrônicos são utilizados em outras áreas, como física, química, engenharia etc.

A biologia molecular surge no último século, alterando a forma como o homem lida com a seleção artificial e o melhoramento de espécies animais e vegetais, com aplicação muito utilizada no cultivo de alimentos geneticamente modificados, como milho, soja, trigo, entre outros. As técnicas moleculares também desempenham função inerente nos diagnósticos de diversas áreas da saúde, como oncologia, imunologia etc.

Ao longo de nossa primeira unidade trataremos mais detalhadamente sobre o microscópio, suas partes, funções, técnicas e iniciaremos o aprendizado sobre as estruturas básicas da célula. Vamos a partir de agora aplicar o que foi aprendido nessa seção, resolvendo nossos questionamentos propostos no início da unidade.



Pesquise mais

O Instituto Fiocruz possui um site interativo trazendo várias imagens e explicações sobre a história da microscopia. Acompanhe detalhes no site da referência a seguir.

HISTÓRIA da microscopia. FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/celula/historia_02.htm>. Acesso em: 28 ago. 2017.

Sem medo de errar

Em nossa primeira situação, você está realizando o treinamento de novos funcionários de seu departamento, onde você é um microscopista. Nessa fase inicial do treinamento, você deve preparar uma palestra introdutória sobre a microscopia, incluindo alguns temas relevantes. Quando surgiu a microscopia? Por que a célula possui esse nome? Qual a relevância da microscopia para a ciência?

Quais são as principais evoluções e os principais avanços da citologia?

A microscopia surgiu em 1590, com os holandeses Hans Janssen e Zacharias Janssen, os quais criaram um equipamento cilíndrico com duas lentes capazes de ampliar a imagem em 200 vezes. Contudo, o equipamento era utilizado para observar imagens e pequenos objetos, sem finalidade científica. Foi o cientista Robert Hooke, em 1665, ao observar pequenas células mortas de cortiça que definiu este nome, por se parecerem com celas ou compartimentos vazios. Podemos, então, preparar uma linha do tempo com os principais acontecimentos e evoluções da citologia, acompanhada pelo desenvolvimento do microscópio.

Existem acontecimentos muito importantes que não podem ser deixados de fora da nossa linha do tempo, como os seguintes:

- 1590: os holandeses Hans Janssen e Zacharias Janssen inventam o primeiro microscópio para observar imagens e objetos pequenos.

- 1665: o cientista inglês Robert Hooke (1635-1703) inventa o microscópio composto (com lente ocular e objetiva), observando pela primeira vez células de cortiça.

- 1673: o cientista e comerciante de tecidos holandês Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723) construiu seu próprio microscópio simples. Foi o primeiro a observar material biológico e microrganismos.

- 1831: o botânico escocês Robert Brown (1773- 1858) descobre a existência do núcleo celular, presente nas células eucariotas.

- 1838: Matthias Jacob Schleiden defende que as plantas e seus órgãos eram formados por células, o que era apenas uma crença entre os cientistas.

- 1839: Theodor Schwann realiza diversos estudos com tecidos animais, descobrindo a enzima pepsina, metabolismo celular e a fisiologia de células musculares e nervosas. Junto com Schleiden propõe a teoria celular.

- 1855: o médico alemão Rudolph Virchow descobre a divisão celular. A ele é atribuída a frase "Omnis cellulae cellula", que significa que toda célula é originária de outra célula.

- 1869: o bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher descobre a existência DNA.

- 1931: o físico alemão Ernst Ruska e o engenheiro elétrico Max Knoll apresentam o microscópio eletrônico, que possibilitou a observação de estruturas e organelas no meio intracelular. Existem três tipos básicos de microscópio eletrônico: o m.e. de transmissão (para análise de cortes ultrafinos), m.e. de varredura (para análise da estrutura superficial e tridimensional de uma amostra) e microscópio de corrente de tunelamento (para obtenção de imagens de átomos e moléculas).

- 1953: os cientistas Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins descobrem a estrutura tridimensional da molécula de DNA.

- 1957: Crick estabelece o fundamento do fluxo de informação celular, indo de DNA para RNA e finalmente sendo convertido em proteínas.

Você pode incluir outros acontecimentos relevantes, envolvidos com a biologia molecular e apresentá-los na linha do tempo para os novos funcionários em treinamento. Prepare então sua própria linha do tempo, com os acontecimentos que julgar relevantes.

Avançando na prática

Scientia in sempiternum

Em um museu, em uma ala destinada a amostras de grandes descobertas científicas, você encontra o seguinte quadro:

Figura 1.7 | Rudolf Ludwig Karl Virchow



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Rudolf_Ludwig_Karl_Virchow.jpg>. Acesso em: 11 set. 2017.

Embaixo do quadro, há a seguinte frase: *"Omnis cellula ex cellula"*. Você reconhece esta frase? Sabe quem foi este médico e por que as descobertas desse homem foram tão importantes, em um período em que a abiogênese era aceita pela maioria da comunidade científica? Qual teoria ele ajudou a fundar?

Resolução da situação-problema

O busto no retrato pertence a Rudolph Virchow, importante médico polonês. No ramo da citologia, ele fez uma importante descoberta: a divisão celular, provando que as células são capazes de se autoduplicar, mostrando que uma célula sempre vem de outra célula (*"Omnis cellula ex cellula"*). Seus estudos foram importantes para derrubar a teoria da abiogênese, que propunha que seres vivos vinham de coisas inanimadas, e não de outros seres vivos. Sua descoberta faz parte de um dos pilares da teoria celular, proposta inicialmente por Matthias Jakob Schleiden e Theodor Schwann.

Faça valer a pena

1. O estudioso inglês Robert Hooke foi um dos mais famosos membros da Royal Society de Londres, importante entidade científica. R. Hooke foi responsável por estudos a respeito dos movimentos planetários, além de estudos sobre a elasticidade de fluidos, e inventor do relógio portátil de corda.

Robert Hooke é um nome importante da biologia celular e molecular, pois dentre seus feitos, o cientista foi responsável por:

- a) Observar pela primeira vez microrganismos vivos.
- b) Criar o primeiro microscópio.
- c) Observar pela primeira vez células mortas de cortiça, dando a elas a denominação de "células".
- d) Propor a teoria celular.
- e) Descobrir a existência do núcleo celular.

2. Os microscópios que possuímos hoje em dia passaram por um longo processo de desenvolvimento e melhoramento, desde a criação de lentes mais potentes até o uso de novos métodos na formação das imagens. Esse processo gradual de melhorias possibilitou o estudo da biologia celular e molecular, desde a observação de células até moléculas e átomos.

A respeito da história da microscopia e do conhecimento sobre a citologia, assinale a afirmativa correta:

- a) O microscópio óptico possibilitou ao cientista Robert Hooke a descoberta da existência da célula e do núcleo.
- b) O microscópio eletrônico foi necessário para o estabelecimento da teoria celular.
- c) A teoria da endossimbiose, proposta por Lynn Margulis, explica como surgiram as primeiras bactérias.
- d) Somente com o advento do microscópio eletrônico, criado por Ernst Ruska e o Max Knoll, foi possível a visualização de pequenas estruturas e organelas intracelulares.
- e) Anton van *Leeuwenhoek* foi o responsável por construir o primeiro microscópio eletrônico e conseguir observar os primeiros microrganismos em uma gota de água retirada de um lago.

3. Analise os avanços da citologia que foram possíveis com o advento do microscópio:

- I. A descoberta que todos os seres vivos são compostos por células.
- II. Cada célula possui atividades que são fundamentais à vida, sendo, portanto, a unidade funcional da mesma.
- III. Toda célula possui material genético, o DNA.
- IV. Toda célula é proveniente de outra célula preexistente.
- V. Somente células eucariotas possuem núcleo.

De acordo com seus conhecimentos sobre citologia, são postulados da teoria celular proposta por Schleiden, Schwann e complementada por Virchow as afirmações dispostas somente nos itens:

- a) I, II e III.
- b) I, II e IV.
- c) II, III e IV.
- d) III, IV e V.
- e) II, III e V.

Seção 1.2

Noções gerais de microscopia

Diálogo aberto

Caro aluno, você acompanhou em nossa primeira seção o histórico e o desenvolvimento de uma das bases da ciência: a citologia, denominada atualmente de biologia celular e molecular. Como você deve ter notado, o microscópio é um instrumento muito importante nessa ciência, e sua evolução proporcionou novas descobertas no interessante meio intracelular. Nesta seção, abordaremos mais detalhadamente o microscópio, suas técnicas de uso, suas partes e funcionalidades.

Você nesta unidade assumiu o cargo de microscopista, empregado de uma multinacional do ramo agrônomo, especializada no desenvolvimento de novas variedades de plantas, com resistência a diversos tipos de intempéries. Para desempenhar sua função, você necessita de experiência vasta na evolução dos microscópios e suas partes, conhecimento amplo sobre os avanços na citologia e biologia molecular, e saberes sobre novas descobertas e técnicas de uso do microscópio. Com isso, é fundamental conhecer e utilizar os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular aplicando seus conhecimentos na capacidade de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e a diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula. Quantos tipos de microscópio você conhece? Você saberia identificar as diferentes partes e funções do microscópio? Conhece a importância histórica desse equipamento para a ciência e a civilização?

Continuando o treinamento dos novos funcionários, hoje você inicia um novo passo. Lidaremos com a prática do microscópio e suas partes, conhecendo as funções e nomenclaturas dos componentes do nosso instrumento de trabalho, que é muito importante para realizar as funções cotidianas, além de realizar o uso correto e operações de manutenção. Você conhece todas as partes do microscópio óptico? Qual a diferença entre um microscópio

óptico e um microscópio eletrônico (M.E.)? Quais as funções das objetivas, do charriot e do condensador? Prepare um esquema de um microscópio óptico, identificando suas partes, incluindo brevemente as funções de cada uma, as limitações do uso desse aparelho e a comparação com um M.E.

Não pode faltar

Desde que Jeremias e Hans Janssen criaram o primeiro microscópio composto, o mundo microscópico deixou de ser um mistério ao homem, e não demorou muito tempo para que o instrumento fosse utilizado para fins científicos. Nesta seção, abordaremos os dois principais equipamentos para visualização de lâminas citológicas e amostras microscópicas: o microscópio óptico e o microscópio eletrônico. Você ainda conhecerá um pouco sobre a microscopia de ponta de prova.

Como você aprendeu em nossa seção anterior, o microscópio óptico foi utilizado por Robert Hooke, que observou pela primeira vez material vegetal ao visualizar células de cortiça. Mas foi Anton Van Leeuwenhoek que observou pela primeira vez material biológico, observando diversas células humanas e também microrganismos. Desde então, o microscópio óptico sofreu diversas modificações e evoluções; ele passou, por exemplo, a ser um instrumento apoiado por um tripé. O primeiro modelo de microscópio com tripé foi construído por John Yarwell, no ano de 1683. Essa alteração fez com que houvesse maior apoio e estabilidade no seu sistema.

Figura 1.8 | Microscópios do século XVII



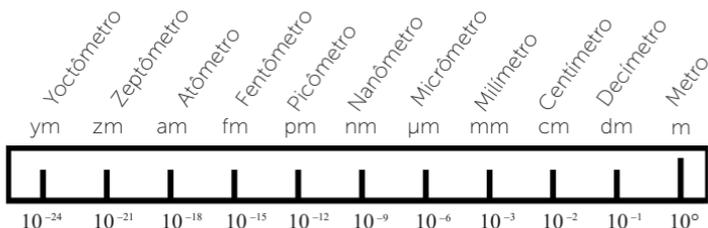
Fonte: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Microscope#/media/File:Old-microscopes.jpg>>. Acesso em: 18 set. 2017.

Alterações posteriores foram muito influentes para o aprimoramento do microscópio óptico. Em 1730, Charles Hall inventou as lentes acromáticas, usando uma segunda lente com propriedades refratoras distintas da primeira, realinhando as cores e reduzindo o impacto na primeira lente. Um século depois, em 1830, Joseph Lister solucionou o problema de nitidez, realinhando as lentes em posições mais precisas, assim proporcionando um aumento significativo na qualidade da imagem.

O revólver giratório com objetivas seria criado poucas décadas depois, em 1860, pela empresa Ernst Leitz. O equipamento possuía cinco objetivas. Posteriormente, a empresa apresentou um revólver com a incrível quantidade de 17 objetivas, sendo três delas de imersão. Importantes evoluções no equipamento ocorreram também no século XIX, em especial na fabricação de lentes mais sofisticadas, o que possibilitou a formação de imagens mais nítidas e cada vez mais precisas. O uso de espelhos côncavos também incrementou a capacidade de foco dos microscópios.

Atualmente, os microscópios ópticos ou de luz são muito sofisticados, com regulagens extremamente precisas tanto na ampliação como em seu foco. Modelos recentes são capazes de visualizar até vírus (WANG et al., 2011). O microscópio óptico possui a vantagem de poder observar objetos inferiores a 1 micrômetro, trabalhando no limite da difração da luz, podendo observar até vírus no interior de células. O micrômetro (μm) é uma das medidas usadas na microscopia e corresponde à milionésima parte de um metro (Figura 1.9).

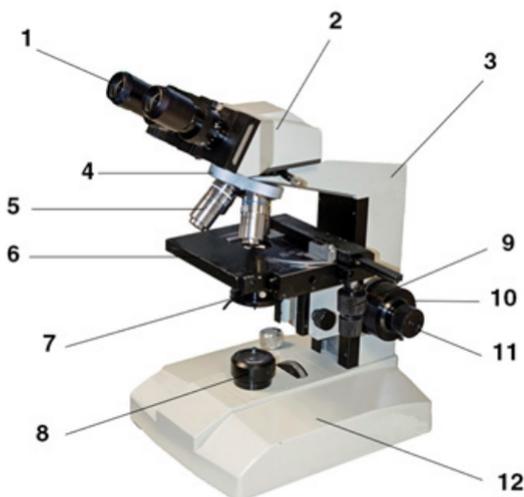
Figura 1.9 | Medidas submúltiplas do metro



Fonte: adaptado de :<https://pt.wikipedia.org/wiki/Unidades_de_comprimento#/media/File:Unidades_de_comprimento.svg>. Acesso em: 4 set. 2017.

Vamos conhecer as diferentes partes de um microscópio óptico atual, na figura a seguir.

Figura 1.10 | As partes do microscópio óptico



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/branco-qu%C3%ADmica-isolado-microscopia-219983/>>. Acesso em: 18 set. 2017.

1. **Oculares:** local onde se observa a imagem. Pode possuir uma (monocular) ou duas oculares (binocular) e possuir ajuste de foco para um dos olhos (botão de correção dióptrica).

2. **Tubo ou canhão:** suporta a ocular.

3. **Braço:** fornece suporte à platina e ao canhão, fixado à base.

4. **Revólver:** fornece suporte às objetivas, girando sobre um eixo fixo para alterar os aumentos da ampliação.

5. **Objetivas:** conjunto de lentes que permitem a ampliação da imagem. Microscópios ópticos comuns geralmente possuem 4 ou 5 objetivas, mas a quantidade e ampliação pode variar. As objetivas secas geralmente possuem aumento de 4x, 10x, 40x e 50x, assim chamadas, pois nessas não se usa óleo de imersão para a observação. A lente que amplia 100x é chamada de objetiva de imersão, pois necessita de óleo para aumentar seu poder de resolução.

6. **Platina ou mesa:** local de suporte à lâmina. Possui pinças para fixação e uma abertura central por onde a luz irá passar.

7. **Condensador com diafragma:** sistema de lentes convergentes que distribuem a luz de forma regular para formação da imagem.

8. **Fonte de luz:** geralmente possui uma lâmpada, que irá gerar a luz artificial. Pode possuir um controle da quantidade de luz, geralmente localizado lateralmente à base.

9. **Charriot:** parafusos que são usados para movimentar a lâmina, movendo a imagem na ocular no sentido vertical e horizontal.

10. **Parafuso macrométrico:** permite o ajuste do foco rápido, movimentando rapidamente a platina na direção vertical.

11. **Parafuso micrométrico:** permite um ajuste fino do foco, movimentando verticalmente a platina de maneira lenta.

12. **Pé ou base:** fornece suporte a todas as partes do microscópio.

E como se forma a imagem? Uma fonte de energia, geralmente elétrica, irá gerar luz, que incide em um condensador. Nessa estrutura, a luz pode sofrer um aumento ou redução da intensidade, e depois é enviada para o objeto a ser observado. Depois de passar pela amostra ou lâmina preparada, a luz atravessa a objetiva escolhida, chega ao canhão e as oculares, onde se observa a imagem. A ampliação da imagem é feita nas lentes objetivas (com ampliação variável) e nas lentes oculares (geralmente amplia a imagem em 10x). A imagem que se vê é ampliada, real e invertida.

Figura 1.11 | Geração de imagem na objetiva e oculares



Fonte: <<http://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/images/c/ca/ImagemMicro.jpg>>. Acesso em: 18 set. 2017.

Para auxiliar a observação, as amostras devem possuir cortes muito finos, para permitir que a luz atravesse e forme a imagem. Para melhorar a visualização, as amostras podem ser coloridas através de filtros presentes em alguns microscópios, como também a própria amostra pode ser corada na preparação da lâmina. Corantes histológicos são comumente utilizados para se observar certas estruturas ou substâncias nas células e tecidos.



Exemplificando

Para obter camadas bem finas de tecidos ou amostras, aparelhos como o micrótomo podem ser utilizados. Os cortes obtidos podem possuir espessuras de 1 a 10 μm .

As colorações podem ser monocrômicas (a amostra é pigmentada com uma só cor, como a Eosina, que possui a coloração rosa, ou o azul de metileno, que cora os núcleos celulares); bicrômicas (são utilizadas duas colorações diferentes, como a hematoxilina com eosina, chamada de H.E. Neste caso, a coloração é rosa e azul); tricrômicas (a amostra é pigmentada com três cores distintas, como o Tricrômico de Masson); e policrômicas (colorações que apresentam mais de três cores). Métodos de coloração comuns na citologia são coloração por azul de metileno, H.E., coloração com picrossirius, Tricrômico de Masson, PAS (Reativo de Schiff), entre outros.

Agora que você já conhece o microscópio óptico, pense: por que esses não foram inutilizados após a descoberta do microscópio eletrônico, muito mais potente? A vantagem do microscópio óptico em relação aos modelos de microscópios eletrônicos é que ele permite a visualização direta da amostra, sendo adequado para observar material vivo, como a ação de microrganismos, por exemplo. Microscópios eletrônicos, apesar de extremamente potentes, permitem apenas a visualização da superfície da amostra.



Refleta

O microscópio óptico é útil para observar que outros tipos de processos biológicos? E o microscópio eletrônico pode observar que tipo de material e possui quais vantagens?

Existem diversos tipos de microscópios de luz, que são utilizados para diferentes fins, com tecnologias distintas:

a) Microscópio ultravioleta: utiliza a radiação ultravioleta como fonte de luz, método que melhora a resolução e visualização das imagens, além de possibilitar a visualização de substâncias absorvidas por células e microrganismos.

b) Microscópio de contraste de fase: utiliza alterações do índice de refração da luz para produzir imagens de alta definição. É utilizado para visualizar amostras transparentes e estruturas não visíveis em campo claro, sem necessidade do uso de corantes histológicos.

c) Microscópio de fluorescência: utiliza métodos de coloração fluorescentes para geração de imagens. Permite a visualização e identificação de estruturas em células, como a técnica da imunofluorescência.

d) Microscópio de polarização: é constituído por dois prismas, um responsável por polarizar a luz, e outro por analisá-la. A forma com que a luz é polarizada fornece informações sobre a composição e estrutura da amostra. É utilizado para observação de minerais, tecidos ou materiais birrefringentes, como ossos, músculos etc.



Assimile

A imunofluorescência é uma técnica que utiliza corantes fluorescentes, que são ligados a um anticorpo que irão se ligar a um determinado antígeno. Desta forma, é possível localizar estruturas, moléculas, células ou tecidos.

Além da microscopia óptica, temos o microscópio eletrônico (M.E), desenvolvido em 1931, pelo físico Ernst Ruska e seu colaborador. É utilizado em diversas áreas, desde a biologia até engenharias. O M.E. funciona de maneira diferente do microscópio óptico e utiliza um feixe de elétrons para formar a imagem, o que permite uma resolução significativamente maior do que o microscópio de luz. Possui lentes eletromagnéticas que guiam o trajeto dos elétrons, sensíveis ao campo magnético. O comprimento de onda da radiação é inversamente proporcional à potência da resolução do microscópio eletrônico.

Figura 1.12 | O primeiro microscópio eletrônico, construído por Ernst Ruska em 1931

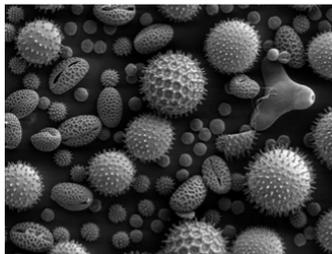


Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Microscope#/media/File:Ernst_Ruska_Electron_Microscope_-_Deutsches_Museum_-_Munich-edit.jpg>. Acesso em: 18 set. 2017.

Existem dois tipos principais de microscópios eletrônicos utilizados atualmente: o microscópio eletrônico de varredura ou varrimento (M.E.V.) e o microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.) conforme descrição abaixo:

a) Microscópio eletrônico de varredura ou varrimento (M.E.V.): produz imagens da superfície de uma amostra pelo escaneamento produzido pelo feixe de elétrons. Os elétrons interagem com os átomos da amostra e a posição do feixe eletrônico é convertida em uma imagem. A resolução obtida é superior a 1 nanômetro, ampliando o objeto em até 100 mil vezes.

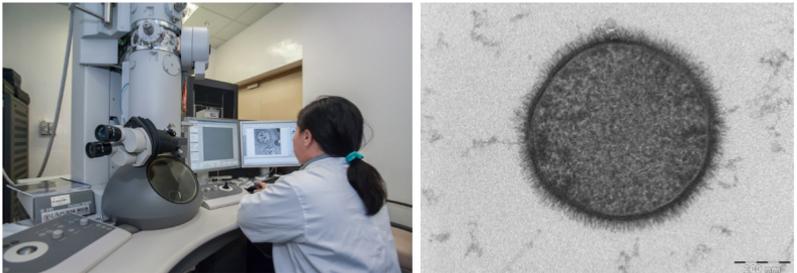
Figura 1.13 | Micrografia de grãos de pólen obtida em um microscópio eletrônico de varredura



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope#/media/File:Misc_pollen.jpg>. Acesso em: 18 set. 2017.

b) Microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.): utiliza a tecnologia do feixe de elétrons para atravessar a amostra, enquanto interage com a mesma, portanto, o material deve ser cortado em camadas bem finas. O aparelho, ao invés de lentes, possui ponteiros de vidro de alta sensibilidade, formando imagens tridimensionais da amostra. A ampliação obtida pode chegar até um milhão de vezes, formando imagens de altíssima resolução, além de possuir tecnologia que possibilita aferir características como elasticidade e dureza de materiais.

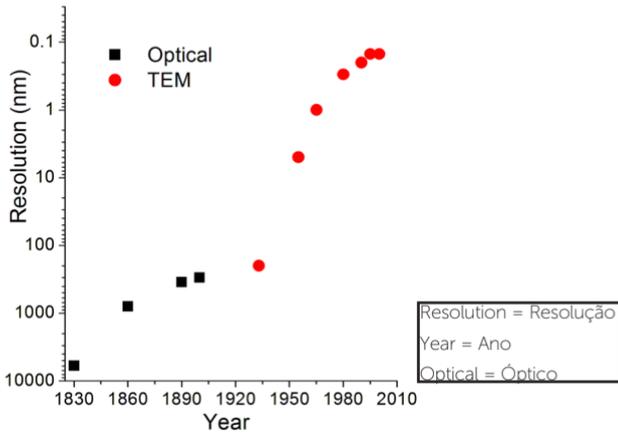
Figura 1.15 | Microscópio eletrônico de transmissão (esquerda); e imagem da bactéria *Bacillus subtilis* obtida pelo T.E.M. A barra de escala é de 200 nm



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy#/media/File:Bacillus_subtilis.jpg e <https://pixabay.com/pt/microsc%C3%B3pio-eletr%C3%B4nico-de-transmiss%C3%A3o-2223456/>>. Acesso em: 18 set. 2017.

A evolução da resolução do microscópio possibilitou aos cientistas trabalharem em níveis abaixo de 1 nanômetro (Figura 1.14). Contudo, a microscopia eletrônica de transmissão tem algumas limitações. Muitas preparações necessitam de um largo número de amostras para se obter cortes finos e precisos; o campo de visão é relativamente pequeno, e o campo observado pode não ser característico de toda a amostra, havendo o risco de subestimar ou superestimar certos resultados. Além disso, o feixe de elétrons pode danificar a amostra, especialmente em casos de preparação de materiais biológicos.

Figura 1.15 | Gráfico de evolução da resolução do microscópio óptico e do microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.)



Fonte: adaptado de: <https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_Electron_Aberration-Corrected_Microscope#/media/File:MicroscopyResolution.png>. Acesso em: 18 set. 2017.

Atualmente, existem técnicas e aplicações, como o microscópio eletrônico de ponta de prova, e outras técnicas aplicadas para reduzir a aberração do M.E.T. O microscópio mais potente atualmente possui a resolução de 43 picômetros (bilionésima parte do metro) e pode ser utilizado para analisar estruturas subatômicas. Contudo, todos os modelos de microscópios apresentados possuem vantagens e limitações, devendo ser utilizados conforme o objetivo da análise e a natureza da amostra. Esperamos que você tenha aproveitado nossos conteúdos para saber o conceito de funcionamento de cada um desses equipamentos, e como aproveitar o máximo do potencial de cada um. Vamos aplicar nossos conhecimentos?



Pesquise mais

Aprenda um pouco mais sobre a microscopia de ponta de prova, também chamada de microscopia de força atômica. OLHAR nano. Entenda a microscopia de força atômica (AFM). Disponível em: <[http://www.olharnano.com/artigos/4001/191001/Entenda-a-microscopia-de-for%C3%A7a-at%C3%B4mica-\(AFM\)](http://www.olharnano.com/artigos/4001/191001/Entenda-a-microscopia-de-for%C3%A7a-at%C3%B4mica-(AFM))>. Acesso em: 7 set. 2017.

Sem medo de errar

Vamos voltar ao nosso questionamento inicial. No treinamento dos novos funcionários, você deve passar os conhecimentos

necessários para lidar com a prática do microscópio. Quais as partes do microscópio óptico? Qual a diferença entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico (M.E.)? Quais as funções das objetivas, do charriot e do condensador? Prepare um esquema de um microscópio óptico, identificando suas partes, incluindo brevemente as funções de cada uma, exemplificando-os e apresentando as limitações dos usos desse aparelho e a comparação com um M.E.

Você aprendeu em nossa unidade que o microscópio óptico, também chamado de microscópio de luz, utiliza uma luz artificial, que atravessa a amostra, sendo ampliado por duas lentes (as objetivas e as oculares, com ampliações variáveis). O charriot é útil para movimentar a amostra ou lâmina, enquanto o condensador é um sistema de lentes convergentes que serve para distribuir a luz de forma regular para formação da imagem.

Já um microscópio eletrônico trabalha com feixe de elétrons, podendo fazer uma varredura da superfície da amostra para formar a imagem (microscópio eletrônico de varredura) ou atravessar e interagir com amostras finas do material (microscópio eletrônico de transmissão). A diferença básica dos dois é o limite de resolução e ampliação da imagem. Enquanto em um microscópio óptico comum, o aumento obtido na objetiva de imersão é de 1000x, em microscópios eletrônicos, o aumento pode chegar a um milhão de vezes.

Para completar sua tarefa, esquematize um microscópio com suas partes principais. Não esqueça de inserir os principais componentes que você aprendeu nesta seção: lentes oculares; tubo, braço; revólver; lentes objetivas; platina; charriot; condensador e diafragma; fonte de luz; parafusos macrométrico e micrométrico; e pé ou base.

Avançando na prática

Microproblemas

O laboratório de microscopia é fundamental no desenvolvimento de novos materiais, medicamentos e fármacos. Como responsável pelo laboratório de microscopia, é seu trabalho dar consultoria para garantir o uso da melhor técnica e do equipamento adequado para

determinados fins. Hoje você lidará com duas amostras diferentes, vindas de dois departamentos da empresa. O primeiro material vem do departamento de nanotecnologia, que está desenvolvendo um novo método de liberação de herbicidas no solo. A intenção é que ocorra uma liberação lenta do produto, diminuindo o número de aplicações do agrotóxico, prejudicando menos o solo e o ambiente. Contudo, existe a necessidade de analisar alguns tipos de nanopartículas para avaliar o formato e a área superficial, selecionando a mais adequada para tal finalidade.

Uma segunda amostra vem do setor de microbiologia. O setor busca avaliar o efeito de novas moléculas de fungicida em células vivas de fungos fitopatogênicos, ou seja, que causam doenças em plantas. A nova molécula, uma quitinase, deve supostamente quebrar a parede celular do fungo, facilitando o controle da doença no campo. Contudo, essa quebra deve ser observada microscopicamente para comprovar a ação do produto, e a amostra é transparente. Para não haver alterações nos ensaios, os pesquisadores não permitem a utilização de outros materiais na análise, como corantes histológicos, que facilitariam a visualização, mas poderiam comprometer o resultado.

Quais tipos de análises ou equipamentos você indicaria nos dois casos? Explique para ambos os departamentos por que você indica este método, argumentando as vantagens do método para a análise em questão.

Resolução da situação-problema

As duas amostras que devem ser analisadas possuem naturezas e objetivos totalmente distintos, portanto você deve indicar dois métodos diferentes de análise.

A primeira amostra, em que é necessário avaliar nanopartículas, que podem possuir formatos e superfícies diferentes, deve ser analisada pela microscopia eletrônica, especificamente utilizando o microscópio eletrônico de varredura, utilizado para mapear superfícies, inclusive de materiais muito pequenos, como a amostra em questão.

Já na segunda amostra, estamos trabalhando com material

biológico, portanto a melhor escolha é o microscópio óptico. A vantagem do microscópio óptico, em relação aos modelos de microscópios eletrônicos, é que ele permite a visualização direta da amostra, sendo adequado para observar material vivo, inclusive a ação de moléculas em células. Contudo, como não é possível utilizar corantes e o material é transparente, a melhor opção é a microscopia de contraste de fase, que utiliza alterações do índice de refração da luz para produzir imagens de alta definição. É utilizado para visualizar amostras transparentes e estruturas não visíveis em campo claro.

Com certeza você garantirá boas imagens e uma ótima avaliação dos resultados para ambos departamentos, e os pesquisadores ficarão satisfeitos com seu desempenho.

Faça valer a pena

1. Para auxiliar a observação em microscópios ópticos, as amostras devem possuir cortes muito finos, para permitir que a luz as atravesse e forme a imagem. Existem ainda técnicas de coloração para facilitar a visualização de certos componentes. Os corantes histológicos são comumente utilizados para se observar certas estruturas, como parede celular e núcleo de células.

Assinale a alternativa que apresenta um exemplo de coloração bicrômica, utilizada comumente em cortes histológicos.

- a) Tricrômico de Masson.
- b) Azul de metileno.
- c) Hematoxilina-Eosina (H.E.).
- d) Hematoxilina.
- e) Eosina.

2. Microscópios eletrônicos mais atuais são capazes de produzir ampliações muito maiores que os microscópios ópticos. Essa característica oferece vantagens, como a possibilidade de observar estruturas celulares, semicondutores, nanopartículas, entre outros materiais orgânicos e inorgânicos. A microscopia eletrônica difere dos microscópios de luz, pois utiliza para formação de imagem:

- a) um feixe de nêutrons.
- b) a iluminação artificial por lâmpadas de tungstênio.
- c) fótons direcionados a um campo magnético.
- d) radiação ultravioleta.
- e) um feixe de elétrons.

3. A microscopia é uma ciência que apesar de ter se desenvolvido vastamente no último século, algumas técnicas ainda possuem algumas limitações, como por exemplo:

I. Necessita de cortes finos da amostra para a luz poder atravessar a preparação.

II. O feixe de elétrons pode danificar a amostra muito fina.

III. Não atinge a escala do micrômetro.

IV. Dificuldade de observar material biológico vivo.

Dos problemas apresentados anteriormente, podemos dizer que as limitações apresentadas pelo microscópio óptico estão dispostas somente nos itens:

- a) I e II.
- b) II e III.
- c) III e IV.
- d) I e III.
- e) II e IV.

Seção 1.3

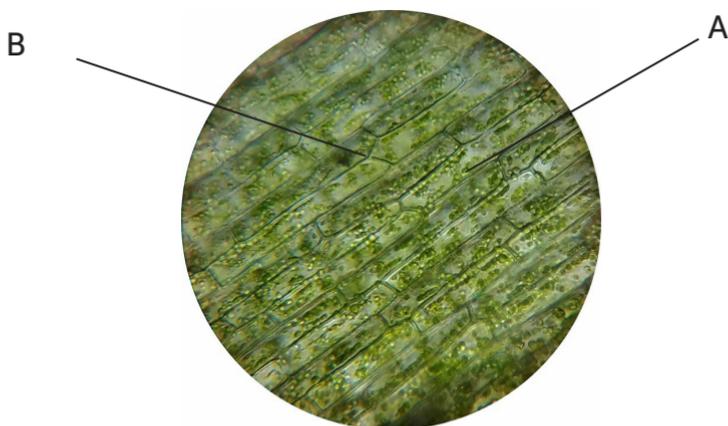
Estruturas das células

Diálogo aberto

Após conhecermos um pouco sobre seu instrumento de trabalho, finalmente iremos trabalhar com nosso objeto de estudo, as células. Você é o microscopista de uma grande empresa do ramo agrônomo e está na fase final de treinamento de funcionários para seu departamento. Hoje teremos um novo desafio pela frente, que envolverá o conhecimento de algumas estruturas celulares.

Agora que seus novos *trainees* conheceram as bases e os fundamentos da microscopia, é hora de colocar em prática esses conhecimentos. A primeira observação em microscópio será de uma célula que é foco de estudo de nosso laboratório. Várias lâminas são preparadas para a observação de diversas estruturas celulares. Você deve auxiliar os seus novos funcionários a identificá-las e explicar suas funções. Ao final das observações, prepare um relatório respondendo as questões e corrigindo as possíveis falhas dos *trainees*.

Figura 1.16 | Célula vegetal



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/waterweed-c%C3%A9lula-vegetal-1582259/>>. Acesso em: 4 out. 2017.

1. Quais estruturas estão apontadas na imagem acima?
2. Que tipo de organismo possui essa célula com tais estruturas?
3. Qual a teoria para a possível origem da organela apontada pela letra A? Qual vantagem ela traz para este organismo?

Não pode faltar

Em nossas primeiras seções, você acompanhou a evolução e os diferentes tipos de microscópios, que foram essenciais para a descoberta das células e suas estruturas, em uma longa linha do tempo, integrada por grandes pesquisadores e cientistas, que aos poucos desvendaram as peças do grande quebra-cabeça intracelular. Agora, você iniciará sua descoberta de partes desse mundo intracelular. Iremos discorrer sobre diferentes estruturas presentes em todos os grupos de seres vivos, de bactérias até organismos superiores.

A **célula** é a unidade de todo ser vivo, formando desde indivíduos com uma só célula, os **unicelulares**, até organismos com um número vasto de células, chamados de **pluri ou multicelulares**. Cada célula possui todas as estruturas responsáveis pela nutrição, produção energética, metabolismo e reprodução, cumprindo assim o ciclo vital do ser vivo.

Membrana plasmática ou membrana celular

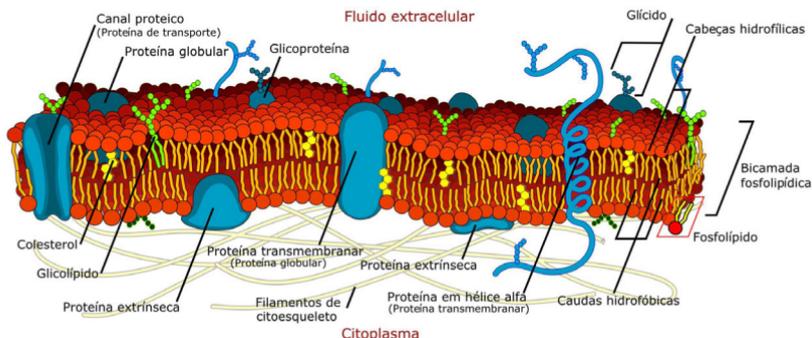
Toda célula possui uma película que a envolve e separa seus componentes do meio exterior, fornecendo proteção e a permeabilidade necessária para trocas com o meio. Essa estrutura é denominada **membrana celular** ou **membrana plasmática**. Essa estrutura é a divisão do meio intracelular, composto pelo citoplasma, e do meio extracelular, que pode ser o meio ambiente ou mesmo a matriz extracelular de diversos tecidos. O citoplasma é um espaço preenchido pelo citosol, composto de água, íons, glicose, aminoácidos, nucleotídeos, sais minerais etc.

A membrana plasmática é visível somente em microscópio eletrônico, onde aparece como uma dupla camada separada por

uma faixa central. É uma estrutura de 6 a 10 mm de comprimento, que envolve, além da célula, todas as organelas celulares. É composta principalmente de uma dupla camada de fosfolípidios e proteínas conjugadas, além de uma pequena quantidade de carboidratos.

Os fosfolípidios são compostos de um álcool, um fosfato e duas moléculas de ácidos graxos. São moléculas longas, que possuem uma extremidade hidrofílica (tem afinidade com água) e outra hidrofóbica (não tem afinidade com a água), dispostas com a parte hidrofílica para o meio intra e extracelular, e a parte hidrofóbica fica para o interior da membrana, como mostra a figura a seguir.

Figura 1.17 | Estrutura da membrana plasmática



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Membrana_plasm%C3%A1tica#/media/File:Cell_membrane_detailed_diagram_pt.svg>. Acesso em: 16 set. 2017.

O modelo da dupla camada de lipídios foi proposto por Singer e Nicholson, em 1972, chamado de mosaico fluido, sendo o modelo mais aceito até os dias atuais. O nome se deve a fluidez proporcionada pela parte lipídica, e ao mosaico formado pelas proteínas conjugadas na estrutura. Para dar estabilidade térmica à membrana, a constituição dessa estrutura na célula animal possui moléculas de colesterol, permitindo fluidez em baixas temperaturas. Células vegetais, que não possuem colesterol, substituem alguns fosfolípidios comuns por fosfolípidios com cadeias insaturadas, mantendo a fluidez.

A membrana plasmática também é responsável pelo controle da entrada e saída de substâncias na célula, propriedade chamada de **permeabilidade seletiva**. Essa função é realizada principalmente pelas

proteínas do mosaico fluido, realizando a passagem de água, íons, açúcares, sais, entre outras substâncias. Existem dois diferentes tipos básicos de transporte de substâncias pela membrana:

a) Transporte passivo: quando não envolve gasto de energia no transporte. Pode ocorrer por difusão simples, difusão facilitada e osmose. A difusão simples ocorre à passagem de substâncias entre os fosfolipídios, como o O_2 e o CO_2 . A difusão facilitada ocorre com a maior parte dos solutos polares (glicose, aminoácidos, vitaminas etc.) quando a passagem ocorre por proteínas específicas, acompanhando o gradiente de concentração. Já no transporte por osmose ocorre a passagem de solvente (água) pela membrana plasmática, do meio hipotônico (com menos soluto) para o meio hipertônico (com mais soluto), buscando sempre o equilíbrio hídrico.

b) Transporte ativo: quando há necessidade de gasto de energia para o transporte da substância, levando substâncias do meio hipotônico para o hipertônico. Geralmente é realizado por proteínas específicas, utilizando ATP (adenosina tri-fosfato) como fonte de energia. Um exemplo de transporte ativo é a bomba de sódio-potássio, que por meio do gasto de energia mantém grande quantidade de potássio no meio intracelular e expulsa sódio para o meio extracelular, contrariando o gradiente de concentração, mas utilizando energia para isso. Esse transporte pode ocorrer também com glicose, aminoácidos etc.



Assimile

O meio hipertônico é aquele que possui maior quantidade de substâncias dissolvidas (soluto), enquanto o meio hipotônico possui menor concentração de substâncias dissolvidas. Quando os meios possuem a mesma concentração, temos um meio isotônico. A célula animal possui uma concentração de sais de 0,9%.

As proteínas da membrana também são responsáveis por sinais celulares, servindo como receptores de sinais do meio extracelular. Esse sistema coordena as atividades e funções da célula. Exemplificando, hormônios, neurotransmissores e citocinas são moléculas que ativam esses receptores.



A sismonastia é um exemplo de resposta das células a um agente externo. Um toque, por exemplo, faz com que os receptores da célula alterem o transporte de água para fora das células, fazendo a planta fechar suas folhas, protegendo-se contra a herbivoria. A dormideira (*Mimosa pudica*) é um exemplo de planta que utiliza este artifício.

Figura 1.18 | Folíolos da planta *Mimosa pudica* se fechando



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Sismonastia#/media/File:Sismonastia_de_la_Mimosa_pudica.jpg>. Acesso em: 16 set. 2017.

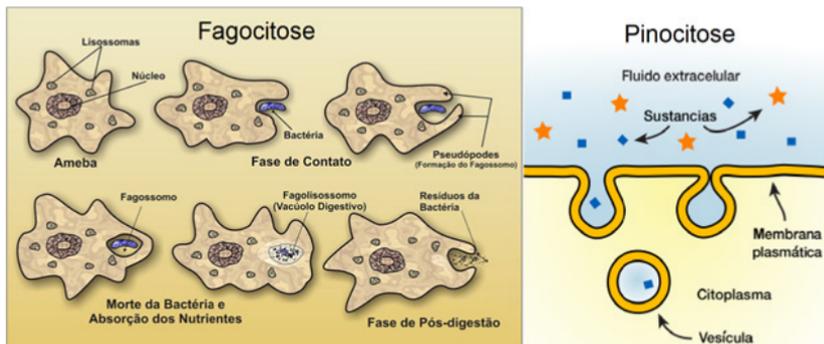
Os carboidratos presentes na membrana também possuem funções importantes. Eles podem estar presentes de forma livre, conjugados com proteínas (glicoproteínas) ou com fosfolípidios (glicolípídios). Glicolípídios estão ligados ao reconhecimento celular, diferentes em cada tipo de célula nos diferentes tecidos. Nos animais, a camada de açúcar forma um revestimento, chamado de glicocálix, responsável pela proteção da célula, pela retenção de nutrientes e principalmente pelo reconhecimento celular, inclusive interrompendo o crescimento celular.

A membrana celular é também responsável por processos de englobamento de partículas, chamada de **endocitose**. A endocitose pode ser compreendida como um processo de passagem de substância para o interior da célula, havendo assim gasto de energia, como um transporte ativo. Contudo, esse tipo de passagem ocorre com moléculas ou partículas grandes e até mesmo outras células. Existem dois tipos de endocitoses: a fagocitose e a pinocitose.

A fagocitose é o processo de englobamento de partículas sólidas, por projeções da membrana chamadas de pseudópodes (falsos pés). É um processo comum na defesa imunológica, no englobamento

de antígenos ou agentes invasores pelos leucócitos. É também o método de locomoção e alimentação de amebas (Figura 1.19). Após englobado, o material é digerido por enzimas intracelulares em um vacúolo digestivo. A pinocitose é semelhante à fagocitose, porém trata-se do englobamento de partículas líquidas, formando pequenos glóbulos de membrana, chamados de vesículas. É comum ocorrer o englobamento de moléculas delipídio, por exemplo.

Figura 1.19 | Exemplos de fagocitose (à esquerda) e pinocitose (à direita)



Fonte : <https://pt.wikipedia.org/wiki/Fagocitose#/media/File:Amoeba_fagocitose.jpg> ; <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Pinocitose#/media/File:Pinocytosis.svg>>. Acesso em: 16 set. 2017.

Quando a célula necessita enviar substâncias para fora da célula, como por exemplo proteínas produzidas, toxinas, peptídeos, entre outras substâncias, há o gasto de energia (ATP), ocorre pela formação de vesículas no meio intracelular, que será encaminhada à membrana. Essa vesícula irá se fundir com a membrana plasmática, e as substâncias que estavam no interior da vesícula são lançadas ao meio extracelular.

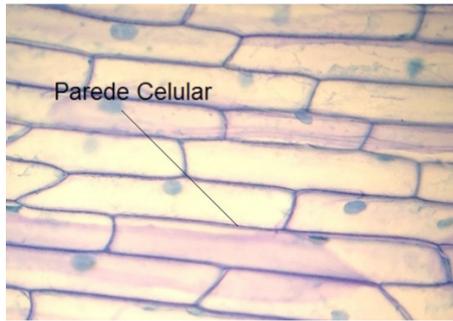
Parede celular

Alguns tipos de organismos possuem uma proteção adicional às suas células, a parede celular. Essa estrutura confere diferentes funções, como proteção mecânica, resistência, sustentação, permeabilidade, flexibilidade etc. Essa estrutura está presente nas plantas, na maioria das bactérias, nos fungos e nas algas, englobando 4 reinos da taxonomia de Whittaker. Existem diferenças na composição da parede celular em cada grupo.

Nas plantas, a parede celular é constituída basicamente por

microfibrilas de celulose, localizando externamente à membrana plasmática (Figura 1.20). A parede primária geralmente é flexível, permitindo o crescimento celular da planta, enquanto a parede celular secundária, mais externa, é rígida. Em ambas pode haver impregnação de lignina, que confere maior resistência. Uma das funções principais da parede celular nos vegetais é evitar a desplasmólise (rompimento da membrana plasmática) pelo excesso de água absorvida.

Figura 1.20 | Parede celular de células de cebola (coloração com azul de metileno)



Fonte: elaborada pelo autor.

Diferentemente dos vegetais, a parede celular presente no *reino Monera* é composta por polissacarídeos ligados a proteínas, os peptidoglicanos. Dependendo da espessura da parede, as bactérias são diferenciadas em Gram positivas e Gram negativas. A função da parede celular nesse grupo é principalmente proteger e sustentar a célula.

Nas algas, a parede celular é formada por polissacarídeos, que podem ser celulose. Substâncias como alginato, carbonato de cálcio e ágar podem ser componentes e a função nestes organismos é principalmente dar sustentação, adesão e proteção aos talos e células.

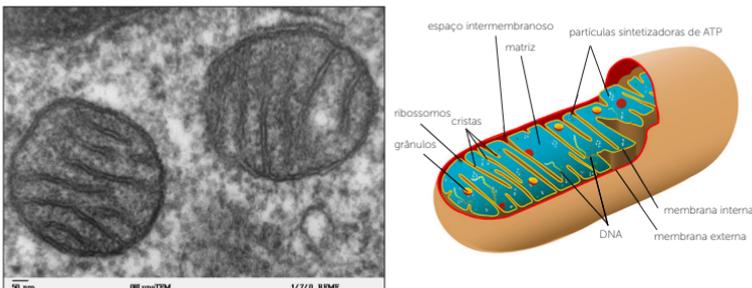
Os fungos possuem parede celular composta por quitina, um dos fatores que os mantém em um reino à parte a classificação. A estrutura fornece rigidez e proteção, dá suporte osmótico, participa de processos biológicos, dá formato à célula e está relacionada às funções de reprodução, adesão e sinalização celular.

Mitocôndrias

E de onde vem essa energia em forma de ATP, que falamos anteriormente? Se estivermos falando de um organismo heterotrófico (consumidores), ele terá de se alimentar e transformar seus nutrientes em energia, já um autotrófico (produtores) possui maneiras de fabricar nutrientes, como a glicose, obtida na fotossíntese. E como esse nutriente é transformado em energia? Todo esse processo ocorre no interior de organelas chamadas mitocôndrias, que utilizam a glicose e o O_2 para realizar um processo chamado respiração celular. O produto final desse processo é ATP, H_2O e dióxido de carbono (CO_2). A respiração celular aeróbica produz 36 ATP por mol de glicose, enquanto o processo anaeróbico produz 2 ATP.

As mitocôndrias possuem DNA próprio, são capazes de se autoduplicarem. Essa característica, juntamente com o fato dessa organela possuir uma dupla membrana, embasa a teoria da endossimbiose, de que essas organelas teriam sido seres procaríotos que foram fagocitados e mantidos para provavelmente auxiliar na geração de energia. Além disso, o DNA mitocondrial é semelhante ao DNA bacteriano. O DNA mitocondrial possui apenas 37 genes e só é herdado da mãe. Após a fecundação, apenas a cabeça do espermatozoide penetra no óvulo e nessa região não existem mitocôndrias. Sendo assim, o zigoto recém-formado possui apenas mitocôndrias maternas.

Figura 1.21 | Duas mitocôndrias de células pulmonares (à esquerda) e esquema de uma mitocôndria e suas partes (à direita)



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Mitoc%C3%B4ndria#/media/File:Mitochondria_mammalian_lung_-_TEM.jpg>; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Mitoc%C3%B4ndria#/media/File:Animal_mitochondrion_diagram_pt.svg> . Acesso: em 18 set. 2017.



Assimile

Novas descobertas mostram que mecanismos enzimáticos degradam as mitocôndrias paternas, fazendo com que só as maternas permaneçam. Contudo, esse fato só foi confirmado em espécies de nematoides, havendo necessidade de maiores estudos para confirmação do fato em outros animais (ZHOU et al., 2016).

Cloroplastos

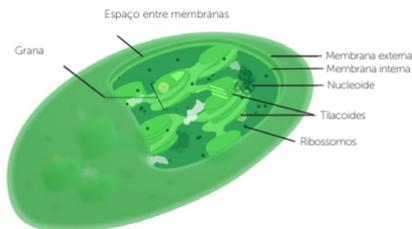
Na maioria dos organismos fotossintetizantes, como plantas e algas, os cloroplastos são as organelas responsáveis pela síntese de glicose. Sua cor verde é devida ao pigmento clorofila, presente na organela e responsável pela captação de luz no processo fotossintético. O interior do cloroplasto é formado de um sistema de estruturas, chamado de Grana, composto por pilhas de tilacoides. Assim como a mitocôndria, os cloroplastos possuem DNA próprio e dupla membrana e podem ter origem endossimbiótica.



Reflita

A simbiose é uma relação ecológica em que ambos os indivíduos envolvidos são beneficiados. Qual seria o benefício para uma célula obter uma mitocôndria ou cloroplastos? E qual seria o benefício para os seres procaríotos envolvidos?

Figura 1.22 | Cloroplastos do musgo *Mnium stellare* ao lado de esquema do cloroplasto



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Plant_anatomy#/media/File:03-10_Mnium2.jpg> ; <https://en.wikipedia.org/wiki/Chloroplast#/media/File:Chloroplast-cyanobacterium_comparison.svg>. Acesso em: 16 set. 2017.

Vacúolos

São estruturas abundantes nas células vegetais e também presentes em células animais, mas em menor tamanho e número.

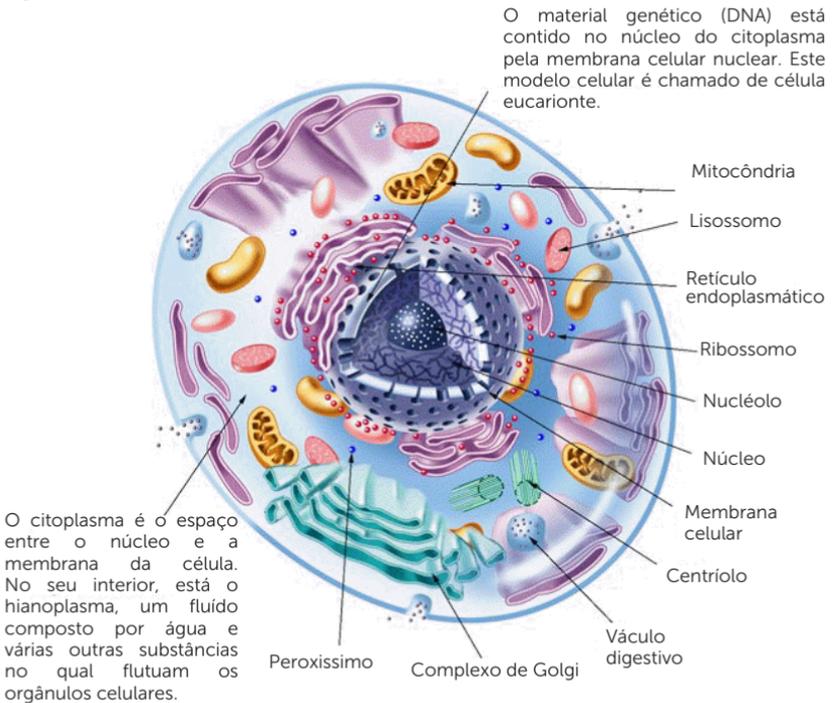
. Nas células vegetais, são responsáveis por armazenar substâncias como açúcares, lipídeos, pigmentos e sais minerais. A substância armazenada é chamada de suco celular ou suco vacuolar. Em células animais, podem formar os vacúolos digestivos, responsáveis pela digestão intracelular e o vacúolo autofágico, responsável por promover destruição de estruturas celulares para reaproveitá-las posteriormente.

Núcleo

E você sabe onde está a maior parte do material genético em nossas células? Ele está justamente em uma organela chamada núcleo, circundada por uma dupla membrana, a carioteca, visível somente em microscópio eletrônico. Sua face externa comunica-se com o retículo endoplasmático, que abordaremos adiante. A carioteca também controla a entrada e saída de substâncias e protege o material genético em seu interior das reações no citoplasma.

No interior do núcleo temos a cromatina, um emaranhado de fios de longas cadeias de DNA associadas à histonas, uma proteína responsável pela regulação dos genes. A cromatina pode se condensar e formar os cromossomos. O DNA controla todos os processos na célula, além de poder se duplicar e realizar transcrição em RNA (Ácido Ribonucleico), que será enviado para fora do núcleo e pode ter vários destinos, como ser traduzido nos ribossomos. Enquanto a célula não está em divisão, é possível visualizar nucléolos em locais da cromatina, que são regiões ricas em RNAr (RNA ribossômico), componente primário de ribossomos. O núcleo está presente somente em células eucariotas (Figura 1.23), assim como outras organelas que trataremos a seguir.

Figura 1.23 | A célula eucariota animal



Fonte: <https://pt.wikibooks.org/wiki/Introdu%C3%A7%C3%A3o_%C3%A0_Biologia/C%C3%A9lula/C%C3%A9lula_Procarionte_e_C%C3%A9lula_Eucarionte#/media/File:Cellula2.png> . Acesso em: 19 set. 2017.

Ribossomos

Formados basicamente por RNAr e proteínas, os ribossomos encontram-se em células procariontes e eucariotas, são responsáveis pela produção de proteínas, em um processo em que a informação vinda do núcleo por meio do RNAm (RNA mensageiro) é convertida em proteínas, onde o ribossomo é o responsável por ligar os aminoácidos (unidade das proteínas) em uma cadeia na sequência correta. Podem encontrar-se livres no citoplasma ou agregados ao retículo endoplasmático. Os ribossomos são formados por duas subunidades (30S e 60S), que se tornam ativas quando unidas.

Retículo endoplasmático

A célula eucariota possui uma rede de túbulos interconectados comunicados com o núcleo, chamada de retículo endoplasmático ou ergastoplasma, formado a partir de invaginações da membrana

plasmática. É dividido em dois tipos: o retículo endoplasmático liso (REL), responsável pela síntese de lipídeos e degradação de compostos como etanol e medicamentos; e o retículo endoplasmático rugoso ou granular (RER ou REG), assim chamado por possuir ribossomos aderidos nos túbulos, sendo responsável pela produção de proteínas, especialmente as que serão encaminhadas para fora da célula (como hormônios, enzimas etc.) por meio do Complexo de Golgi.

Golgi

Também chamada de complexo de Golgi ou golgiense, essa organela das células eucariotas é responsável por processar, modificar e distribuir substâncias na forma de vesículas, funcionando como um centro de armazenamento, empacotamento e distribuição da célula. É responsável também pela síntese de lisossomos, pela formação do acrossomo no espermatozoide, pela glicosilação de proteínas e lipídeos e, também, pela síntese de polissacarídeos. É uma organela constituída de várias membranas achatadas, chamadas de cisternas e se torna visível com técnicas de fluorescência.

Lisossomos e peroxissomos

Os lisossomos são organelas especializadas na digestão intracelular de substâncias vindas de fora ou presentes no interior da célula. É uma organela vesicular, que possui uma gama de enzimas digestivas em seu interior, como proteases, lipases, fosfatases, nucleases etc. A membrana do lisossomo possui proteínas transportadoras especiais, que permitem a passagem de subprodutos da digestão da organela para o citoplasma, e também mantém o pH ácido no interior da organela, essencial para manter as enzimas ativas. O citoplasma possui pH 7,0-7,4.

Os peroxissomos são organelas vesiculares especializadas no metabolismo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), composto produzido pela célula em suas reações metabólicas. Uma de suas enzimas, a catalase, degrada H_2O_2 em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O). O peroxissomo também possui enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídeos.

Essas não são as únicas estruturas presentes nas células. Você

ainda conhecerá outras estruturas importantes presentes nas células procariota e eucariota. Em nossa unidade seguinte, trabalharemos mais detalhes sobre o funcionamento dessas células. Vamos pôr em prática os conhecimentos que adquirimos até aqui? Vamos resolver os questionamentos e ampliar seu conhecimento procurando novas informações sobre o extenso ambiente intracelular.



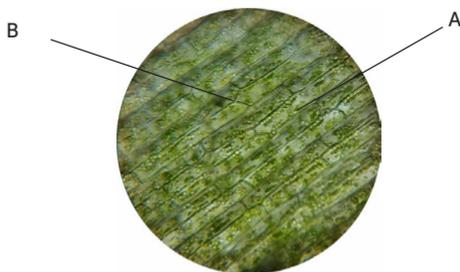
Pesquise mais

Agora que você já conhece mais sobre as organelas, acompanhe o conteúdo adicional, e aproveite também para resolver os exercícios propostos na página. MENDES, A.; PEREIRA, A.; NEVES, R. Citoplasma e organelas. Disponível em: <<http://educacao.globo.com/biologia/assunto/fisiologia-celular/citoplasma-e-organelas.html>>. Acesso em: 21 set. 2017.

Sem medo de errar

Agora chegou a hora de você verificar como anda o aprendizado de seus novos funcionários, corrigindo e mostrando possíveis erros na análise da lâmina apresentada inicialmente:

Figura 1.24 | Célula vegetal



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/waterweed-c%C3%A9lula-vegetal-1582259/>> Acesso em: 19 set. 2017.

Foi questionado aos *trainees*:

1. Quais estruturas estão apontadas na imagem acima?
2. Que tipo de organismo possui essa célula com tais estruturas?
3. Qual a teoria para a possível origem da organela apontada pela letra A? Qual vantagem ela traz para este organismo?

As duas estruturas apontadas fazem parte de organismos do reino vegetal. A estrutura apontada em A são cloroplastos, organelas citoplasmáticas responsáveis pela fotossíntese, que apresentam coloração verde devido ao pigmento clorofila, responsável pela captação da luz.

A estrutura apontada em B é a parede celular, composta de fibrilas de celulose nos vegetais, responsável principalmente pela proteção e suporte à célula, evitando também a desplasmólise pelo excesso de água absorvida pela planta.

Existe uma teoria que explica o surgimento dessa organela, chamada teoria da endossimbiose, em que organismos procariotos fotossintetizantes foram fagocitados pela célula, e não foram digeridos. A manutenção desse organismo oferece uma vantagem muito grande à célula: a possibilidade de obter alimento sem necessitar consumir outros organismos, ou seja, ser autotrófico, obtendo nutriente (glicose) a partir da luz e da fixação de dióxido de carbono (CO_2).

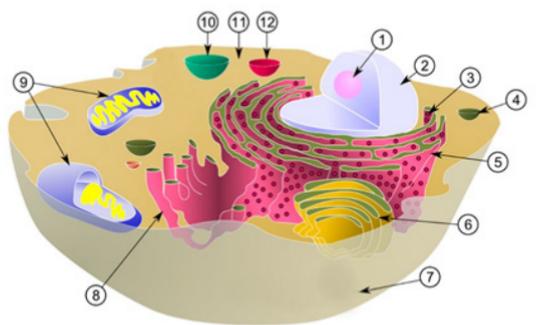
Responda os questionamentos propostos, detalhando um pouco mais sobre as estruturas apontadas.

Avançando na prática

Desbravando a unidade da vida

Como prova final do treinamento de funcionários, você trouxe um esquema de uma célula eucariota animal e os alunos devem preencher as lacunas e responder os questionamentos propostos:

Figura 1.25 | Célula eucariota animal



Fonte: <<https://pixabay.com/pt/waterweed-c%C3%A9lula-vegetal-1582259/>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

1. Essa estrutura é visível enquanto a célula não está em processo de divisão.
2. Essa estrutura surgiu na célula eucariota.
3. Todos os tipos de seres vivos possuem essa estrutura.
4. Possui enzimas como a catalase.
5. É responsável pela produção de moléculas, como hormônios.
6. Células secretoras possuem em grande número.
7. Possui uma propriedade chamada permeabilidade seletiva.
8. Faz síntese de lipídeos para a célula.
9. Provenientes apenas da mãe.
10. É bem vasta em número e volume nas células vegetais, mas células animais também possuem.
11. Possui água, íons e sais minerais, preenchendo a célula.
12. Possui enzimas hidrolíticas diversas.

As organelas ou estruturas presentes no esquema são: (1) nucléolo; carioteca; (3) ribossomos; (4) peroxissomo; (5) retículo endoplasmático rugoso; (6) Golgi; (7) membrana plasmática; (8) retículo endoplasmático liso; (9) mitocôndrias; (10) vacúolo; (11) citosol; (12) lisossomo.

Faça valer a pena

1. As bactérias, classificadas no reino Monera, são os seres vivos mais abundantes em número no planeta Terra. Acredita-se que a partir de ancestrais bacterianos, os reinos superiores surgiram, sendo assim, mesmo seres vivos primitivos compartilham características com plantas e animais, em especial estruturas intracelulares e processos metabólicos. Assinale a alternativa que possui uma estrutura comum em bactérias e células vegetais, mas que está ausente na célula eucariota animal.

- | | |
|-----------------------------|--------------------|
| a) Citoplasma. | d) Núcleo. |
| b) Retículo endoplasmático. | e) Parede celular. |
| c) Ribossomos. | |

2. Acredita-se que os primeiros seres que tenham surgido na Terra sejam procariotos heterotróficos, por volta de 3,8 bilhões de anos atrás. Esses seres, ancestrais das bactérias atuais, sofreram diversas mutações em seu material genético, dando origem a novas espécies de seres vivos, cada vez mais complexos.

Os seres vivos procariotos estão propensos a sofrerem mais mutações em seu material genético, quando comparados a seres eucariotos. Um dos fatores que explica esse fato é a:

- a) Presença de ribossomos livres no citoplasma.
- b) Ausência de parede celular.
- c) Ausência de carioteca.
- d) Existência de um número maior de cromossomos.
- e) Presença de cloroplastos.

3. A teoria da endossimbiose foi proposta por Lynn Margulis, em 1981, propondo que organelas como mitocôndrias e cloroplastos foram seres procariotos englobados pelas células eucariotas que, por oferecerem vantagens evolutivas, foram mantidas no meio intracelular. As mitocôndrias estão diretamente relacionadas com a produção de energia nas células, enquanto os cloroplastos promovem a fotossíntese em plantas e algas. Contudo, a teoria endossimiótica possui falhas, porque estas organelas não apresentam todas as características de organismos procariotos. Assinale a alternativa que aponta uma das características de mitocôndrias e cloroplastos que mostram as falhas na teoria.

- a) Ambas organelas não têm núcleo.
- b) Essas organelas não possuem material genético próprio.
- c) Ambas organelas não conseguem se autoduplicarem.
- d) Não há presença de ribossomos em cloroplastos e mitocôndrias.
- e) Mitocôndrias e cloroplastos não possuem dupla membrana.

Referências

- CÂMARA, B. Um breve histórico sobre o microscópio. **Biomedicina padrão**, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/05/um-breve-historico-sobre-o-microscopio.html>>. Acesso em: 11 set. 2017.
- DAVIDSON, M. **Basic concepts and formulas in microscopy**. Disponível em: <<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics>>. Acesso em: 11 set. 2017.
- FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009. Disponível em: <http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_30_1_19_14.pdf>. Acesso em: 16 set. 2017.
- HISTORY of microscope, **Reino Unido**, 2017. Disponível em: <History-of-the-microscope.org>. Acesso em: 11 set. 2017.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 376 p.
- LOPES, M. G. C. **Algas: características gerais, classificação e reprodução**. 2 mar. 2009. Uol Educação. Disponível em: <<https://educacao.uol.com.br/disciplinas/biologia/algas-2-caracteristicas-gerais-classificacao-e-reproducao.htm>>. Acesso em: 26 set. 2017.
- OPTICAL microscope. Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Optical_microscope>. Acesso em: 11 set. 2011.
- WANG, Z.; GUO, W.; LI, L.; LUK'YANCHUK, B.; KHAN, A.; LIU, Z.; CHEN, Z.; HONG, M. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope. **Nature Communications**, v. 2, 2011, 218. DOI: 10.1038/ncomms121.
- ZHOU, Q. et al. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. **Science**, v. 23, Jun. 2016. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/early/2016/06/22/science.aaf4777>>. Acesso em: 18 set. 2017.

Células eucarióticas e procarióticas

Convite ao estudo

A célula é a unidade da vida. É nesse pequeno universo, que forma todo ser vivo, que vamos concentrar nossos estudos a, começando por esta unidade. Você é formado por trilhões de células eucarióticas e possui, somente em seu corpo, 10 trilhões delas. Talvez seja um espanto para, mas além de suas células, você também carrega 10 trilhões de microrganismos, em sua maioria seres unicelulares e procarióticos, as suas bactérias simbiotes.

Mas você sabe o que são células eucarióticas e procarióticas? Nesta unidade abordaremos esses conteúdos para você conheça e saiba utilizar os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula.

Para auxiliar na aplicação dos aprendizados em nossa unidade, você irá incorporar nossa personagem da vez, uma analista de pesquisa em um laboratório de identificação de amostras biológicas, com ênfase principalmente na taxonomia e identificação de pragas e doenças do âmbito agrônômico e veterinário. Você trabalha em uma instituição pública, prestando serviços para a Secretaria de Agricultura do seu estado. Seu papel é identificar amostras e levantar características para auxiliar o trabalho em campo, controlando as doenças e pragas de diversas culturas e atividades do agronegócio. Realizar essa função possui como determinante o conhecimento sobre os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, como também saber aplicá-los para identificar

e diferenciar as células eucarióticas e procarióticas, seu ciclo e diferenciação celular, além de conhecimentos sobre a estrutura e fisiologia celular. Você sabe as diferenças entre os tipos básicos de célula? Conhece as fases de um ciclo celular?

Nossa Unidade 2 trará mais conhecimentos sobre as células eucarióticas e procarióticas. Em nossa Seção 2.1, iremos estudar a célula procariota, presente nas bactérias. Já a Seção 2.2 tratará sobre a célula eucariota, presente em todos os organismos superiores. Por fim, na Seção 2.3, vamos conhecer os processos de divisão celular redutiva e duplicativa: a meiose e a mitose. Bons estudos!

Seção 2.1

Células procarióticas

Diálogo aberto

Em seu dia a dia de trabalho, como analista de pesquisa em um laboratório de identificação de amostras biológicas, você lida com diversas amostras para estudo da taxonomia e identificação de pragas e doenças do âmbito agrônômico e veterinário. Para realizar esta função, é necessário dominar os conceitos referentes ao estudo das células eucarióticas e procarióticas, seu ciclo e diferenciação celular, além de conhecimentos sobre a estrutura e fisiologia celular.

É parte da rotina do seu trabalho realizar a identificação de amostras, advindas de todo o estado, e comumente os pecuaristas e agricultores não fazem ideia de qual problema está acometendo seus animais e plantas. Desta vez é um citricultor do interior do estado que envia uma amostra de planta procurando auxílio na identificação do problema. Ele se queixou da queda de produtividade de laranjas. As folhas enviadas estão deformadas, com manchas amarelo-esverdeadas, e os frutos nascem disformes e com casca espessa (Figura 2.1).

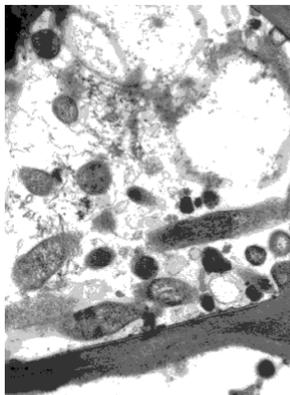
Figura 2.1 | Amostras recebidas



Fonte: adaptada de <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140242/1/FOLDER-HLB.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2017.

Ao realizar exames de microscopia, você nota a presença de microrganismos nos tecidos de condução da planta. São organismos unicelulares, com ausência de carioteca em torno do material genético, e que têm parede celular com uma camada fina de peptidoglicanos, com camada de lipopolissacarídeo (LPS) (Figura 2.2).

Figura 2.2 | Análise microscópica da amostra



Fonte: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Huanglongbing.aspx>>. Acesso em: 5 ago. 2017.

Que tipo de microrganismo pode ter infectado a planta? A qual reino pertence o parasita? Qual teste você poderá fazer para analisar o tipo de parede celular que o organismo apresenta? Qual o resultado da coloração deste teste, levando em conta as características da parede celular? Apresente um relatório com suas conclusões sobre a amostra recebida, colocando as características e a possível identificação do agente da amostra.

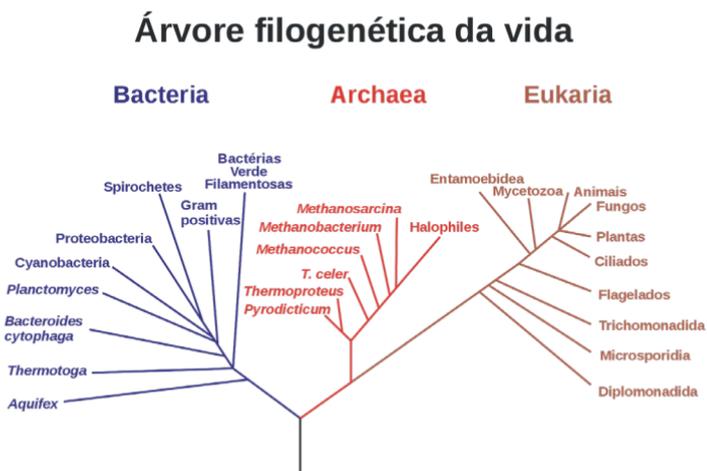
Não pode faltar

Com o conhecimento adquirido até agora, você é capaz de reconhecer algumas estruturas e organelas celulares trabalhadas em nossa unidade anterior. Na atual seção, iremos lembrar algumas delas, pois são essenciais para o entendimento de nosso objeto de estudo: a célula procariótica, também chamada de procariota ou procarionte. Esse nome é oriundo do grego (πρό (pro) + κάρυον (karyon), e significa "núcleo primitivo".

Seguindo a taxonomia de Whittaker, que distingue os seres vivos em cinco reinos, os seres que possuem células procariotas

estão classificados no Reino Monera, onde estão presentes todas as bactérias, representantes únicas dessa categoria. Contudo, uma classificação distinta foi proposta por Carl Woese, dividindo os seres em três domínios, por meio da análise de RNA ribossômico (RNAr). Os domínios agrupam as bactérias (Eubacterias), outros seres procariontes (chamados de Archaeas) e organismos eucariontes (Eukaria), como mostra a figura 2.3.

Figura 2.3 | Árvore filogenética de Woese, baseada na análise de RNAr



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema_dos_Tr%C3%AAs_Dom%C3%ADnios#/media/File:Phylogenetic_tree_pt.svg>. Acesso em: 29 set. 2017.

Os seres agrupados nos Archaea são procariontes, mas considerados distintos das bactérias, devido à sua genética e processos metabólicos distintos. Geralmente habitam ambientes extremos, como locais de alta temperatura, pHs extremos, alta salinidade, ambientes ricos em enxofre e ácido sulfúrico etc. As archaeas foram provavelmente os primeiros seres vivos que surgiram, sendo encontrados em fósseis de cerca de 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 2006), e, por meio de mutações e modificações, deram origem a outros tipos de organismos.

As bactérias não possuem um sistema elaborado de membranas, como ocorre nas células eucariontes, e suas moléculas e íons ficam dispersos no citoplasma. Esse é um dos prováveis motivos para seu tamanho reduzido de sua célula. Contudo, apesar de possuírem uma estrutura mais simples, as bactérias têm um metabolismo

complexo e diversificado, o que possibilita ao grupo sobreviver em todos os locais da Terra, inclusive em habitats inóspitos, como crateras de vulcões, no interior de corpo de organismos superiores, regiões com pH extremamente ácido, com ausência de oxigênio, entre outros.

Refleta

Ao contrário do pensamento comum, não são as árvores que fornecem a majoritária parte do oxigênio que os seres aeróbios respiram, mas, sim, as cianobactérias, bactérias autótrofas fotossintetizantes (possuem clorofila e outros pigmentos), sendo responsáveis pelo aparecimento do oxigênio no planeta. Então quem surgiu primeiro? Seres aeróbios ou anaeróbios?

É comum pensarmos que bactérias são malélicas, responsáveis por causar doenças. Contudo, apenas uma pequena parte do grupo é patogênica, sendo a maioria inofensiva e muitas vezes benéfica, responsáveis por produção de oxigênio, decomposição de compostos orgânicos, simbioses em plantas para fixação de nitrogênio, biorremediação etc.

Assimile

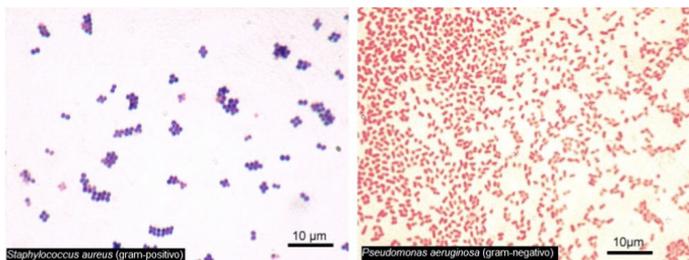
Bactérias do gênero *Rhizobium* são simbioses de plantas leguminosas (família Poaceae), responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico. Então, plantas como amendoim, soja e crotalária podem ser utilizadas na rotação de cultura para incrementar a quantidade de nitrogênio no solo.

A estrutura de uma célula procarionte é simples, composta de uma membrana celular semelhante a das células eucariotas, envolvendo o citoplasma. Externamente, existe uma **parede celular** rígida e espessa que protege e dá formato à célula (apenas *Mycoplasma* não contém). Ela é composta principalmente de peptidoglicano (mureína) e de unidades de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico e peptídeos. Conforme a estrutura da parede celular, as bactérias são diferenciadas em gram-positivas e gram-negativas pelo método da coloração de Gram, baseada na capacidade de a parede celular reter o corante cristal violeta.

Bactérias gram-positivas contêm basicamente uma espessa camada de peptidoglicanos, e se coram em roxo. As bactérias gram-negativas são mais complexas, constituídas de uma camada

de peptidoglicanos, mais fina. Também apresentam uma camada de lipoproteínas; uma membrana externa (semelhante à membrana celular) e mais externamente uma camada de lipopolissacarídeos (LPS), se corando em vermelho.

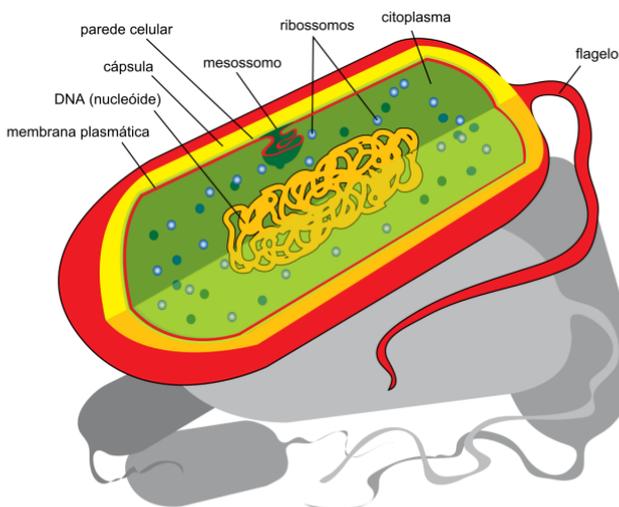
Figura 2.4 | Bactérias gram-positivas (à esquerda) e gram-negativas (à direita)



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9cnica_de_Gram#/media/File:Staphylococcus_aureus_Gram.jpg> e <https://pt.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9cnica_de_Gram#/media/File:Pseudomonas_aeruginosa_Gram.jpg>. Acesso em: 30 set. 2017.

Exteriormente à parede celular, algumas bactérias possuem uma camada adicional, chamada de **cápsula**, que aumenta seu fator de virulência (nível da capacidade de provocar doença). A membrana plasmática ainda pode conter invaginações, chamadas de **mesossomos**, responsáveis pela respiração, formação da parede celular e de septos (figura 2.5).

Figura 2.5 | Esquema de uma célula procariótica



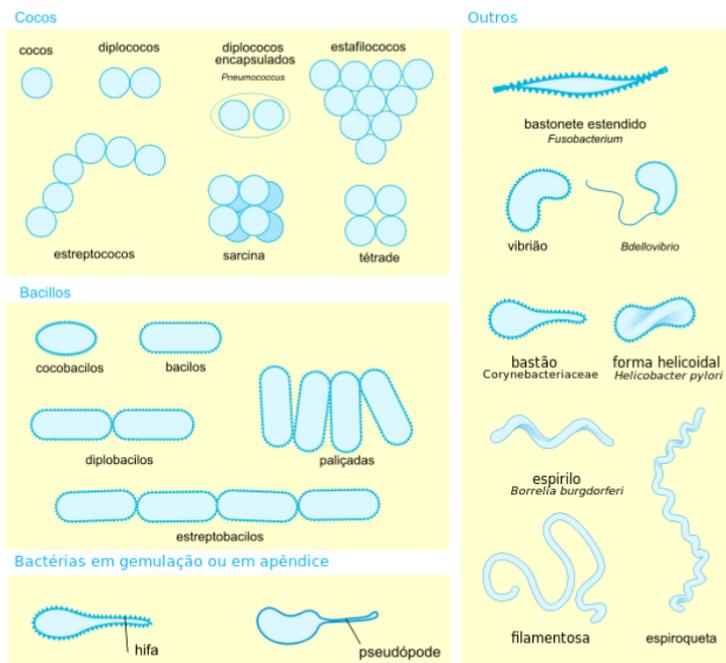
Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Prokaryote_cell_diagram_pt.svg>. Acesso em: 30 set. 2017.

O DNA bacteriano não se encontra em um núcleo, portanto, não possui a proteção da carioteca, concentrando-se em uma ou mais estruturas chamadas de **nucleoides**, que contêm o cromossomo bacteriano. Geralmente é localizado próximo ou associado à membrana plasmática. O cromossomo é constituído de um filamento circular com duas hélices, extremamente compactado no interior da célula. Bactérias também podem apresentar DNA extracromossômico, chamados de plasmídeos, que carregam informações genéticas e multiplicam-se independentemente e, comumente, são trocados por bactérias em um processo chamado conjugação. Há também mobilidade de partes de DNA entre cromossomos e **plasmídeos**, aumentando as variações genéticas, facilitando mutações e a resistência a antibióticos, o que aumenta a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos. Os plasmídeos são utilizados na engenharia genética para transferência de material genético.

Dispersos no citoplasma da célula procarionte, encontraremos muitos **ribossomos**, responsáveis pela produção de proteínas. Os ribossomos bacterianos possuem cerca de 20 nm, são menores que os das células eucariotas (30 nm) e formados pelas subunidades 50S e 30S, que, unidas, formam a unidade 70S. As bactérias também podem apresentar prolongamentos e **flagelos**, relacionados diretamente com a movimentação da célula. Podem, ainda, apresentar **fímbrias ou pili**, que são apêndices filamentosos mais curtos e numerosos que os flagelos, relacionados com funções de fixação ao substrato e transferência unidirecional de material genético entre as bactérias durante a conjugação (feito pelas fímbrias sexuais ou pilus sexual).

As bactérias também podem apresentar diferentes formas e realizar agrupamentos característicos, que são úteis para sua identificação. As arredondadas são chamadas de cocos, enquanto as de forma alongada recebem o nome de bacilo, as de forma espiral são chamadas de espirilos, como mostra a figura 2.6. Ainda na mesma figura é possível observar os agrupamentos, bastante frequentes de serem observados, chamados de estafilococos, estreptococos etc.

Figura 2.6 | Morfologia bacteriana



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bacterial_morphology_diagram_pt.svg>. Acesso em: 30 set. 2017.

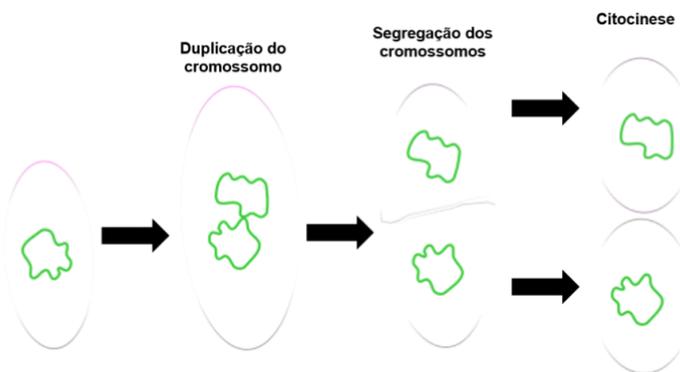
Quando estudamos os seres procarióticos, notamos a sua variabilidade metabólica, sendo possivelmente o grupo mais diverso entre os seres vivos. Conseguem viver em temperaturas extremas, como as *Thermus aquaticus*, que vivem em ambientes próximos a 70°C, ou em locais extremamente frios para a vida, como a *Polaromonas vacuolata*, que se reproduz em cerca de 4°C. Além dessa diversidade, bactérias podem utilizar diversas moléculas como fonte de carbono e gerar energia a partir da fotossíntese (utiliza energia da luz) ou quimiossíntese (utiliza energia de compostos químicos orgânicos e inorgânicos).

De acordo com seu metabolismo, as bactérias podem ser classificadas como **aeróbias** (utilizam obrigatoriamente oxigênio comoceptor final de elétrons) e, **anaeróbias estritas** (não conseguem sobreviver na presença de oxigênio), **anaeróbias aerotolerantes** (não utilizam, mas sobrevivem na presença de oxigênio) e **anaeróbias facultativas** (podem utilizar oxigênio ou

outro aceptor final de elétrons). Vale lembrar que os seres anaeróbios podem utilizar carbonato, sulfato, piruvato, acetaldeído, entre outros aceptores finais de elétrons.

Mas como ocorre a reprodução de uma bactéria? A reprodução ocorre por fissão, também chamada de **cissiparidade ou bipartição**. A célula-mãe duplicará seu material genético, transferindo uma cópia para cada uma das células-filhas. A cópia do DNA, ocorre como nas células eucariotas, com a separação das fitas de DNA para que cada uma sirva de molde para a que será formada, processo chamado de **semiconservativo**. Em bactérias, esse processo pode ocorrer rapidamente, com divisões em menos de 20 minutos, gerando grandes populações em poucas horas.

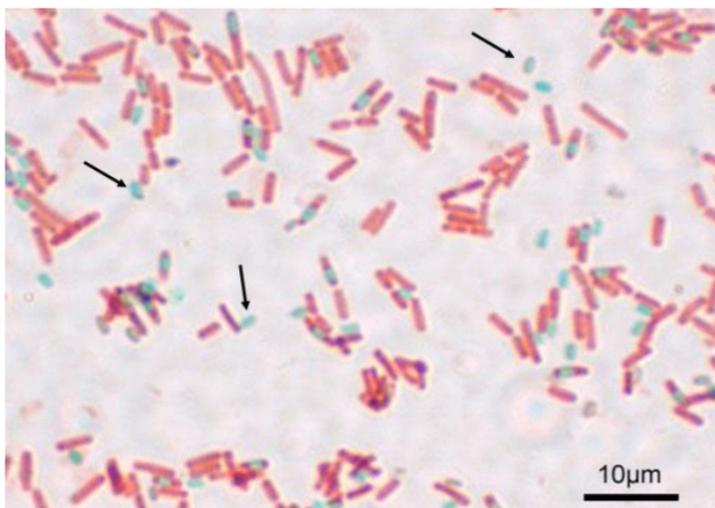
Figura 2.7 | Processo de divisão simples ou cissiparidade



Fonte: adaptada de <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteria#/media/File:Three_cell_growth_types.svg>. Acesso em: 30 set. 2017.

Além da rápida reprodução, bactérias possuem estratégias para sobreviver a ambientes diversos, a partir da formação de esporos. São estruturas resistentes, com pouquíssima água e praticamente sem atividade metabólica. Esporos são capazes de resistir a ambientes com falta de água, temperaturas extremas e outras condições adversas, sobrevivendo centenas de anos e retornando à atividade celular vegetativa. O esporo é também chamado de "endósporo", por ser formado no interior da célula.

Figura 2.8 | Endósporos de *Bacillus subtilis*, marcados em verde e apontados pelas setas



Fonte: adaptada de <https://en.wikipedia.org/wiki/Endospore#/media/File:Bacillus_subtilis_Spore.jpg>. Acesso em: 30 set. 2017.



Exemplificando

Endósporos são utilizados na agricultura para controle biológico de pragas. Endósporos e cristais (proteínas cry) de *Bacillus thuringiensis* são utilizados para controle de lagartas em diversos cultivos. Atualmente, plantas transgênicas recebem o gene plasmidial para produzir os cristais e causarem morte de lagartas no campo.

Você deve ter notado a importância dos seres procariotos na manutenção da vida. A vida como é hoje na Terra não seria possível sem a existência desse tipo de microrganismo. Somente no solo essas bactérias participam de processos relativos à quantidade de nutrientes, umidade, temperatura, pH, grau de aeração etc.

Existem muitos gêneros e espécies de bactérias relevantes na área agropecuária, sendo malélicas ou benéficas. Além das citadas anteriormente, o Quadro 2.1 mostra algumas dessas bactérias e seu papel na nossa área de estudo.

Quadro 2.1 | Organismos procariotos importantes na área agropecuária

| | |
|--|---|
|  | Azotobacter, Nitrosomonas e Nitrobacter: participam da ciclagem do nitrogênio no solo, convertendo o nitrogênio atmosférico e amônia em nitrito e nitrato, disponibilizando para as plantas. |
|  | Rickettsia spp.: gênero de bactérias gram-negativas, parasitas causadoras de zoonoses e patologias veterinárias, como a febre maculosa (transmitida pelo carrapato <i>Amblyomma cajennense</i> , conhecido como carrapato estrela) e tifo (transmitido por piolhos). |
|  | Candidatus Liberibacter spp.: bactéria gram-negativa causadora do Greening ou Huanglongbing (HLB), doença de disseminação rápida e difícil controle na cultura citrus. Deixa as folhas da planta amareladas e frutos assimétricos. É transmitida pelo psilídeo <i>Diaphorina citri</i> . |
|  | Xanthomonas spp.: É um gênero com largo número de espécies de bactérias gram-negativas, causador de diversas patologias em plantas, como cancro cítrico, mancha bacteriana, escaldadura, raquitismo, entre outras. |
|  | Ralstonia solanacearum: bactéria gram-negativa causadora de fitopatologias em diversas culturas, como tomate, pimenta, berinjela, batata, etc. |
|  | Bacillus subtilis: bactéria gram-positiva saprofítica de solo, mas que pode ser utilizada como promotor de crescimento e agente de controle biológico. É comum ser encontrada na rizosfera da planta. |
|  | Bactérias do rúmen: são várias espécies, maioria anaeróbicas, que habitam o trato digestório de ruminantes, realizam a digestão de celulose, amido, proteínas, entre outros nutrientes. |

Fonte: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Azotobacter#/media/File:SmallAzoto.jpg>>; <https://en.wikipedia.org/wiki/Rickettsia#/media/File:Rickettsia_rickettsii.jpg>; <<http://www.fundecitrus.com.br/img/doencasepragas/fundecitrus-greening-3.jpg>>; <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Xanthomonas_leaf_spot.png>; <https://en.wikipedia.org/wiki/Ralstonia_solanacearum#/media/File:Ralstonia_solanacearum_symptoms.jpg>; <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis#/media/File:Baillus_subtilis_endospore_stain.png>; <https://en.wikipedia.org/wiki/File:CH_cow_2_cropped.jpg>. Acesso em: 1 out. 2017.

Os seres procariotos possuem grande variabilidade e importância, por isso cabe a você se aprofundar mais em um assunto tão extenso e de interesse de várias áreas do conhecimento. Agora que você finalizou esta seção, já tem uma bagagem suficiente para alicerçar seus novos estudos, como também resolver os problemas propostos. Vamos aplicar nosso conhecimento na prática?

Pesquise mais

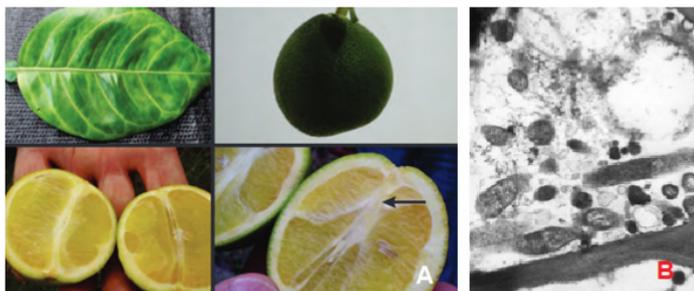
Conheça a Khan Academy, uma ONG especializada em conteúdo educacional gratuito, que conta com mais de 3.800 vídeos. O vídeo a seguir trata sobre microrganismos em geral. A parte que trata sobre archaeas e bactérias se estende até o minuto 8:48.

KHAN ACADEMY. **Antigo e Estranho:** Archaea, Bactérias e Protistas | Biologia | Khan Academy. 2017. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=_yTpMMW2UzQ>. Acesso em: 1 set. 2017.

Sem medo de errar

Durante a análise da amostra que foi recebida, você notou que as folhas de laranja enviadas pelo agricultor estão deformadas e com manchas amarelo-esverdeadas, além de frutos disformes e com casca espessa. Ao realizar as análises microscópicas, é notável a presença de microrganismos unicelulares, com ausência de carioteca e presença de parede celular com uma camada fina de peptidoglicanos, com camada de lipopolissacarídeo (LPS).

Figura 2.1 | Amostras recebidas



Fonte: adaptada de: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140242/1/FOLDER-HLB.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2017.

Que tipo de microrganismo pode ter infectado a planta? A qual reino pertence o parasita? Qual teste você poderá fazer para analisar o tipo de parede celular que o organismo apresenta? Qual o resultado da coloração deste teste, levando em conta as características da parede celular? Apresente um relatório com suas conclusões sobre a amostra recebida, colocando as características e a possível identificação do agente da amostra.

No laudo a ser entregue no final da análise, é necessário conter o tipo de microrganismo infectante e sua classificação por reino. Por se tratar de um microrganismo procarioto, notável pela ausência de carioteca e pela parede celular composta de peptidoglicano, temos uma amostra de bactérias, organismos que pertencem ao Reino Monera.

Quanto à composição da parede celular, podemos realizar o teste da coloração de Gram, que nos indicará a constituição dessa estrutura. Por possuir uma camada delgada de peptidoglicano e outra de LPS, a bactéria da amostra deverá ter a coloração rosa, característica de bactérias gram-negativas. Possivelmente, a amostra

possui infecção pela bactéria gram-negativa *Candidatus Liberibacter* sp., causadora da doença HLB (Huanglongbing), também conhecida por Greening, uma das principais doenças de citros, que apresenta sintomas como amarelecimento das folhas e frutos assimétricos.

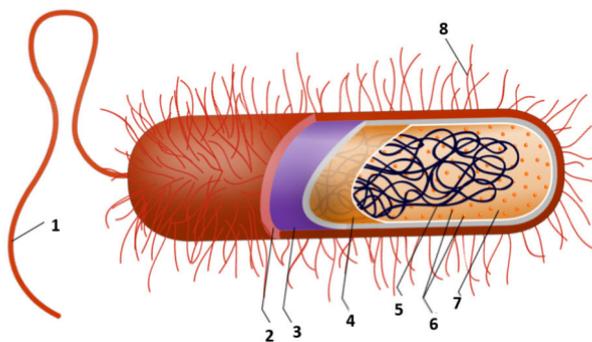
Apresente seu laudo final, contendo todas essas informações que auxiliarão o agricultor a tomar as medidas necessárias contra essa doença extremamente virulenta nas plantas de citros.

Avançando na prática

À prova de erros

Descrição da situação-problema

Em sua carreira, cargos públicos são uma opção que garante estabilidade e salários justos. Durante um concurso público para fiscal da vigilância sanitária, você se deparou com uma imagem de uma bactéria e será necessário identificar suas partes principais. Você consegue resolver este exercício, nomeando as estruturas de 1 a 8?



Fonte: Adaptada de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5e/Prokaryote_cell_%28Spanish_version%29.svg>. Acesso em: 1 out. 2017.

Resolução da situação-problema

As estruturas apontadas são:

- Flagelo.

- Cápsula.
- Parede celular.
- Membrana plasmática.
- DNA ou nucleóide.
- Ribossomos.
- Citoplasma.
- Pili ou fímbrias.

Faça valer a pena

1. Os seres procariotos são provavelmente os primeiros organismos que surgiram na Terra primitiva, que, por meio de mutações, deram origem a seres com maior complexidade e número de células. Evidências fósseis mostram que esse tipo de organismo surgiu no planeta há cerca de 3,5 bilhões de anos.

Os seres procariotos são assim chamados e classificados por possuir como características básicas:

- a) Presença de núcleo único e parede celular.
- b) Ausência de pigmentos fotossintéticos e de núcleo celular.
- c) Possuir somente uma célula e ribossomos.
- d) Ausência de carioteca e de organelas celulares e serem unicelulares.
- e) Presença de nucleóide e organelas citoplasmáticas.

2. A resistência a antibióticos é uma das principais preocupações da comunidade médica quando se trata de bacterioses. As chamadas superbactérias são uma ameaça global, por isso institutos de pesquisas se mantêm alertas e em constante desenvolvimento de novos antibióticos. Bactérias como a *Acinetobacter* spp. são altamente resistentes e causam infecções sanguíneas, de urina e no trato respiratório.

A respeito do desenvolvimento de resistência a antibióticos pelas bactérias, assinale a alternativa correta:

- a) Bactérias gram-positivas são as únicas que não possuem resistência a antibióticos, pois não possuem camada de peptidoglicano em sua parede celular.
- b) O uso indiscriminado de antibióticos, juntamente com a capacidade de bactérias realizarem trocas de plasmídeos, favorece o surgimento de cepas resistentes.

c) A capacidade das bactérias em proteger seu material genético com a geração de carioteca impede que medicamentos sejam eficazes, e a capacidade de conjugação entre esses organismos aumenta o número de superbactérias.

d) Apesar de mutações surgirem em um ritmo acelerado no grupo das bactérias, sua multiplicação por divisão celular desfavorece o crescimento rápido desses organismos, sendo uma das vantagens do sistema imunológico humano para combatê-las.

e) As bactérias gram-negativas são os patógenos mais perigosos, pois ao contrário das gram-positivas, possuem núcleo e cápsula, que confere maior virulência e resistência aos antibióticos.

3. A teoria endossimbiótica propõe que certas organelas de células eucariotas, como mitocôndrias e cloroplastos, foram organismos procariotos englobados pelas células, e mantidos para gerar algum tipo de benefício, como aproveitamento mais eficaz da energia ou a capacidade de realizar fotossíntese.

Assinale a alternativa que apresenta um grupo de bactérias que pode ter participado no processo de endossimbiose na formação de cloroplastos nos eucariotos fotossintetizantes.

- a) Cianobactérias.
- b) Anaeróbias facultativas.
- c) Todas as aeróbias estritas.
- d) Archeastermófilas.
- e) Anaeróbias obrigatórias.

Seção 2.2

Células eucarióticas

Diálogo aberto

Nesta seção, iremos abordar as células eucarióticas, que compõem indivíduos mais complexos, como protozoários, algas, fungos, animais e vegetais. É o segundo passo da nossa caminhada para entender a estrutura dos organismos que vivem em nosso planeta.

Nosso desafio é acompanhar o dia a dia de uma analista de pesquisa que lida com identificação de amostras biológicas, com ênfase principalmente na taxonomia e identificação de plantas e doenças do âmbito agrônômico e veterinário. Você possui a incumbência de prestar serviços para a Secretaria de Agricultura do seu Estado e, para realizá-los, é necessário conhecimento acerca dos conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, como também saber aplicá-los para identificar e diferenciar as células eucarióticas e procarióticas, seu ciclo e diferenciação celular, além de conhecimentos sobre a estrutura e fisiologia celular.

Em sua rotina de trabalho, você lida com agentes parasitários de diferentes grupos taxonômicos. Hoje, recebeu amostras de um produtor de limão, que está preocupado com sua plantação, que apresenta sinais semelhantes a queimaduras nas folhas e frutos.

A amostra é oriunda de uma plantação de limão de uma cidade próxima ao laboratório. São folhas de limoeiro escurecidas, com uma camada fina e pegajosa, de coloração negra, assemelhando-se às queimaduras. Ao triturar as folhas e observar a amostra em microscópio, são observados dois padrões de células: o primeiro padrão possui células nucleadas, parede celular com presença de quitina, um polissacarídeo comum em exoesqueleto de artrópodes, além das células formarem tecidos filamentosos; já o segundo padrão apresenta células nucleadas, com presença de parede celular de celulose, organelas esverdeadas e grandes vacúolos.

De que tipos de células estamos tratando nesta amostra? Quais organismos estão presentes no primeiro e no segundo padrão, respectivamente?

Prepare uma tabela com as diferenças entre o primeiro e segundo padrão, juntamente com outras características desses tipos de células, concluindo com a classificação de cada um. Essas informações serão enviadas ao laboratório de taxonomia, para identificação e confirmação do problema do agricultor.

Não pode faltar

As células procarióticas que estudamos na seção passada são adaptadas a diversos ambientes e tiveram um inegável sucesso evolutivo. A partir de mudanças nos procariotos, como invaginações e dobramentos nas membranas, foi possível que as células obtivessem tamanhos maiores, compartimentassem certas substâncias e protegessem moléculas importantes, como o DNA. Essas invaginações e dobramentos deram origem às estruturas que conhecemos como organelas celulares e ao núcleo celular. A presença de organelas, carioteca e grande número de membranas são características das células eucarióticas, do grego **ευ** (verdadeiro) e **καριον** núcleo).

As células eucarióticas, também chamadas de eucariotas ou eucariontes, formam os seres dotados de núcleo, representados desde organismos unicelulares (como protozoários e algas) até grandes organismos pluricelulares (como animais, plantas e fungos).

Assim, nesta seção iremos abordar os dois tipos mais estudados de células eucariotas: a célula animal e a vegetal. Apesar de ambas possuírem núcleo e organelas, também apresentam várias diferenças em sua estrutura, na presença de organelas e no metabolismo. Detalharemos algumas organelas que tratamos anteriormente e apresentaremos novas estruturas importantes.

A célula eucarionte animal

A célula animal é caracterizada por não possuir parede celular, sendo delimitada pela sua membrana plasmática, que controla a entrada e saída de substâncias. O núcleo é envolvido por uma dupla membrana lipoproteica revestida internamente por proteínas. A membrana externa

da carioteca é ligada externamente ao retículo endoplasmático. Na próxima seção abordaremos com detalhes os processos que ocorrem no interior do núcleo.

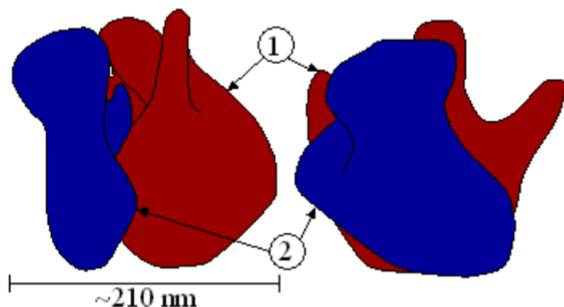


Assimile

Com a ausência da parede celular, a célula animal depende de outra estrutura para manter seu formato. O citoesqueleto é responsável por essa função. Estudaremos sobre essa estrutura na próxima seção.

Assim como as bactérias, a célula animal também apresenta membrana plasmática, citoplasma e ribossomos. Contudo, os ribossomos das células eucariotas são distintos, mais complexos, maiores (cerca de 210 nm) e possuem as subunidades 40S e 60S, que, quando unidas, formam o complexo ativo 80S. Os ribossomos processarão a informação vinda do núcleo e realizarão a síntese de proteínas no citoplasma como ribossomos livres, ou aderidos ao retículo endoplasmático.

Figura 2.9| Estrutura de um ribossomo eucarioto



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ribossoma#/media/File:Ribosome_structure.png>. Acesso em: 3 out. 2017.

O citoplasma é preenchido pelo citosol, composto por água, íons, aminoácidos, precursores de ácidos nucleicos, enzimas diversas etc. Além disso, encontramos organelas citoplasmáticas. Não existe um consenso sobre a definição de organela, variando conforme autores. Alguns consideram organela uma estrutura envolvida por membranas, enquanto outros consideram organela uma estrutura intracelular com função bem definida (mesmo sem membrana), o que incluiria os ribossomos, centrossomos, entre outros.

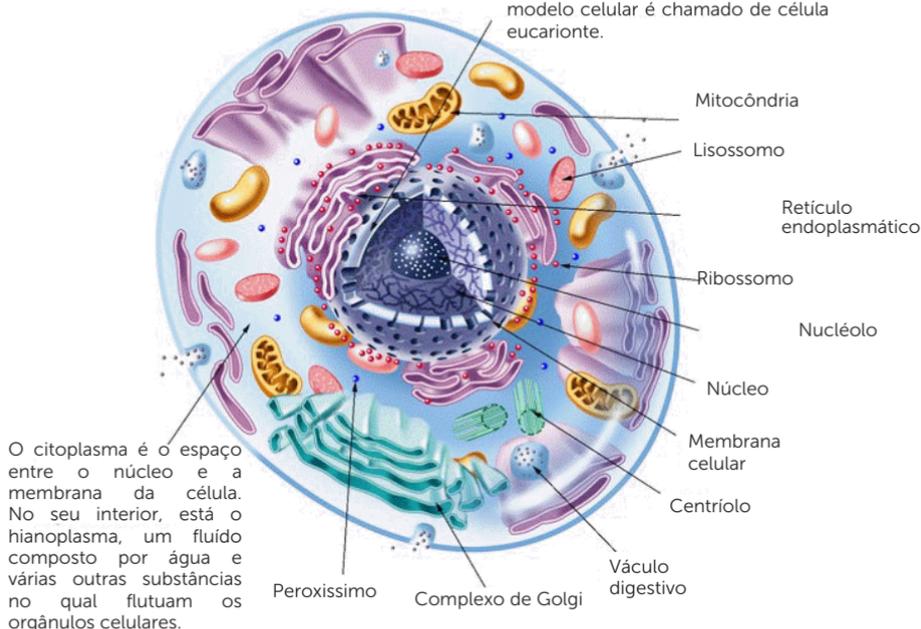
Além dessas estruturas, existem as organelas que você conheceu na Seção 1.3, como ribossomos, retículo endoplasmático liso (R.E.L.) e granular (R.E.G.), lisossomos, peroxissomos e vacúolos, como mostra a Figura 2.10. A grande quantidade de compartimentos e membranas possibilita as células eucarióticas ter um tamanho muito superior ao das células procarióticas.

Assimile

Uma célula procariótica tem tamanho médio de 1 a 5 μm . Contudo, existem bactérias extremamente reduzidas, que possuem diâmetro de 0,1 a 1,0 μm . Comparavelmente, uma célula eucarionte é muito maior, variando de 10 a 100 μm de diâmetro e com um volume 1000 a 10000 vezes maior.

Figura 2.10 | Esquema de uma célula eucariótica animal

O material genético (DNA) está contido no núcleo do citoplasma pela membrana celular nuclear. Este modelo celular é chamado de célula eucarionte.



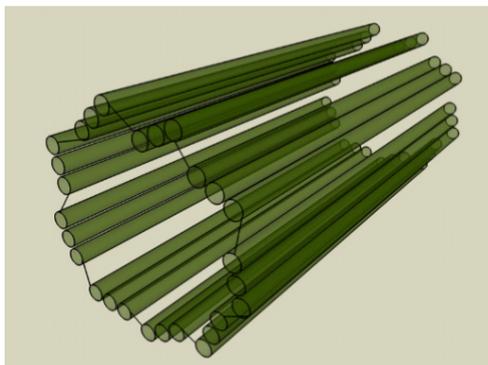
Fonte: <https://pt.wikibooks.org/wiki/Introdução_à_Biologia/Célula/Célula_Procariote_e_Célula_Eucarionte#/media/File:Cellula2.png>. Acesso em: 3 set. 2017.

Os vacúolos das células animais são muito reduzidos, quando comparados aos da célula vegetal. Muitos protozoários possuem vacúolos contráteis, utilizados para coletar e expelir água, controlando o nível osmótico do meio intracelular com meio externo. Nos processos de endocitose, o vacúolo pode se unir a lisossomos, formando estruturas chamadas de vacúolos digestivos, que vão digerir as partículas capturadas pela célula. Nas células humanas, os vacúolos não possuem nome específico e podem desempenhar funções diversas, como armazenamento de reserva nos adipócitos (células de gordura), que contêm lipídeos e compreendem boa parte do volume da célula.

Além de armazenar lipídeos, as células animais armazenam carboidratos na forma de glicogênio, em especial nas células musculares e do fígado, chamadas hepatócitos. Esse polissacarídeo é encontrado como reserva nos animais, fungos e alguns procaríotos, como as cianobactérias.

As células animais também possuem centríolos, estruturas de formato cilíndrico constituídas de nove trincas de microtúbulos (Figura 2.11), localizados no centro das células e dispostos sempre em pares. Eles têm capacidade de se autoduplicar e participam do processo de divisão celular, organizando o fuso mitótico, que arranjará os cromossomos durante os processos de mitose e meiose. Além disso, atuam na formação de cílios e flagelos das células animais.

Figura 2.11 | Estrutura básica de um centríolo



Fonte: <<https://bs.wikipedia.org/wiki/Centriola#/media/File:Centriole3D.png>>. Acesso em: 3 set. 2017

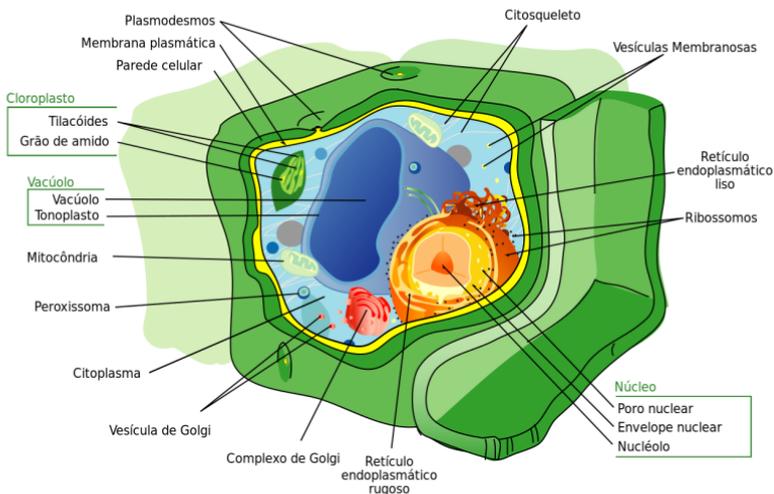
Os flagelos mencionados anteriormente são distintos dos encontrados nas células procarióticas. Também chamados de cílios, os flagelos eucariotos desempenham função semelhante ao flagelo bacteriano, mas apresentam estrutura e origem evolutiva distinta. Seu movimento é fundamentado no uso de ATP por proteínas motoras, chamadas dineínas, que formam parte do citoesqueleto, que abordaremos em seção adiante. O espermatozoide é única célula flagelada nos mamíferos.

A célula eucarionte vegetal

A célula vegetal também possui diversas organelas encontradas na célula animal, como núcleo, ribossomos, mitocôndrias, Golgi, REG e REL, citoesqueleto, entre outras (Figura 2.12). Outras estruturas, como os centríolos, são encontradas apenas nas briófitas e pteridófitas, sendo ausentes nos gimnospermas e angiospermas. Os vacúolos são estruturas presentes nas células animais e observados na célula vegetal, porém encontram-se em maior número e com tamanho muito maior.

Os vacúolos vegetais são formados por uma membrana única (tonoplasto) e podem ocupar quase todo o volume celular, reduzindo o citoplasma apenas a uma pequena faixa periférica da célula. As funções variam, desde a manutenção do equilíbrio osmótico, retirada de produtos tóxicos, degradação de moléculas, manutenção do pH e reserva de substâncias ergásticas no seu suco vacuolar. Encontramos ali armazenadas substâncias como o amido (reserva de carboidratos das plantas) e outros açúcares, sais minerais, proteínas, pigmentos (antocianina, por exemplo), ácidos orgânicos, oxalato de cálcio (protegem contra herbivoria), entre outras moléculas e substâncias.

Figura 2.12| A célula eucariótica vegetal



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Célula_vegetal#/media/File:Plant_cell_structure_pt.svg>. Acesso em: 3 out. 2017.

Nos vegetais há também a presença de glioxissomos, que são peroxissomos especializados, encontrados em tecidos ligados à germinação de sementes. Essas organelas fazem a conversão de ácidos graxos em açúcares, fornecendo energia ao embrião até que seja capaz de realizar fotossíntese.

Além da parede celular e dos vacúolos, a célula eucariótica vegetal possui outra característica peculiar e visível ao microscópio óptico: os plastídeos ou plastos. São organelas de membrana dupla e genoma próprio, com possível origem endossimbiótica. Os principais tipos de plastos são os cromoplastos (que possuem pigmentos coloridos, como os carotenoides, xantofilas e antocianinas), os leucoplastos (não possuem pigmentos e armazenam amido, lipídeos e proteínas) e os cloroplastos (possuem clorofila). Os cloroplastos são os principais plastídeos da célula e apresentam pigmentos denominados clorofilas, responsáveis pela absorção de luz e realização da fotossíntese.



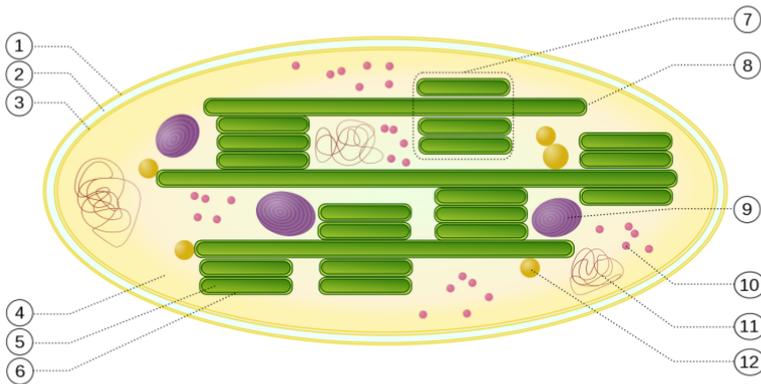
Os cromoplastos que possuem xantofilas e erifofilas, que resultam respectivamente na coloração amarela e vermelha de certos órgãos, possuem função direta na reprodução das plantas superiores. Por quê?

Os cloroplastos são organelas membranosas que possuem diversos pigmentos, principalmente clorofilas, em especial a clorofila a e clorofila b. Por meio dessas organelas, os vegetais são capazes de realizar a fotossíntese, ao utilizar a energia da luz para retirar o carbono do CO_2 atmosférico, incorporando-o em compostos energéticos (glicose) e liberando oxigênio ao final do processo.

A fotossíntese é feita em duas etapas: a primeira chamada de etapa clara ou fotoquímica, que ocorre nos tilacoides do cloroplasto pela absorção da luz para quebra de H_2O e liberação de oxigênio, formação de ATP e de uma coenzima chamada NADPH_2 . Esses produtos serão utilizados na próxima fase, chamada de fase química ou escura, que ocorre independentemente de luz. Nessa segunda fase, a energia da ATP e os hidrogênios da coenzima NADPH_2 serão utilizados para unir moléculas de CO_2 e produzir glicose em uma cadeia de reações chamada Ciclo de Calvin-Benson. A fotossíntese pode ser simplificada em uma reação como:



Figura 2.13 | Partes de um cloroplasto



Legenda: 1-membrana externa; 2-espaco intermembranoso; 3-membrana

interna; 4-estroma; 5-interior do tilacoide; 6-membrana do tilacoide; 7-granum; 8-lamela; 9-amido; 10-ribossomos; 11-DNA; 12-lipídeos.

Fonte: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis#/media/File:Chloroplast.svg>>. Acesso em: 3 out. 2017.

Além dos vacúolos e dos plastídeos, a célula vegetal possui mais uma estrutura característica: a parede celular. Essa estrutura é formada logo após a divisão celular, quando ocorre a síntese de fibrilas de celulose que se entrelaçam e forma a parede primária. Essa parede pode se alongar conforme o crescimento celular e sofrer espessamento e deposição de outras substâncias produzidas pela própria célula ou células adjacentes, como lignina. Externamente à parede primária, ocorre a formação da lamela média, uma camada de pectina que funciona como um cimento de ligação entre células vegetais.



Assimile

Como as plantas dependem da absorção de água para o fluxo de seiva, a parede celular é essencial para manutenção da estrutura da célula, para que não ocorra lise por excesso de água. Nas células animais, como não há parede celular, a célula se rompe em um meio hipotônico.

Em algumas células, após o crescimento celular se interromper, há a produção de uma nova parede celular entre a membrana plasmática e a parede primária. Denominada parede celular secundária, essa estrutura é extremamente rígida e impede o crescimento celular. Sua formação também pode ocorrer pelo espessamento da parede primária, mas é incomum.

A composição das paredes primária e secundária é distinta. A parede primária possui cerca de 70% de água, celulose, hemicelulose, lignina e pectinas. A parede secundária é formada por 20% de água, celulose, hemicelulose e lignina, e geralmente é encontrada em células vegetais mortas.

Ao formarem os tecidos, as células vegetais não permanecem isoladas, mas comunicadas entre si por canais de 20 a 40 nm de diâmetro, chamados plasmodesmos. Essas estruturas permitem o transporte de diversas substâncias entre as células, denominado transporte simplástico. Por esta via podem ser transportados produtos metabólicos, como também de herbicidas, fungicidas, proteínas e genomas de vírus invasores da planta etc.



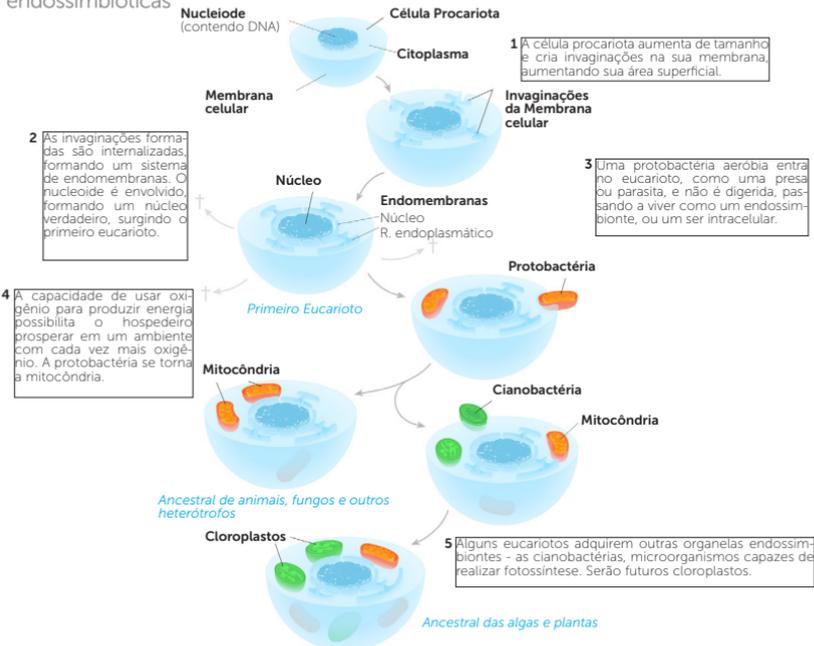
Exemplificando

Apesar dos plasmodesmos servirem para facilitar a comunicação entre células, também pode ser porta de disseminação para doenças virais, como o mosaico do fumo, entre outras.

Sendo assim, podemos resumir as diferenças entre a célula vegetal em relação à animal por possuir estruturas como: (1) vacúolos grandes e numerosos; (2) plastídeos, como cloroplastos e cromoplastos; (3) parede celular celulósica; (4) presença de amido como reserva; (5) presença de plasmodesmos.

Comparando com a estrutura de uma célula procariótica, as células eucarióticas apresentam uma variedade muito maior de estruturas e organelas, que surgiram aos poucos na linha evolutiva celular. Vamos lembrar algumas das principais mudanças e como uma célula simples e sem núcleo passou para células com especializações e organelas com funções altamente definidas? Acompanhe a figura a seguir:

Figura 2.14 | Evolução das células procariotas e surgimento das organelas endossimbióticas



Fonte: adaptado e traduzido de <https://pt.wikibooks.org/wiki/Introdução_à_Biologia/Célula/Célula_Procariote_e_Célula_Eucariote#/media/File:Serial_endosymbiosis.svg>. Acesso em: 3 out. 2017.

Outros seres eucariontes

Além de animais e vegetais, existem células eucariontes em outros dois reinos. No Reino Fungi, as células também possuem organelas da célula animal (REL, REG, Golgi, mitocôndrias etc.) e apresentam glicogênio como fonte de reserva de carboidratos. Caracteriza-se pela presença de parede celular constituída principalmente de quitina, um polissacarídeo comumente encontrado no reino animal, como em carapaças de artrópodes. As células fúngicas formam filamentos, chamados de hifas, que, em conjunto, formam os micélios.

No Reino Protista, os protozoários apresentam uma única célula, que realiza diversas funções. Não há presença de parede celular e existem estruturas para locomoção, como cílios, flagelos ou pseudópodes. Já as algas possuem parede celular (constituída de celulose, alginato, pectina, sílica etc.), e podem ser unicelulares ou formar talos, sem tecidos ou órgãos. Caracterizam-se por terem pigmentos fotossintetizantes, como a clorofila "a" e "c", portanto, são autotróficas.

Aprofunde-se no assunto para conhecer melhor as células eucariotas, em especial os grupos de importância em sua área de estudo. Existe uma diversidade muito grande de patógenos causados, também, por eucariotos. Por agora, aplicaremos nossos conhecimentos para solucionar nossa situação apresentada nesta seção. Vamos testar o que você aprendeu até aqui. Bons estudos!



Pesquise mais

Conheça a página da Khan Academy destinada à citologia. Navegue pelos itens e relembre as diferenças das células eucarióticas e procarióticas.

KHAN ACADEMY. Introdução às células eucariontes. Disponível em: <<https://pt.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/prokaryotic-and-eukaryotic-cells/a/intro-to-eukaryotic-cells>>. Acesso em: 20 out. 2017.

Sem medo de errar

Em seu trabalho, você recebeu amostras de um produtor de limão residente em uma cidade próxima ao laboratório. São folhas de limoeiro escurecidas, com uma camada fina e pegajosa, de

coloração negra, assemelhando-se às queimaduras. Ao triturar as folhas e observar a amostra em microscópio, são observados dois padrões de células: o primeiro padrão possui células nucleadas, parede celular com presença de quitina, um polissacarídeo comum em exoesqueleto de artrópodes, além das células formarem tecidos filamentosos; já o segundo padrão apresenta células nucleadas, com presença de parede celular de celulose, organelas esverdeadas e grandes vacúolos.

De que tipos de células estamos tratando nesta amostra? Quais organismos estão presentes no primeiro e no segundo padrão, respectivamente?

Prepare uma tabela com as diferenças entre o primeiro e segundo padrão, juntamente com outras características desses tipos de células, concluindo qual a classificação de cada um por reino.

Identificando os padrões, você notará na amostra 1 estruturas peculiares de células fúngicas, como a parede celular de quitina e a formação de filamentos (hifas). Esse padrão pertence ao patógeno que está atacando a planta, pertencente ao Reino Fungi.

Na amostra 2, existem estruturas típicas de células vegetais, como a presença de plastos verdes (cloroplastos), parede celular de celulose e grandes vacúolos celulares. Este padrão pertence ao limoeiro, presente no Reino Plantae.

Preparando uma pequena tabela, podemos destacar as diferenças e semelhanças entre ambos:

| | Amostra 1 (Reino Fungi) | Amostra 2 (Reino Plantae) |
|---------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Núcleo | Sim | Sim |
| Parede celular | Sim (quitina) | Sim (celulose) |
| Reserva energética | Glicogênio | Amido |
| Cloroplastos | Não | Sim |
| Mitocôndrias | Sim | Sim |
| Ribossomos | Sim | Sim |
| Membrana plasmática | Sim | Sim |
| Ribossomos | Sim | Sim |

Sinta-se livre para detalhar mais o resultado de acordo com seus conhecimentos. Entregue seu relatório final da análise, que será encaminhado ao produtor, que poderá aplicar um fungicida em sua plantação.

Avançando na prática

Reinados diferentes

Descrição da situação-problema

Você consegue diferenciar células eucariotas animais e vegetais? Para identificar uma amostra qualquer em seu laboratório, é necessário seguir um protocolo e conhecer as organelas e estruturas presentes em cada uma auxiliará seu trabalho.

Para finalizar sua tarefa com sucesso, complete as lacunas da tabela a seguir, citando se as estruturas estão ausentes ou presentes em cada tipo de célula eucariota. Se houver alguma diferenciação ou peculiaridade da estrutura entre uma célula e outra, inclua esta diferença.

| | Célula Vegetal | Célula Animal |
|-------------------------|----------------|---------------|
| Membrana plasmática | | |
| Carioteca | | |
| Parede celular | | |
| Vacúolos | | |
| Golgi | | |
| Cloroplastos | | |
| Grânulos de amido | | |
| Peroxisomos | | |
| Mitocôndrias | | |
| Grânulos de glicogênio | | |
| Retículo endoplasmático | | |
| Lisossomos | | |
| Centríolos | | |

Resolução da situação-problema

Completando corretamente as lacunas, temos:

| | Célula Vegetal | Célula Animal |
|-------------------------|---|----------------------|
| Membrana plasmática | Presente | Presente |
| Carioteca | Presente | Presente |
| Parede celular | Presente | Ausente |
| Vacúolos | Presentes (grandes) | Presentes (pequenos) |
| Golgi | Presente | Presente |
| Cloroplastos | Presentes | Ausente |
| Grânulos de amido | Presentes | Ausentes |
| Peroxisomos | Presentes | Ausentes |
| Mitocôndrias | Presentes | Presentes |
| Grânulos de glicogênio | Ausentes | Presentes |
| Reticulo endoplasmático | Presente | Presente |
| Lisossomos | Presentes | Presente |
| Centríolos | Ausente (exceto briófitas e pteridófitas) | Presente |

Faça valer a pena

1. As células procariontes estão presentes em maior número na Terra, quando comparamos com a quantidade de organismos eucariontes. Esses dois tipos básicos de célula apresentam sucesso evolutivo, estando presentes em uma ampla gama de habitats pelo planeta, e muitas vezes sobrevivendo graças às relações intrínsecas entre organismos procariontes e eucariontes.

Podemos diferenciar uma célula animal de um ser procarionte, já que esses eucariontes possuem estruturas como:

- a) Ribossomos.
- b) Carioteca.
- c) Cloroplastos.
- d) Membrana plasmática.
- e) Citoplasma.

2. A preocupação com o aumento do dióxido de carbono na atmosfera envolve questões sociais, econômicas e ambientais. Novas metas de redução da poluição são discutidas a cada conferência dos diversos países que assinam acordos para redução das emissões. Uma das estratégias é o sequestro de carbono, realizado por organismos autotróficos que utilizam o CO₂ como fonte para síntese de carboidratos.

Marque a alternativa que apresenta a organela celular que está diretamente envolvida no sequestro de carbono, ocorrendo o metabolismo dessa substância em seu interior:

- a) Membrana plasmática.
- b) Ribossomo.
- c) Mitocôndria.
- d) Cloroplasto.
- e) Plasmodesmos.

3. Relacione as organelas e estruturas presentes em células eucariotas (Coluna A) com sua função (Coluna B):

Coluna A

- I. Mitocôndria.
- II. Plasmodesmos.
- III. Cloroplastos.
- IV. Centríolos.
- V. Carioteca.

Coluna B

- A. Possui pigmentos de absorção de luz solar.
- B. Aumenta a eficiência de produção de ATP.
- C. Participa na formação do flagelo de células animais.
- D. Envolve e protege o material genético.
- E. É envolvido com o transporte simplástico.

Assinale a alternativa que relaciona corretamente as duas colunas:

- a) I-A; II-B; III-C. IV-D; V-E.
- b) I-D; II-B; III-C; IV-A; V-E.
- c) I-C; II-A; III-D; IV-E; V-B.
- d) I-B; II-A; III-D; IV-E; V-C.
- e) I-C; II-A; III-E; IV-D; V-B.

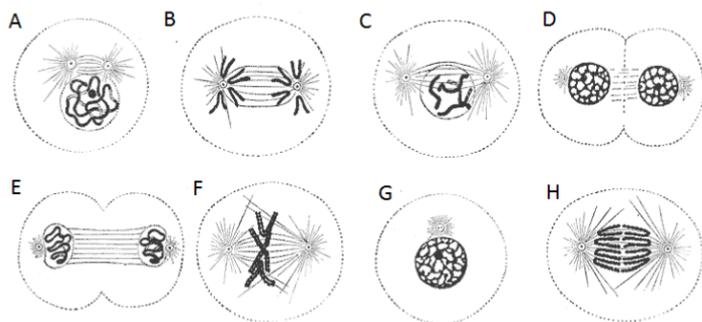
Seção 2.3

Ciclo e diferenciação celular

Diálogo aberto

O trabalho no instituto de pesquisa continua e hoje você recebe um pedido de ajuda de uma área correlata à biologia celular e molecular. O departamento de fertilização in vitro de bovinos, que trabalha com o desenvolvimento de animais de alta produção, na mesma unidade de seu laboratório, deseja auxílio em uma análise embrionária. Por um erro em um lote de zigotos, a célula obtida a partir da fecundação perdeu sua identificação e os pesquisadores estão em dúvidas sobre a fase de desenvolvimento de cada zigoto. Ao analisar os 8 lotes de zigotos, as amostras apresentaram os seguintes padrões em seu ciclo celular:

Figura 2.15 | Diferentes fases da multiplicação de zigotos bovinos



Fonte: adaptada de: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Mitose#/media/File:Gray2.png>>. Acesso em: 23 out. 2017.

Que tipo de divisão celular estamos observando? Você saberia identificar em qual fase de desenvolvimento estão cada um dos embriões de A a H? Qual embrião se apresenta mais adiantado em sua fase de desenvolvimento?

Faça um relatório sobre os padrões observados, identificando-os e respondendo aos questionamentos levantados.

Não pode faltar

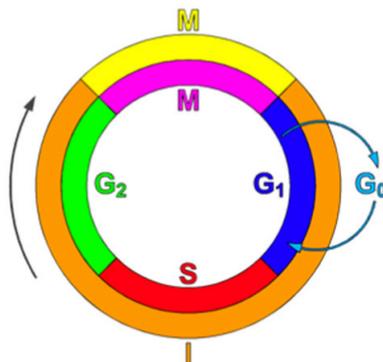
Em nossa caminhada para entendermos o universo intracelular, abordaremos um pouco mais sobre a vida de uma célula e suas funções. As células eucariotas possuem diversas fases em seu ciclo de vida, o que chamamos de ciclo celular. Quando ela não está em nenhum processo de divisão, dizemos que está no período de interfase. Esse período pode ser dividido em 3 fases distintas: G₁, S e G₂.

- **Fase G₁ ou Gap 1:** a célula se encontra em intensa atividade celular, realizando suas funções básicas, como síntese de proteínas ou lipídeos, respiração celular, geração de energia, produção de RNA, entre outras funções que dependerão da especialização da célula. Na fase G₀ a célula permanece indefinidamente na interfase, como neurônios e hemácias.

- **Fase S:** na fase S ou fase de síntese, a célula se prepara para realizar a divisão celular (mitose ou meiose) e ocorrerá a duplicação de DNA na cromatina.

- **Fase G₂ ou Gap 2:** ocorrem os preparativos finais para a divisão celular. Há intensa produção de ATP, formação de novas organelas e duplicação dos centrômeros.

Figura 2.16 | Ciclo celular, com as três fases da interfase (G₁, S e G₂) e o período de divisão (M)



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/22/Cell_Cycle_2.png>. Acesso em: 23 out. 2017.

As fases do ciclo celular são reguladas por fatores como as ciclinas, que são proteínas relacionadas à sinalização celular (divididas em ciclinas G1, G1/S, S e M). As ciclinas desencadeiam eventos, ativando um complexo de enzimas chamadas CDKs (quinases dependentes de ciclinas), ativando-as e controlando as diversas fases dos ciclos celulares. Fatores de crescimento aumentam a atividade das CDKs e ciclinas, enquanto danos na célula ou DNA reduzem ou bloqueiam suas atividades.

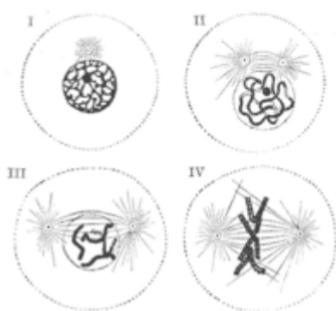
Após a célula se preparar na fase G2, poderá iniciar os processos de divisão. Existem dois tipos básicos de divisão celular nas células eucariotas: a mitose e a meiose. A mitose é uma divisão celular, na qual a célula eucariótica sofrerá uma divisão equacional, mantendo o mesmo número de cromossomos da célula-mãe. A meiose é uma divisão reducional, em que as células formadas possuirão metade do número de cromossomos no processo final.

Mitose: produzindo novas células somáticas

A mitose é um processo de formação de células com número cromossômico idêntico ao da célula-mãe, como na espécie humana, em que células possuem 23 pares de cromossomos. Essas células são chamadas de somáticas ou diploides ($2n$) e, após a mitose, originam duas células com o mesmo número de cromossomos. O processo de mitose é utilizado no crescimento de um indivíduo (como de um embrião até um ser adulto) e também na renovação ou reparação celular de tecidos ou órgãos (pele, cabelo, pelos, ossos etc.).

A mitose possui fases distintas de acordo com o que ocorre no meio intracelular, como mostra a figura.

Figura 2.17 | As fases da mitose

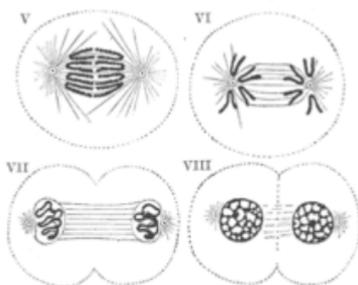


I - G2 da interfase: ocorre a duplicação do material genético e a formação do centrôssomo (com pares de centriolos). O nucléolo ainda está visível.

II - Prófase: cromossomos se condensam e se preparam para se organizar em cromátides irmãs. Os centriolos começam a migrar para os polos da célula e começam a organizar as fibras do fuso, que irão guiar os cromossomos.

III - Prófase: os cromossomos duplicados se organizam em cromátides irmãs, e o fuso mitótico começa a se formar dos centrôssomos, região em torno dos centriolos.

IV - Prometáfase: a carioteca se desfaz para que as fibras do fuso possam atingir os cromossomos. O fuso irá se conectar aos centrômeros dos cromossomos, que continuam se condensando ou espiralizando.



V - Metáfase: os cromossomos atingem o máximo da espiralização ou condensação, sendo facilmente observados ao microscópio óptico. Forma-se a placa equatorial cromossômica (ficam no meio da célula), e os centríolos estão nos polos da célula.

VI - Anáfase: ocorre a separação das cromátides-irmãs (cópias dos cromossomos) pelo fuso mitótico, puxando para os respectivos polos. Os centríolos são duplicados e formam novos cromossomos.

VII - Telófase: os cromossomos começam a desespiralizar (descondensar) e a carioteca e o nucléolo são refeitos.

VIII - Telófase (Citocinese): a célula inicia sua divisão do citoplasma, formando duas novas células com o mesmo número de cromossomos da célula-mãe.

Fonte: <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5e/Gray2.png/220px-Gray2.png>>. Acesso em 06 dez. 2017.

Na primeira etapa ocorre a formação das cromátides-irmãs, que são cópias cromossômicas a serem destinadas a cada célula-filha. Os mecanismos e detalhes sobre a duplicação do DNA serão detalhados em nossa próxima unidade. Os centríolos duplicados organizam em seu entorno fibras proteicas (fuso) que organizarão os cromossomos. Nas células vegetais superiores (gimnospermas e angiospermas) não há centríolos, mas o fuso mitótico é formado da mesma maneira no citoplasma, sustentados e direcionados pela proteína f-actina.

Nas etapas seguintes, as fibras do fuso se ligam aos centrômeros duplicados e separam as cromátides irmãs. Após a citocinese, formam-se duas novas células diploides, com a carga genética cromossômica idêntica à célula-mãe.

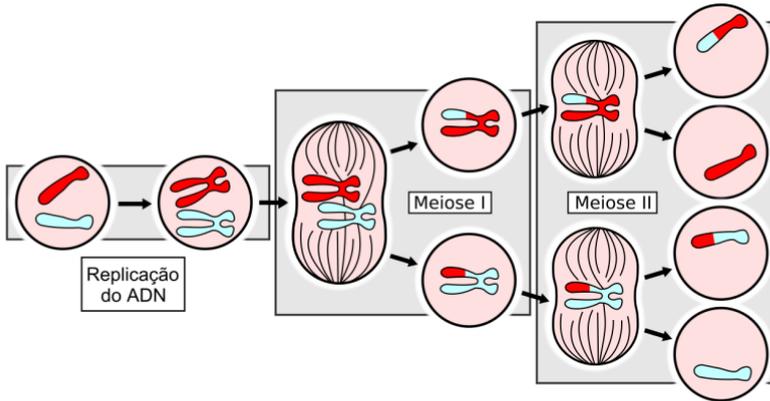
A Meiose: produzindo células haploides

Se você possui irmãos ou já reparou nos indivíduos de uma família, deve ter notado que, muitas vezes, existem indivíduos com diferenças significativas quanto a detalhes no fenótipo, como cor de cabelo, olhos e pele. Além disso, existem diferenças que não são perceptíveis, como tipo sanguíneo, metabolismo, produção de enzimas etc. De onde vem essa variabilidade? Essa característica dos seres eucariotos está justamente ligada à produção de suas células germinativas, também chamadas de gametas. Essas células têm metade da carga genética de uma célula diploide, ou seja, apenas um par cromossômico, sendo denominadas células haploides (n).

As células haploides são obtidas a partir de uma divisão reducional, chamada de meiose. Tal divisão é dividida em duas partes: a

meiose I (reducional, pois reduz a quantidade de cromossomos) e meiose II (equacional, pois mantém a quantidade já reduzida de cromossomos).

Figura 2.18 | Etapas resumidas da meiose



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Meiose#/media/File:MajorEventsInMeiosis_variant_pt.svg>. Acesso em: 23 out. 2017.

Detalharemos cada processo ocorrido nas duas fases da meiose I e II:

- **Prófase I:** é a fase mais longa da meiose I e se divide em cinco subfases:
 - Leptóteno: há o início da espiralização cromossômica e a formação das cromátides irmãs.
 - Zigóteno: há o início do pareamento dos cromossomos homólogos, formando o complexo sinaptonêmico ou sinapse.
 - Paquíteno: os cromossomos já bem condensados se pareiam e as duas cromátides de cada homólogo são facilmente visíveis, formando as tétrades. Nesse pareamento cromossômico, criam-se regiões de contato chamadas quiasmas, onde ocorrem trocas genéticas denominadas *crossing-over*. Esse processo possibilita a variabilidade genética na reprodução sexuada.
 - Diplóteno: ocorre o início do afastamento dos cromossomos homólogos, ficando evidente as regiões de quiasma.

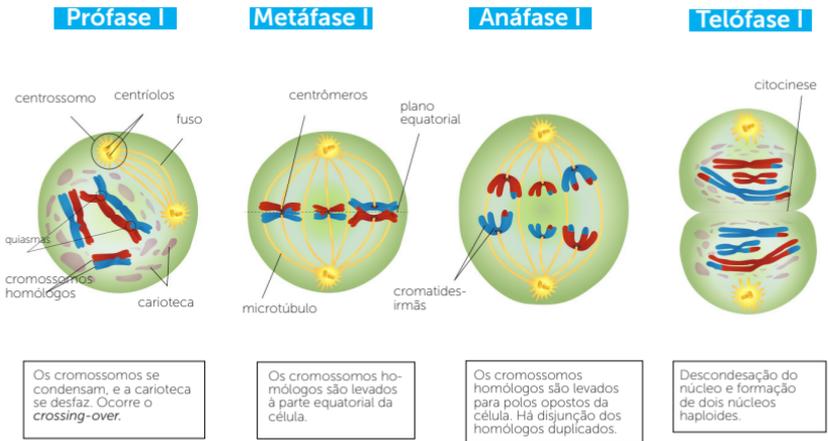
- **Diacinese:** ocorre o afastamento das cromátides e os quiasmas se dirigem às extremidades. A condensação aumenta.

- **Metáfase I:** os cromossomos atingem o máximo da condensação e são levados ao plano ou placa equatorial. Os centrossomos estão ligados ao cinetócoro (região proteica do centrômero) e o pareamento irá preparar a divisão reducional dos cromossomos.

- **Anáfase I:** os cromossomos homólogos pareados no plano equatorial serão puxados aos polos, reduzindo seu número pela metade em cada polo.

- **Telófase I:** a carioteca e o nucléolo voltam a aparecer. Os centríolos são divididos para cada nova célula, ocorrendo a citocinese com a fragmentação do citoplasma.

Figura 2.19 | Etapas da meiose I



Fonte: adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis#/media/File:Meiosis_Stages.svg>. Acesso em: 23 out. 2017.



Refleta

O processo de *crossing-over*, ocorrido no paquíteno da prófase I, gera variabilidade genética. Qual seria o papel desse processo na evolução dos organismos eucariotos?

Após a meiose I, ocorre um intervalo na divisão chamado de intercinese. Na meiose II, as duas células formadas anteriormente passarão pelos seguintes processos:

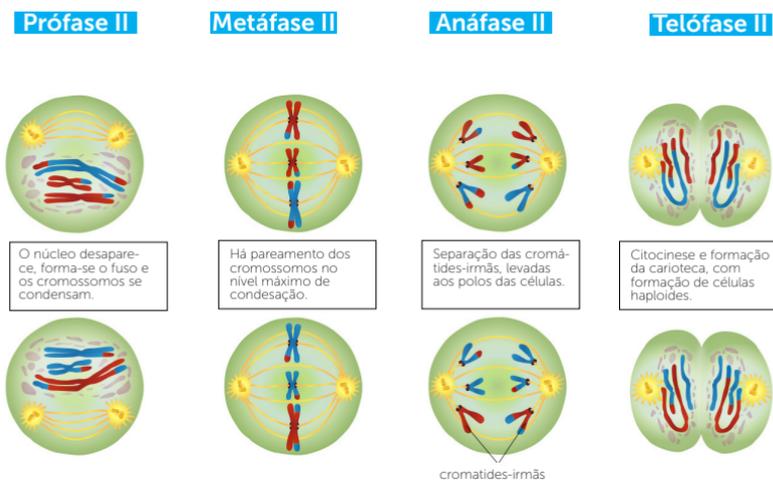
- **Prófase II:** há novamente a condensação cromossômica a carioteca e o nucléolo desaparecerão e haverá a formação das fibras do fuso.

- **Metáfase II:** os cromossomos atingirão o máximo de sua condensação e serão levados ao plano equatorial (desta vez não estarão em pares).

- **Anáfase II:** haverá a separação das cromátides irmãs, que agora formarão cromossomos independentes. Cada cromátide será levada à polos opostos da célula.

- **Telófase II:** ocorrerá a citocinese, o reaparecimento da carioteca e nucléolo, e a formação de quatro células haploides, contendo somente um par de cada cromossomo da célula-mãe do início da divisão.

Figura 2.20 | Etapas da meiose II



Fonte: adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis#/media/File:Meiosis_Stages.svg>. Acesso em: 23 out. 2017.



Erros na anáfase II, durante a separação das cromátides irmãs, podem gerar gametas com mutações, contendo um número adicional de cromossomos, trazendo consequências na formação de um novo indivíduo, como a Síndrome de Down (Trissomia do cromossomo 21).

Relembrando os conteúdos sobre divisão celular, podemos observar as diferenças entre os dois processos no quadro a seguir:

Quadro 2.2 | Diferenças entre mitose e meiose

| | Mitose | Meiose |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Células produzidas | 2 células diploides | 4 células haploides |
| Crossing-over e quiasmas | não ocorre | sim (meiose I) |
| Duplicação de centriolos | ocorre na G2 da interfase | ocorre na meiose II |
| Separação de homólogos | não ocorre | ocorre na meiose I |
| Citocinese | ocorre uma vez | ocorre duas vezes |
| Complexo sinaptonêmico | não ocorre | ocorre na meiose I |
| Cromossomos pareados | não ocorre | ocorre na meiose I |
| Variabilidade nas cromátides-irmãs | não ocorre | ocorre (meiose II) |

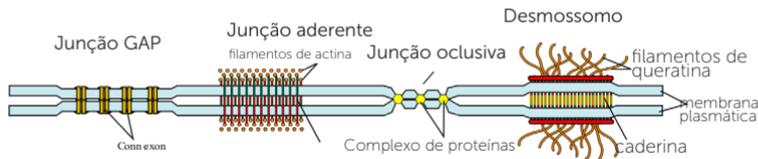
Fonte: elaborado pelo autor.

A partir das divisões celulares como a mitose, as células formarão tecidos nos organismos pluricelulares. Mas, após formadas, como essas células se mantêm unidas e se comunicam? São através das junções celulares, especializações da membrana plasmática. Existem três tipos principais de junções: as de ancoragem, comunicantes e as bloqueadoras.

As **junções de ancoragem ou ancoraduras** conectam-se de forma mecânica às células adjacentes e à matriz extracelular por meio do citoesqueleto. Exemplos dessas junções são: os desmossomos (formados por caderinas e filamentos intermediários), os hemidesmossomos (que ligam células epiteliais à lâmina basal, por meio de associação de colágeno, filamentos intermediários de queratina e integrinas) e as junções aderentes (constituídas por caderinas ligadas a filamentos de actina e outras proteínas). As **junções comunicantes** permitem passagem de sinais químicos e elétricos

entre as células, como as junções gap ou fenda, formadas por proteínas transmembrana, que atravessam a membrana plasmática das células, formando comunicações. As junções **bloqueadoras ou compactas** aderem firmemente às células adjacentes e impedem a passagem de substâncias. Um exemplo são as junções oclusivas ou de oclusão, constituídas a partir das proteínas ocludinas e claudinas. Essas junções estão presentes nas células epiteliais. Exemplos das junções estão na imagem a seguir.

Figura 2.21 | Exemplos de junções celulares



Fonte: adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_junction#/media/File:Cell_junction_simplified_en.svg>. Acesso em: 24 out. 2017.

Além de firmemente unidas, você deve ter notado que no interior das células há muito movimento. Nas células, quem cumpre essa função são estruturas que formam o citoesqueleto. Há tempos atrás, acreditava-se que o citoesqueleto tinha função somente na sustentação da célula. Contudo, novos estudos mostraram outras funções, como a movimentação e dinâmica de organelas, além de manter e modificar a forma da célula.

E do que é constituído o citoesqueleto? Ele é formado de três estruturas principais: os microtúbulos, os filamentos de actina e os filamentos intermediários. Essas estruturas agem basicamente a partir de processos de polimerização (acrescentando monômeros e aumentando de tamanho) e despolimerização (retirando monômeros e reduzindo seu tamanho).

Os **microtúbulos** são estruturas polimerizadas a partir de um centrosomo no citoplasma com aproximadamente 24 nm de diâmetro, formadas pelos monômeros proteicos de tubulina e almetralopina. Podem criar substratos nos quais proteínas motoras, as dineínas e cinesinas, transportam moléculas em sentidos opostos pela célula. Os microtúbulos também fazem parte dos flagelos, cílios e o fuso mitótico e formam os centríolos com uma estrutura de 9 trincas.

Os **filamentos de actina** são compostos de monômeros da proteína actina, com diâmetros de 5 a 6 nm. São de natureza fibrosa e helicoidal, relacionados a movimentos como o de contração muscular nos sarcômeros das fibras musculares, ou formação de pseudópodes em células, como os macrófagos.

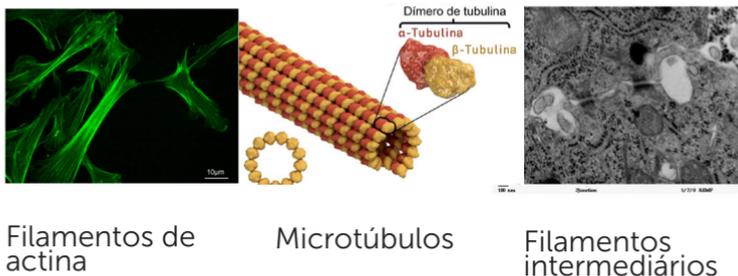
Os **filamentos intermediários** possuem diâmetro de 7 a 11 nm e se encontram entre os microtúbulos e os filamentos de actina. Não atuam diretamente na movimentação, mas, sim, na manutenção da estrutura da célula. São compostos de monômeros de subunidades fibrosas que unidas formam os filamentos.



Assimile

O citoesqueleto dá diferentes formas às células, como os enterócitos, células do intestino que possuem microvilosidades para aumentar a superfície de absorção no tubo digestório.

Figura 2.22 | Componentes do citoesqueleto



Filamentos de actina

Microtúbulos

Filamentos intermediários

Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Microfilament#/media/File:MEF_microfilaments.jpg>, <goo.gl/SJJVL9> e <https://pt.wikipedia.org/wiki/Filamento_interm%C3%A9dio#/media/File:Two_desmosomes_-_TEM.jpg>. Acesso em: 23 out. 2017.

Compreender o ciclo celular e os tipos de divisão celular serão essenciais para seus estudos nesta e em outras disciplinas em seu curso. Aprofunde mais os conhecimentos na área para compreender processos de formação de gametas em animais e vegetais. Em nossas seções futuras, aprofundaremos na biologia molecular e você entenderá como ocorrem os processos de divisão do material genético e do funcionamento e produção de moléculas da célula. Vamos utilizar os conhecimentos adquiridos até aqui. Bons estudos!

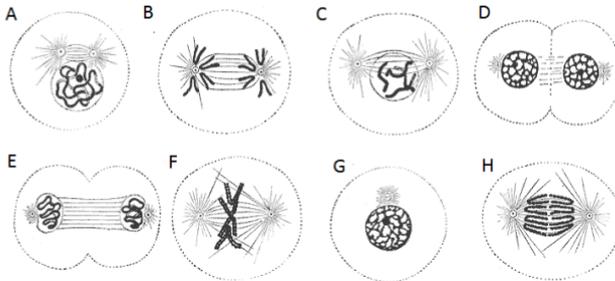
Conheça a formação dos óvulos, formados a partir de um processo chamado ovulogênese. Diferentemente dos espermatozoides, não são todas as células haploides que originam os gametas femininos.

BRASIL ESCOLA. **Ovulogênese**. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/ovulogenese.htm>>. Acesso em: 23 out. 2017.

Sem medo de errar

Relembrando nossa situação, você possui diversos embriões em desenvolvimento e pode ajudar o departamento de fertilização de bovinos a selecionar o embrião mais desenvolvido, além de identificar as fases da divisão celular em cada amostra.

Figura 2.23 | Diferentes fases da multiplicação de zigotos bovinos



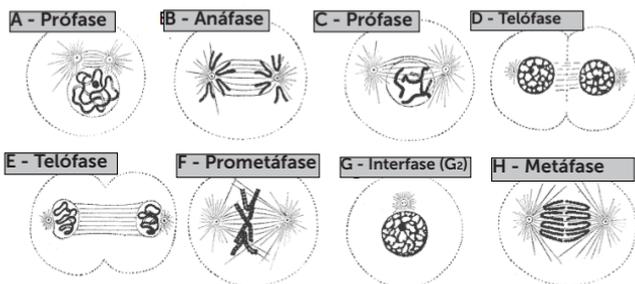
Fonte: adaptada de: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Mitose#/media/File:Gray2.png>>. Acesso em: 23 out. 2017.

Que tipo de divisão celular estamos observando? Você saberia identificar em qual fase de desenvolvimento estão cada um dos embriões de A a H? Qual embrião se apresenta mais adiantado em sua fase de desenvolvimento?

De acordo com as características das estruturas durante divisão celular e os padrões de posição dos cromossomos, é possível identificar cada parte da divisão celular. Trata-se de uma divisão mitótica, já que não há redução do número de cromossomos nas células finais, e, também, embrionária, portanto, duplicações da célula-mãe.

Identificando as fases, temos:

Figura 2.24 | Identificação das diferentes fases da multiplicação de zigotos bovinos



Fonte: Imagem adaptada de: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Mitose#/media/File:Gray2.png>>. Acesso em: 23 out. 2017.

A. Prófase: os centríolos foram duplicados, a carioteca ainda é visível, mas começa a se desfazer e os cromossomos começam a se condensar. O fuso começa a se formar.

B. Anáfase: é visível a separação das cromátides-irmãs para os polos da célula, por meio do fuso mitótico.

C. A carioteca ainda está se desfazendo e os cromossomos estão se condensando. O fuso começa a se desenvolver.

D. Telófase (final): está ocorrendo a diacinese e o núcleo volta a aparecer, pronto para formar duas células diploides.

E. Telófase (início): a carioteca começa a se reconstituir e a divisão celular (diacinese) se inicia.

F. Prometáfase: os cromossomos estão bem condensados, a carioteca se desfez e o fuso mitótico atinge os cromossomos, que estão dispostos no equador da célula.

G. Interfase (fase G₂): o núcleo está formado e os centríolos são duplicados para se iniciar a divisão celular.

H. Metáfase: os cromossomos estão no ápice da condensação e posicionados no polo da célula, prontos para serem levados aos polos.

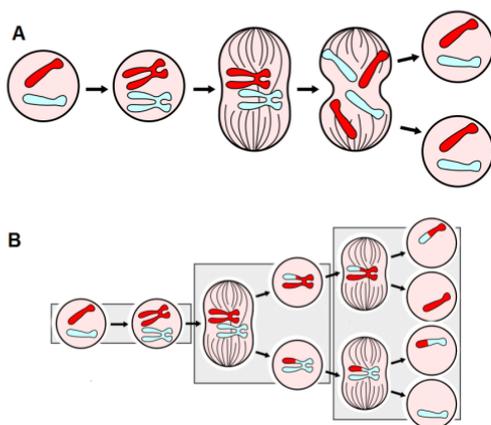
De todos os embriões observados, o que apresenta maior desenvolvimento é o da amostra D, que já está formando duas células e está no final da telófase. Agora que você reconheceu os padrões celulares, faça um relatório identificando-os e respondendo aos questionamentos levantados.

Dividido em detalhes

Descrição da situação-problema

Muitas vezes você deve diferenciar processos celulares por alguns detalhes no microscópio ou em esquemas. Ao ler um trabalho científico para realizar um levantamento bibliográfico, você encontra essas duas imagens do processo de divisão celular de um organismo, sem muitos detalhes e explicações.

Figura 2.25| Células sofrendo distintos processos de divisão



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Mitosis#/media/File:Major_events_in_mitosis.svg>; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Meiose#/media/File:MajorEventsInMeiosis_variant_pt.svg>. Acesso em: 26 out. 2017.

Apenas observando os esquemas A e B, você consegue responder:

- Quais os processos de divisão nos esquemas?
- Quais as principais diferenças entre o processo A e B?
- Qual dos dois processos favoreceu a evolução e a seleção natural dos seres vivos?

Resolução da situação-problema

Os processos de divisão apresentados são, respectivamente, mitose e meiose, claramente observados pelo número de células ao

final da divisão (duas na mitose e quatro na meiose) e pelo número de cromossomos das células-filhas (diploides na mitose e haploides na meiose).

As principais diferenças é que a mitose, além de originar duas células diploides, não tem *crossing-over* (quiasmas nos cromossomos); a citocinese só ocorre uma vez; não há separação de homólogos; não há complexo sinaptonêmico e nem mesmo variabilidade genética nas células-filhas. Já na meiose, existe formação de quatro células haploides. Ocorre *crossing-over*, a citocinese ocorre duas vezes; há separação de cromossomos homólogos e pareamento no complexo sinaptonêmico; e ocorre variabilidade genética das células-filhas.

A importância da meiose para a evolução das espécies é indiscutível, já que possibilitou a formação de novas características dos indivíduos da prole, por esse processo gerar variabilidade genética. Dois indivíduos parentais possuem gametas que podem sofrer quiasmas, gerando novas características em seus filhos.

Faça valer a pena

1. Os centríolos são organelas relacionadas à organização do centrossomo durante as divisões celulares, que, por meio do fuso mitótico, organiza e orienta os cromossomos nas fases da mitose e meiose. Estas estruturas são presentes nos animais e ausentes nos vegetais superiores (angiospermas e gimnospermas).

Os centríolos são formados por estruturas envolvidas diretamente com os movimentos celulares e a formação de flagelos nos animais, pois são compostos de:

- a) Ribossomos.
- b) Filamentos de actina.
- c) Microtúbulos.
- d) Mitocôndrias e proteínas.
- e) Filamentos intermediários.

2. O ciclo celular dos animais é muito variável em tempo e regulação. Algumas proteínas, como as ciclinas, sinalizam os momentos em que a célula deixará de realizar suas funções fisiológicas regulares para dar início aos processos de divisão: a mitose e a meiose. Ambos são processos realizados pelos eucariontes, que dão origem a novas células com características distintas ou não da célula-mãe.

A meiose é um processo de divisão celular eucarionte que pode ser responsável pela produção de:

- a) Células epiteliais.
- b) Espermatozoides.
- c) Células embrionárias.
- d) Neurônios.
- e) Enterócitos.

3. A mitose e a meiose são os dois tipos de divisão celular que ocorrem nas células eucariotas. Analise as características desses processos de divisão celular:

- I. Separação de cromátides-irmãs.
- II. Formação de quiasmas.
- III. Formação do fuso mitótico.
- IV. Complexo sinaptonêmico.
- V. Formação de células haploides.

São processos que ocorrem apenas na divisão meiótica os itens apresentados em:

- a) I, II e V.
- b) II, IV e V.
- c) II, III e IV.
- d) II, IV e V.
- e) III, IV e V.

Referências

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro:

Guanabara Koogan, 2012.

KHAN ACADEMY. **Antigo e Estranho**: Archaea, Bactérias e Protistas | Biologia | Khan Academy. 2017. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=_yTpMMW2UzQ>. Acesso em: 24 out. 2017.

SCHOPF, J. W. Fossil evidence of archaean life. **Philosophical transactions of Royal Society**, v. 361, n. 1470, p. 869-885, 2006.

WIKIBOOKS. **Cell Biology/Cell Division/Mitosis**. Disponível em: <https://en.wikibooks.org/wiki/Cell_Biology/Cell_division/Mitosis>. Acesso em: 12 nov. 2017.

Fundamentos da Biologia molecular

Convite ao estudo

Caro aluno,

Chegamos à Unidade 3, e, a partir de agora, iniciaremos os estudos em biologia molecular, seus conceitos, fundamentos e aplicações. Após conhecer as estruturas, organelas e funções das células procariotas e eucariotas na unidade anterior, estudaremos mais a fundo o material genético presente em nossas células.

A vida acadêmica é uma das possibilidades para sua profissão. A vida ligada à pesquisa, ensino e extensão é feita basicamente pelas universidades no Brasil, geralmente com financiamento público. Você irá incorporar um dos docentes do Departamento de Genética e Melhoramento Animal e Vegetal, uma das áreas de maior importância da genética aplicada, principalmente em nossa universidade, com campus voltado para pesquisas no ramo agropecuário.

Para o desenvolvimento das atividades, é necessário conhecer e saber utilizar os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular, bem como a estrutura e fisiologia da célula.

Você provavelmente já conhece termos como DNA, RNA e proteínas. Porém, sabe, de fato, o que são esses conceitos? Como funciona o controle gênico no interior de cada célula de seu corpo e nos outros seres vivos, sejam animais, plantas ou bactérias? Nas primeiras unidades, você adquiriu conhecimento sobre os avanços da citologia, sobre o microscópio e seu

uso, além de conhecer os tipos de célula dos diferentes seres vivos. Nesta Unidade, estudaremos os fundamentos da biologia molecular, aprofundando nosso conhecimento sobre o ambiente intracelular. A Seção 3.1 iniciará nosso processo de aprendizado, abordando os principais conceitos do DNA e RNA. A Seção 3.2 dará continuidade nos estudos, explicando os processos de duplicação, transcrição e tradução do material genético. Para finalizar esta Unidade, a Seção 3.3 trará explicações sobre como os processos tratados nas seções anteriores são regulados e controlados pela célula. Acompanhe-nos nesta Unidade, para estudar de Mendel à genética aplicada e adquirir mais conhecimento na área da genética, que apresenta avanços significativos a cada dia.

Seção 3.1

Estrutura e função do DNA e RNA

Diálogo aberto

Começaremos a compreender o que ocorre no interior do núcleo celular nesta Seção. É de sua competência como docente do Departamento de Genética e Melhoramento Animal e Vegetal orientar pós-graduandos em genética. Você também é o responsável por ministrar a disciplina de genética molecular para a graduação, em que poderá se deparar com diversos questionamentos, dos mais básicos aos mais complexos. É comum, no primeiro dia de aula, estimular o conhecimento dos alunos por meio de discussões e rodas de conversa. Nesse instante inicial, anote os questionamentos dos alunos, como: *Qual a diferença entre cromossomo, gene e genoma? O que significam as siglas DNA e RNA, tão comuns no vocabulário científico? O que é a estrutura da dupla-hélice, e quem a descobriu? O que é o sentido 5'-3'?*

São dúvidas que devem ser esclarecidas em sua segunda aula. Para isso, prepare um plano de aula e responda prontamente a todos esses questionamentos, que deverão ser abordados mais detalhadamente durante o ano letivo.

Não pode faltar

Nas seções anteriores, você observou que nos núcleos das células eucariontes e no nucleóide dos procariotos encontramos uma molécula responsável pelo controle das funções e pelo armazenamento de informações genéticas dos organismos: o DNA (em inglês *deoxyribonucleic acid*), ou ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Como já acompanhamos na Unidade 1, essa molécula foi descoberta em 1869 pelo bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher, ao isolar o material genético de glóbulos brancos de pus, já que essas células apresentam grandes núcleos, fáceis de serem isolados do citoplasma.

O DNA está presente em vírus, células procariotas e eucariotas, coordenando o funcionamento dos seres vivos e armazenando

informações por meio de nucleotídeos, unidades que formam os genes. Os genes possuem informações genéticas utilizadas para construção de RNA e proteínas.

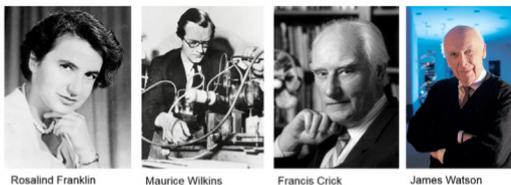
A molécula de DNA composta pela dupla hélice é uma descoberta recente, a partir do trabalho conjunto de alguns pesquisadores. Com os resultados de Rosalind Franklin, que fotografou os padrões de difração de Raios-x na molécula de DNA, foi possível aos três cientistas, Maurice Hugh Frederick Wilkins, James Dewey Watson e Francis Harry Compton Crick se basearem para a elaboração do conhecido modelo de dupla hélice da molécula de DNA. A descoberta foi publicada por Watson e Crick em 1953, na renomada revista *Nature*. O prêmio Nobel de medicina foi entregue somente a Wilkins, Watson e Crick em 1962.



Refleta

Rosalind Franklin é conhecida como a “dama negra do DNA”, e apesar de ter grande importância para a elaboração da estrutura da molécula, seu nome não foi citado no artigo de Watson e Crick. Nos anos 50, o papel da mulher era menosprezado na comunidade científica e universidades. Quantas famosas cientistas você conhece?

Figura 3.1 | Cientistas responsáveis pela descoberta da dupla hélice da molécula de DNA



Fonte: <<https://goo.gl/KQwequ>>; <<https://goo.gl/ptgRTx>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

A estrutura da molécula de DNA é composta por monômeros chamados nucleotídeos, constituídos por três partes distintas: um **fosfato**, ligado a uma **pentose**, ligada a uma **base nitrogenada**. No DNA, a pentose presente é a desoxirribose, que pode estar ligada a uma de quatro bases nitrogenadas: timina (presente somente no DNA), guanina, citosina e adenina (estas três últimas estão presentes tanto no DNA como no RNA).

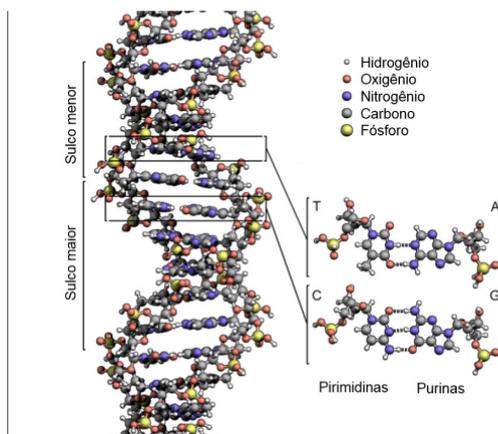
As bases nitrogenadas são divididas em dois tipos: as purinas, que contém mais de um anel (Adenina e Guanina), e as pirimidinas, que contém somente um anel (citosina, timina e uracila, esta última, presente somente no RNA, substituindo a timina).



Assimile

A adenina é um nucleotídeo envolvido em outros processos celulares importantes, como a formação do ATP (Adenosina trifosfato), molécula energética produzida na respiração celular.

Figura 3.2 | Estrutura básica da dupla hélice de DNA



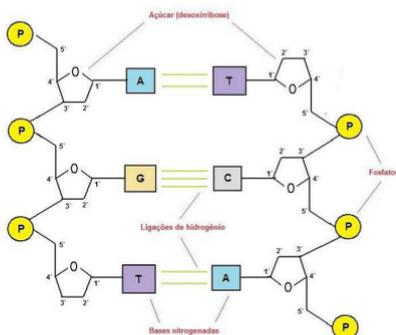
Fonte: adaptada de <https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_NoBB.png>. Acesso em: 2 nov. 2017.

Os nucleotídeos unem-se por ligações fosfodiéster, formando uma fita longa, composta por esses monômeros. A ligação é feita entre o fosfato e os carbonos da pentose no sentido 5'-3', isto é, em uma extremidade da fita, o carbono 5 da pentose estará livre, e na outra extremidade o carbono 3 estará livre também. A enzima responsável por ligar nucleotídeos na fita (durante a duplicação do DNA, por exemplo), irá inserir novos nucleotídeos sempre no sentido 5'-3'.

O DNA é composto por duas fitas, no entanto, a fita complementar sempre se apresenta no sentido invertido, como duas escadas rolantes em que uma irá para cima e outra para baixo. E como as fitas se mantêm unidas? Por meio de ligações de hidrogênio (pontes

de hidrogênio) entre as bases nitrogenadas, que ocorrem sempre entre citosina (C) ligada à guanina (G) ou timina (T) ligada à adenina (A). As bases citosina e guanina se mantêm unidas por três ligações de hidrogênio, e timina e adenina se mantêm unidas por duas ligações de hidrogênio, como mostra a Figura 3.3.

Figura 3.3 | Ligações entre nucleotídeos do DNA e as duas fitas



Fonte: <http://www.museuescola.ibb.unesp.br/images/DNA_32.jpg>. Acesso em: 2 nov. 2017.

Todo o DNA pode ser espiralizado e condensado na forma de cromossomos, facilmente observados durante a fase de metáfase, como analisamos na Unidade 2. *Quantos nucleotídeos temos em nosso DNA?* Para responder a essa questão, a comunidade científica internacional iniciou formalmente, em 1990, o projeto Genoma Humano (PGH), para mapear toda a sequência genética e investigar por quantos pares de bases (pb) era formado nosso DNA, além de auxiliar a compreensão dos mecanismos de funcionamento da expressão dos genes, e tornar os dados disponíveis em bancos de dados. O PGH foi concluído em 2003, com 99% dos genes mapeados e uma precisão de 99,9%.

Na época, concluiu-se que o genoma humano era composto por cerca de 25.000 genes. Contudo, pesquisas mais recentes reduziram para 19.000 o número de genes (EZKURDIA et al. 2014). Inicialmente, esperava-se que a espécie humana obtivesse um maior número de genes e pares de bases, comparada a sua complexidade. Após os estudos, os resultados obtidos não abordaram relação entre o tamanho do genoma (medido em pb) e a complexidade dos organismos, como

é possível observar no quadro 3.1. Uma das possíveis explicações é que nem todo código genético codifica proteínas, e existem áreas em que os nucleotídeos não se expressam, podendo possuir outras funções.

Quadro 3.1 | Tamanho do genoma de organismos

| Organismo sequenciado | Número de pares de base (pb) |
|---|------------------------------|
| Virus Phage Φ -X174 | 5.386 |
| <i>Escherichia coli</i> (bactéria) | 4.600.000 |
| <i>Amoeba dubia</i> (ameba) | 670.000.000.000 |
| <i>Protopterus aethiopicus</i> (peixe) | 130.000.000.000 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> (inseto) | 130.000.000 |
| <i>Apis mellifera</i> (inseto) | 1.770.000.000 |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> (nematóide) | 98.000.000 |
| <i>Homo sapiens</i> (homem) | 3.200.000.000 |
| <i>Populus trichocarpa</i> (angiosperma) | 480.000.000 |
| <i>Fritillaria assyrica</i> (angiosperma) | 130.000.000.000 |
| <i>Physcomitrella patens</i> (musgo) | 480.000.000 |

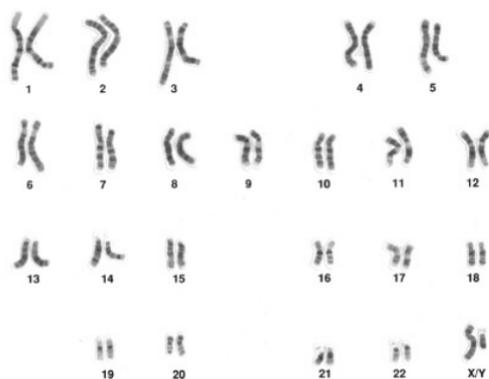
Fonte: adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Tamanho_do_genoma>. Acesso em: 2 nov. 2017.

Qual é a diferença entre uma sequência genética e um gene? Consideramos **gene** uma sequência de aminoácidos que, de fato, codificam proteínas por meio dos processos de transcrição e tradução, que estudaremos detalhadamente na próxima unidade. O local em que encontramos genes na sequência genômica é chamado de *locus* (plural: *loci*). As proteínas produzidas podem possuir diferentes funções, como hormônios, sinais celulares, anticorpos, proteínas estruturais, enzimas, transportadoras e receptoras, entre outras funções.

O ser humano possui genes distribuídos em 23 pares de cromossomos, dos quais os 22 primeiros são autossomos (não

ligados ao sexo) e os dois últimos são alossomos (ligados ao sexo), os cromossomos X e Y. Os machos possuem os cromossomos X e Y, enquanto as fêmeas possuem dois cromossomos X. Cada par dos cromossomos é proveniente de um gameta parental, formando a primeira célula, chamada de zigoto, que irá sofrer sucessivas mitoses até atingir um indivíduo adulto, com cerca de 10^{13} células. Todo o conjunto cromossômico, incluindo seu número e morfologia, é chamado de cariótipo. A análise do formato e da quantidade de cromossomos pode detectar anomalias em um indivíduo. A figura 3.4 mostra um cariótipo de um homem.

Figura 3.4 | Cariótipo de um homem, com os cromossomos X e Y no 23º par



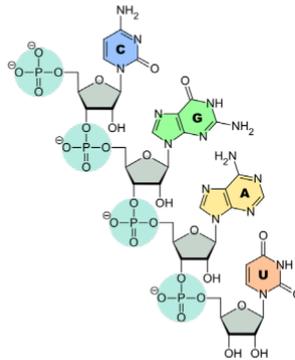
Fonte: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Karyotype#/media/File:PLoSBIol3.5.Fig7ChromosomesAluFish.jpg>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

Devemos lembrar que, nem todo o código genético dos indivíduos está presente no núcleo. Organelas como a mitocôndria e o cloroplasto têm seu próprio código genético, como uma molécula de DNA circular. O genoma mitocondrial humano apresenta 16.569 pb e 37 genes, enquanto os genomas de cloroplastos podem variar entre 120.000 a 170.000 pb em diversas espécies de vegetais. Por outro lado, nem todas as células possuem DNA nuclear, como as hemácias, que por serem anucleadas, não apresentam cromossomos.

O DNA é expresso em outro tipo de material genético, o RNA (*ribonucleic acid*) ou ARN (ácido ribonucleico). O processo de conversão de DNA em RNA é chamado de transcrição, como

compreenderemos na próxima seção. O RNA é uma molécula semelhante ao DNA em sua estrutura, mas possui algumas particularidades como: (1) é formado por apenas uma fita; (2) a uracila (U) substitui a base nitrogenada timina (T) na molécula; (3) a pentose presente no RNA é a ribose; (4) o DNA está presente somente no núcleo, enquanto o RNA é formado no núcleo, mas será enviado para o citoplasma. A estrutura básica de uma molécula de RNA é evidenciada na figura a seguir.

Figura 3.5 | Estrutura de uma molécula de RNA

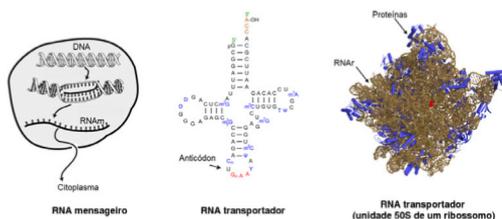


Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_ribonucleico#/media/File:RNA-Nucleobases.svg>. Acesso em: 2 nov. 2017.

Além de ser o único material genético presente em alguns vírus (retrovírus), nos demais seres, o RNA transcrito do DNA pode assumir três funções principais:

- RNA mensageiro (RNAm): é responsável pela transferência da mensagem do DNA ao citoplasma, carregando a sequência de aminoácidos que será convertida em proteínas.
- RNA transportador (RNAt): molécula de menor tamanho molecular, que participa do transporte de aminoácidos para os ribossomos durante a síntese proteica. Existe um RNAt para cada tipo de aminoácido.
- RNA ribossômico (RNAr): molécula que, associada às proteínas, irá constituir as subunidades dos ribossomos, estruturas responsáveis pela síntese proteica.

Figura 3.6 | As diferentes moléculas e funções do RNA



Fonte: <<https://goo.gl/fAfHhP>> ; <https://en.wikipedia.org/wiki/Transfer_RNA> ; <<https://goo.gl/nVn2TM>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

As várias descobertas da genética só foram possíveis com o avanço da tecnologia e de novas ferramentas para estudo. Uma das principais técnicas que envolvem o estudo do DNA é o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). É uma técnica que objetiva produzir uma grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA, a partir de uma pequena amostra. Dessa maneira, facilita, por exemplo, o estudo de uma determinada sequência genética de um organismo, ou a identificação de vírus ou bactérias patogênicas em uma amostra.

Atualmente, existem aparelhos que realizam a PCR, chamados de termocicladores. Um termociclador realiza ciclos de temperatura, repete a reação de síntese de novas fitas de DNA por meio de uma enzima termoestável, a *Taq Polimerase* (isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, que habita fontes hidrotermais), e com o uso de *primers* de DNA projetados para se ligarem à região de interesse da sequência genética. Essa técnica é usada em pesquisas, sequenciamentos, testes de paternidade, diagnósticos, análises de amostras forenses, agrônômicas, criação de organismos transgênicos, entre outras aplicações.

Os ciclos de temperatura repetidos por diversas vezes são:

1. Fase de desnaturação – 94 a 96°C abre a dupla hélice do DNA, expondo as fitas. Nesse período, a enzima *Taq Polimerase* não se desnatura, pois suporta altas temperaturas.
2. Hibridização ou anelamento – 55 a 65°C a temperatura é reduzida para que ocorra pareamento entre primers e a região de

interesse no DNA.

3. Fase de extensão – 72°C a temperatura é elevada e a Taq Polimerase retorna a sua ação, construindo uma nova fita a partir dos primers.

Os ciclos são repetidos cerca de 30 vezes, produzindo novas moléculas de DNA em um crescimento exponencial, compondo, assim, mais de 1 trilhão de cópias a partir de uma única amostra inicial. O resultado é analisado por eletroforese em gel de agarose, devendo ser interpretado por um profissional competente. Essa técnica possui limitações, como a necessidade de *primers* para a sequência de interesse, riscos de contaminações, limites na extensão da molécula duplicada, erros na inserção de nucleotídeos, etc.

Figura 3.7 | Termociclador



Fonte: <<https://goo.gl/pbouWJ>>. Acesso em: 2 nov. 2017.



Exemplificando

C técnicas como o PCR, podemos pesquisar e inserir genes em certos organismos, como o arroz dourado. Um protótipo desenvolvido em 1999 recebeu genes responsáveis pela produção da vitamina A, enriquecendo o alimento com essa vitamina escassa em dietas de países subdesenvolvidos.

O maior entendimento dos genomas dos organismos e o desenvolvimento de novas técnicas e aplicações da engenharia genética nos levará a diferentes formas de lidarmos com problemas

do presente, como diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças de animais e plantas, produção agrícola, entre outros desafios. Estima-se que nas próximas décadas, já teremos o sequenciamento de DNA da maioria das espécies do planeta. O que mais fará falta e parece ser o início do desenvolvimento é a ausência de profissionais capacitados em utilizar a tecnologia disponível. Você inicia conosco seu caminho pela biologia molecular, mas é você quem será capaz de mensurar até onde seus passos chegarão. Seu alicerce começa a ser preparado, e para avaliar seu aprendizado e evolução no assunto, vamos solucionar os problemas iniciais.



Pesquise mais

Conheça a página da *Khan Academy* destinada à análise de DNA. A página possui animações explicativas e testes interativos sobre PCR e outras técnicas da engenharia genética. Disponível em:

<<https://goo.gl/6TT4Fb>>. Acesso em: 22 nov.2017.

Sem medo de errar

Como professor do Departamento de Genética e Melhoramento Animal e Vegetal, você agora orienta pós-graduandos em nossa área de pesquisa. Ao ministrar a disciplina de genética molecular, questionamentos poderão ser abordados no primeiro dia de aula, como: *Qual é a diferença entre cromossomo, gene e genoma? O que significam as siglas DNA e RNA, tão comuns no vocabulário científico? O que é a estrutura da dupla-hélice, e quem a descobriu? O que é o sentido 5'-3'?*

Primeiramente, os cromossomos são estruturas em que o DNA apresenta-se condensado, forma como é encontrado em certas fases do ciclo celular. Na metáfase, por exemplo, os cromossomos possuem o máximo de espiralização. Nesse momento as fitas de DNA estão espiralizadas ou condensadas, sendo facilmente visíveis ao microscópio ótico.

As siglas DNA e RNA são referentes aos termos em inglês das moléculas de material genético. O DNA (deoxyribonucleic

acid) pode ser traduzido para o português como ADN (Ácido Desoxirribonucleico). O RNA (Ribonucleic acid) pode ser traduzido para o português como ARN (Ácido Ribonucleico).

A estrutura de dupla hélice do DNA é uma descoberta recente, que teve início com os trabalhos de Rosalind Franklin e, mais tarde, interpretados por Maurice Hugh Frederick Wilkins, James Dewey Watson e Francis Harry Compton Crick. A estrutura proposta é que a molécula de DNA é composta por uma dupla fita de nucleotídeos.

Os nucleotídeos unem-se por ligações fosfodiéster, formando uma fita longa composta por esses monômeros. A ligação é feita entre o fosfato e entre os carbonos da pentose no sentido 5'-3', isto é, em uma extremidade da fita, o carbono 5 da pentose estará livre, e na outra extremidade o carbono 3 também estará livre. A enzima responsável por ligar nucleotídeos na fita (durante a duplicação do DNA, por exemplo), irá inserir novos nucleotídeos sempre no sentido 5'-3'.

O DNA é composto por duas fitas. No entanto, a fita complementar sempre se apresenta no sentido invertido, mantendo-se unidas por meio de ligações de hidrogênio (pontes de hidrogênio) entre as bases nitrogenadas, que ocorrem sempre entre citosina (C) ligada à guanina (G) ou timina (T) ligada à adenina (A). As bases citosina e guanina são unidas por três ligações de hidrogênio, e timina e adenina são unidas por duas ligações de hidrogênio.

Resolvidos os questionamentos, prepare um plano de aula detalhando os conteúdos apresentados, respondendo todos os questionamentos.

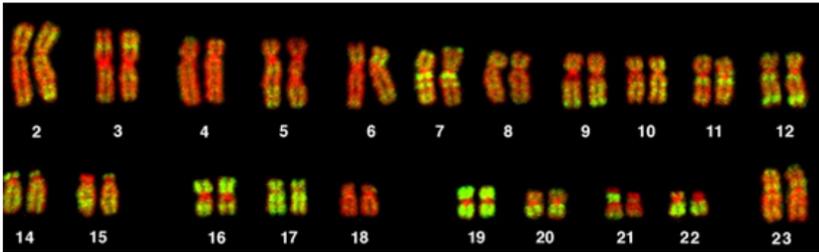
Avançando na prática

Liberdade de expressão

Descrição da situação-problema

Ao trabalhar como geneticista, é muito comum analisar cariótipos de vários indivíduos. Observe o cariótipo a seguir e responda:

Figura 3.8 | Cariótipo a ser analisado



Fonte: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Karyotype#/media/File:PLoSBIol3.5.Fig7ChromosomesAluFish.jpg>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

- a) Trata-se de um indivíduo do sexo masculino ou feminino? Como você concluiu isso?
- b) O cariótipo apresentado pode ser da espécie humana?
- c) O material genético apresentado é DNA ou RNA?
- d) A célula de onde foi retirada esse material é somática ou germinativa? É diploide ou haploide?
- e) De que maneira esse tipo de material genético se expressa?

Resolução da situação-problema

Analisando com cuidado o cariótipo a seguir, é possível concluir:

- a) Trata-se de um indivíduo do sexo feminino, já que o 23º par de cromossomos apresentam dois cromossomos X, e não apresenta cromossomo Y.
- b) O cariótipo apresentado pode ser da espécie humana, já que apresenta os padrões e número da espécie *Homo sapiens*.
- c) O material apresentado é DNA, já que se trata de cromossomos.
- d) A célula de onde foi retirada esse material genético é somática, já que possui dois pares de cada par cromossômico, ou seja, é diploide (2n).
- e) O material genético apresentado (DNA) irá se expressar produzindo RNA (transcrição), que por sua vez poderá produzir proteínas no citoplasma (tradução).

Faça valer a pena

1. A engenharia genética foi a grande revolução da segunda metade do século XX, capaz de criar os primeiros organismos geneticamente modificados (OGM) e originar os primeiros clones e organismos transgênicos. Grande parte das culturas de soja e milho brasileiras tem a tecnologia da transgenia, a partir do desenvolvimento de técnicas moleculares mais rápidas e precisas.

A técnica que utiliza enzimas para replicação em grande escala de fragmentos de material genético é chamada de:

- a) Reação de ácido ribonucleico (RNAr).
- b) Duplicação cromossômica alossômica.
- c) *Crossing-over*.
- d) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- e) Reação de transcrição de DNA nuclear.

2. A análise do conjunto cromossômico de um indivíduo pode detectar anomalias, como por exemplo a trissomia do cromossomo 18. Conhecida como síndrome de Edwards, os indivíduos apresentam três cópias do cromossomo 18 e podem apresentar crescimento lento, deficiências intelectuais graves, coração e cérebro defeituosos, entre outras desordens.

O conjunto cromossômico, incluindo características como número e formato, é chamado de:

- a) Cariótipo.
- b) Genoma.
- c) Proteoma.
- d) Alossomo.
- e) Autossomo.

3. Utilizando seus conhecimentos sobre biologia celular e molecular, analise as características do material genético humano:

- I. Presença de ribose como pentose em sua estrutura.
- II. Possui dupla fita de nucleotídeos.
- III. É formado no núcleo celular.
- IV. Possui as bases nitrogenadas guanina e uracila.
- V. Pode constituir ribossomos.

Com base nas informações anteriores, assinale a alternativa correta:

- a) O ácido desoxirribonucleico apresenta as características I, II e III.
- b) O RNA apresenta em sua estrutura as características apresentadas em II e IV.
- c) As características I, IV e V são exclusivas de RNA.
- d) O ácido ribonucleico é característico por possuir as características II, IV e V.
- e) As características II e III são exclusivas do DNA.

Seção 3.2

Replicação, transcrição e tradução

Diálogo aberto

Observando o que ocorre dentro do núcleo celular, iremos na atual seção conhecer os processos de replicação, transcrição e tradução do código genético.

Como professor do Departamento de Genética e Melhoramento Animal e Vegetal, é necessário conhecimento sobre os principais conceitos e definições referentes à biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula.

É seu trabalho manipular genomas inteiros de diversos tipos de microrganismos, bem como realizar a síntese de pequenas moléculas proteicas em laboratório, avaliando sua capacidade prática em microrganismos, plantas e animais. Recentemente, sua equipe de pesquisa trabalha em uma sequência genética sintética, que deverá ser inserida em equipamentos para obtenção de proteínas. Esse gene especificamente está ligado à resistência de uma planta contra pragas e deve determinar maior produção de lignina pelos vegetais. Se isso acontecer, a planta terá maior capacidade de impermeabilidade e de resistência a ataques de doenças e insetos.

Contudo, a equipe deve conferir se o processo está correto, simulando o processo de síntese da proteína final. Isso está a cargo de um de seus estudantes, que veio lhe pedir ajuda, pois está tendo dificuldades.

Analise a sequência do material genético a seguir:

TAC – CTA – ACG – GGG – ATG – TAA – GCA – AAT – AAA – GAA – TAC – GAG – CCA – GGG – AGT – AGA – GGA – GTG – ATT – TAA – CGC – CAT – CCC – TTT – AAT – TAC – GCA – TGG – TTA – TGT – AAA – ATT.

É sabido que nessa molécula, os códons em negrito são éxons, enquanto o restante são íntrons. As dúvidas de seu estudante são: como converter essa molécula em uma proteína? Qual a

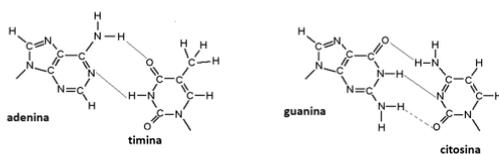
próxima molécula a ser formada? Qual será a sequência final de aminoácidos formados a partir desse fragmento genético? Onde esses processos ocorreriam normalmente em uma célula eucariota? Quais aminoácidos irão compor essa molécula? É comum códons distintos estarem traduzindo o mesmo aminoácido?

Faça um relatório com os resultados, discutindo os questionamentos levantados pelo estudante para sanar suas dúvidas e levar sua pesquisa adiante.

Não pode faltar

Conhecendo um pouco mais das moléculas que compõe nosso material genético, agora podemos aprofundar um pouco mais em como funcionam os processos de duplicação do DNA, transcrição para o RNA e a síntese de proteínas no interior da célula. Em nossa primeira seção, conhecemos a estrutura do DNA nuclear e vimos que se trata de uma dupla fita de nucleotídeos dispostos no sentido 5'-3'. No DNA, os nucleotídeos se unem por ligações de hidrogênio, com as bases citosina e guanina se unindo por três ligações de hidrogênio, e as bases adenina e timina se unindo por duas ligações. Sendo assim, haverá sempre uma complementariedade de cada fita, e a quantidade de guanina sempre será a mesma de citosina, como também a mesma quantidade de timina será a de adenina. Essas informações são essenciais para você compreender como ocorre a replicação da molécula de DNA.

Figura 3.7 | A complementariedade de bases nitrogenadas no DNA

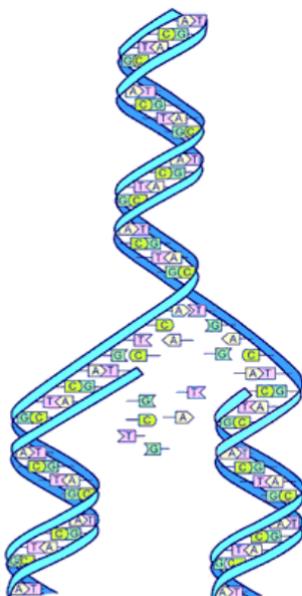


Fonte: adaptada de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Replica%C3%A7%C3%A3o_do_DNA#/media/File:Dna-hydr.gif>. Acesso em: 13 nov. 2017.

Replicação do DNA

Quando uma célula se duplica, há a necessidade da síntese de uma nova cópia do genoma presente na mesma. Esse processo é chamado de duplicação ou replicação do DNA e ocorre no interior do núcleo celular. Nos eucariotos, a replicação costuma ocorrer na fase S da intérfase, processo que pode ser reproduzido em laboratório através de termocicladores, como vimos na unidade anterior. A duplicação do DNA ocorre de forma **semiconservativa**, pois cada uma das duas fitas servirá como molde para a formação das novas cópias, originando assim duas novas cópias do DNA, contendo cada nova molécula uma fita recém-formada e outra fita original, como mostra a Figura 3.8.

Figura 3.8 | Duplicação semiconservativa do DNA



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Replica%C3%A7%C3%A3o_do_DNA#/media/File:Dna-split.png>. Acesso em: 13 nov. 2017.

A replicação do DNA se inicia com um complexo enzimático, no qual existe a enzima **helicase**, responsável por abrir a dupla fita de DNA, rompendo as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. Essa enzima se liga a uma região determinada por

uma sequência de nucleotídeos, chamada **origem de replicação** ou **forquilha de replicação**. Na duplicação de um cromossomo eucarioto, podem haver vários sítios de origem de replicação, enquanto que em um cromossomo bacteriano haverá apenas um sítio de origem de replicação (como em *Escherichia coli*). Para auxiliar a helicase na separação da molécula, uma enzima chamada de **girase** (um tipo de topoisomerase) auxilia na distorção da dupla fita, desfazendo a conformação de dupla hélice. Após as fitas se abrirem, a **proteínas SSB** (proteínas de ligação à cadeia simples ou **SSBP** – *Single Strand Binding Proteins*) se ligam aos nucleotídeos, impedindo que a dupla fita se ligue novamente.

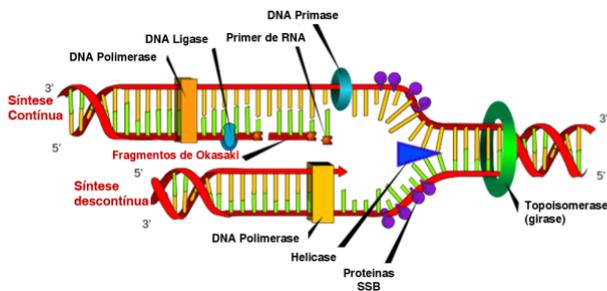
Após a dupla fita ser aberta, os nucleotídeos são expostos e servirão de molde à formação das novas moléculas. Para a replicação se iniciar, uma enzima chamada **primase** sintetizará um pequeno fragmento inicial de cadeia simples de RNA, chamado de **primer** (iniciador de RNA), que é necessário para que o complexo enzimático da DNA polimerase inicie a síntese e inserção dos nucleotídeos. Sem esse iniciador, a DNA polimerase não consegue iniciar a síntese de uma nova fita.

A partir do *primer*, a enzima DNA Polimerase III inicia a inserção de nucleotídeos complementares na fita de DNA e as SSBP são removidas. Contudo, as enzimas do complexo DNA Polimerase sempre fazem a síntese da nova fita no sentido 5'-3' (posição do carbono do nucleotídeo). Uma das fitas complementares terá a disposição do carbono inversa (3'-5'), sendo assim chamada de **fita antiparalela**. Dessa maneira, a DNA Polimerase III não conseguirá inserir os nucleotídeos continuamente. Nessa fita antiparalela, haverá a formação de vários *primers* e a DNA Polimerase III irá inserir nucleotídeos no sentido 5'-3' conforme a fita for aberta, sintetizando vários fragmentos de DNA intermitentes chamados de **fragmentos de Okasaki**. Sendo assim, uma fita será formada continuamente (fita de síntese contínua ou fita *leading* – contém somente um *primer*) e outra será formada com atraso (fita de síntese descontínua ou fita *lagging*, necessita de vários *primers*).

Após a formação das fitas contínua e descontínua, algumas enzimas possuem funções adicionais. A **DNA Polimerase I** irá retirar os *primers* de RNA e sintetizar DNA no local, e a **DNA ligase** irá ligar os fragmentos de DNA recém-formados dos fragmentos de Okasaki

(unindo as pontas 3'e 5'). Ao final do processo, as enzimas DNA Polimerase I e III irão revisar e corrigir possíveis falhas na replicação. Um resumo do processo é mostrado na Figura 3.9.

Figura 3.9 | Enzimas envolvidas na replicação do DNA



Fonte: adaptada de <https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_replication#/media/File:DNA_replication_en.svg>. Acesso em: 13 nov. 2017.

A velocidade da replicação é impressionante, ocorrendo em média a síntese de 700 pares de base por segundo pela DNA Polimerase, com a possibilidade de haver aumento ou redução na velocidade. Ao final do processo, duas novas duplas fitas de DNA são formadas, contendo uma das fitas conservadas da molécula original e outra fita recém-sintetizada pelo complexo DNA Polimerase. Esse processo minimiza erros na duplicação da célula, o surgimento de anomalias ou doenças genéticas.



Assimile

Erros na revisão da sequência de nucleotídeos podem causar anomalias genéticas, chamadas de mutações. Podem ser causadas por erros enzimáticos ou fatores ambientais, como radiação, vírus, substâncias químicas, etc.

Transcrição do DNA

A molécula de DNA possui todas as informações para comandar os processos celulares. Contudo, a molécula de DNA não deixará o

núcleo para realizar essa função. Para isso, o DNA será codificado em RNA, processo que é chamado de **Dogma Central da Biologia Molecular**. Postulado por Francis Crick em 1958, o Dogma Central explica como ocorre o fluxo de informações na célula. O DNA será convertido em RNA (transcrição), que por fim será convertido em proteínas (tradução). Atualmente, sabe-se que existem enzimas capazes de realizar o processo inverso, como converter RNA em DNA (transcriptase reversa), podemos então resumir e atualizar o dogma central de acordo com a figura a seguir.

Figura 3.10 | Fluxo de informações do código genético na célula



Fonte: elaborada pelo autor.

O DNA expressa sua informação por meio de unidades de três nucleotídeos, chamados de **trincas** ou **códons**. Os códons serão transcritos inicialmente em uma molécula chamada de **Pré-RNA mensageiro** ou **Pré-RNAm**, que posteriormente será processada em **RNA mensageiro** (RNAm) e enviada para o citoplasma. O processo de transcrição envolve gasto de ATP (energia) e diversos fatores de transcrição que preparam o complexo enzimático, se ligando a regiões específicas do DNA, reguladoras da transcrição.

O complexo enzimático responsável pela transcrição é chamado de **RNA Polimerase** e possui enzimas capazes de abrir a dupla fita de DNA, sintetizar a fita única de RNA e refazer a ligação na fita aberta do DNA. Esse complexo enzimático se ligará ao DNA em sequências específicas, chamadas de regiões promotoras ou sítios de reconhecimento (como a caixa TATA). Da mesma forma como vimos antes, a síntese da fita ocorrerá no sentido 5'-3', codificando em apenas um dos lados (*fase de iniciação*). Existem três tipos de

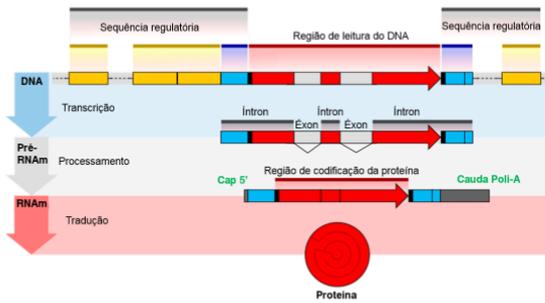
RNA Polimerase, a **RNA Polimerase I** (transcreve RNA ribossômico), a **RNA Polimerase II** (transcreve RNA mensageiro e alguns pequenos RNA nucleares – snRNA) e a **RNA Polimerase III** (transcreve RNA transportador, alguns snRNA e o 5S rRNA, este último possuindo papel estrutural no ribossomo).

Todo gene possui regiões promotoras, que sinalizam onde a RNA Polimerase deve se ligar para iniciar a transcrição e utilizar o molde do DNA para inserir os nucleotídeos do RNA (lembrando que irá inserir a base nitrogenada uracila no lugar de timina), produzindo assim a fita de RNA (*fase de alongamento*). Quando o final da região de transcrição do DNA é atingido, o complexo RNA Polimerase se dissocia e libera a nova molécula de RNA (*fase de finalização*).

Nos procariotos, o RNA formado irá se unir aos ribossomos no citoplasma e realizar a tradução. Nos eucariotos, o RNA formado após a transcrição é ainda um Pré-RNA_m, que será processado.

O processamento do Pré-RNA_m ocorre pelo acoplamento de uma guanina modificada na extremidade 5', chamada de capacete do RNA ou Cap 5', que irá auxiliar no processo de tradução, aumentando a produção de proteínas. Também será acrescentada na extremidade 3' uma cauda poli-A (um segmento de RNA com vários nucleotídeos com adenina), que irá proteger a molécula contra danos e irá auxiliar na tradução. Além disso, ocorrerá um processo chamado de *splicing*, onde ocorrerá a remoção de determinados códons. Existem códons que serão expressos na tradução, chamados de **éxons**, e códons que não serão expressos e serão retirados no processamento, chamados de **íntrons**. Após o processamento, teremos finalmente a molécula de RNA_m madura, que migrará ao citoplasma e traduzida em proteínas. Um esquema resumido do processo é mostrado na figura a seguir.

Figura 3.11 | Transcrição do DNA e processamento do Pré-RNAm nos eucariotos



Fonte: adaptada de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/54/Gene_structure_eukaryote_2_annotated.svg>. Acesso em: 13 nov. 2017.

Tradução ou síntese proteica

A molécula de RNAm madura chegará ao citoplasma, no qual irá realizar a tradução, um processo em que a informação contida nessa molécula será decodificada em uma proteína. Esse processo envolve mais duas estruturas também formadas por RNA: o **ribossomo** e o **RNA transportador** (RNAt). A molécula de RNAm irá se associar as duas subunidades dos ribossomos, que irão interpretar a informação contida na molécula da extremidade 5' para a 3', decodificando os códons presentes na molécula (*fase de iniciação*). Cada códon será correspondente a um aminoácido, ou seja, a cada três nucleotídeos do RNAm, o peptídeo ou proteína terá um aminoácido.

As moléculas de RNAt irão migrar até os ribossomos, onde irão se associar ao RNAm se ligando em um códon correspondente ao que está sendo codificado. A região correspondente do RNAt ao códon do RNAm é chamada de **anticódon**. Na outra extremidade do RNAt, haverá um aminoácido específico àquele códon contido no RNAm (informação que originalmente veio do DNA). O primeiro códon presente em um RNAm é geralmente o códon iniciador (AUG), que codifica o aminoácido metionina. A ligação entre o RNAt e o RNAm ocorre no primeiro dos dois sítios presentes no ribossomo: o **Sítio P**.

Após o primeiro códon ser traduzido no sítio P, o próximo códon poderá ser traduzido no segundo espaço no **Sítio A**. O ribossomo une os dois aminoácidos (por meio de uma ligação peptídica) e o primeiro RNAt (que trouxe a metionina) é liberado do sítio P. O ribossomo se

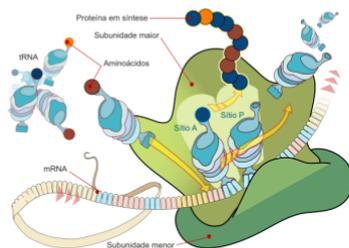
move pela molécula de RNAm e o sítio A é novamente liberado para o próximo RNAt, correspondente ao terceiro códon. Dessa maneira, a molécula de RNAm é traduzida em vários aminoácidos, que aos poucos formam uma cadeia polipeptídica (*fase de alongamento*), e posteriormente pode vir a formar uma proteína. Existem três códons que sinalizam o fim da tradução do RNAm (UAA, UAG e UGA), no qual o complexo irá se desfazer (*fase de finalização*).



Exemplificando

Conceitualmente, um peptídeo é uma molécula com um número baixo de aminoácidos, e uma proteína é considerada uma molécula com muitos aminoácidos. O número difere de acordo com os autores, mas geralmente moléculas com mais de 100 aminoácidos são consideradas proteínas.

Figura 3.12 | Esquema do processo de tradução



Fonte: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Tradu%C3%A7%C3%A3o_\(gen%C3%A9tica\)#/media/File:Ribosome_mRNA_translation_pt.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Tradu%C3%A7%C3%A3o_(gen%C3%A9tica)#/media/File:Ribosome_mRNA_translation_pt.svg)>. Acesso em: 13 nov. 2017.



Assimile

Uma mesma molécula de RNAm pode estar associada a vários ribossomos, constituindo o **polirribossomo**. Todos irão produzir proteínas idênticas, utilizando a mesma molécula de RNAm.

Se existem três nucleotídeos possíveis, o número máximo de combinações possíveis são 64 códons ($4^3=64$). Levando em conta que na espécie humana só ocorrem 20 aminoácidos distintos,

teremos várias combinações que não codificam nada? Pelo contrário. Nosso código genético é considerado **degenerado** ou **redundante**, pois possui a característica de codificar o mesmo aminoácido utilizando diferentes sequências de nucleotídeos, conforme mostra o Quadro 3.1.

Quadro 3.1 | Lista de códons com respectivos aminoácidos especificados

| | | Primeira base | | | | | | | | |
|---|-----|---------------|--------------------|---------|----------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|---------------|
| | | U | C | A | G | | | | | |
| Segunda base | D | UUU | Fenilalanina | UCU | Serina | UAU | Tirosina | UGU | Cisteína | Terceria base |
| | | UUC | Fenilalanina | UCC | Serina | UAC | Tirosina | UGC | Cisteína | |
| | | UUA | Leucina | UCA | Serina | UAA | Códon de parada | UGA | Códon de parada | |
| | | UUG | Leucina | UCG | Serina | UAG | Códon de parada | UGG | Triptofano | |
| | C | CUU | Leucina | CCU | Prolina | CAU | Histidina | CGU | Arginina | |
| | | CUC | Leucina | CCC | Prolina | CAC | Histidina | CGC | Arginina | |
| | | CUA | Leucina | CCA | Prolina | CAA | Glutamina | CGA | Arginina | |
| | | CUG | Leucina | CCG | Prolina | CAG | Glutamina | CGG | Arginina | |
| | A | AUU | Isoleucina | ACU | Treonina | AAU | Asparagina | AGY | Serina | |
| | | AUC | Isoleucina | ACC | Treonina | AAC | Asparagina | AGC | Serina | |
| | | AUA | Isoleucina | ACA | Treonina | AAA | Lisina | AGA | Arginina | |
| | | AUG | Metionina (início) | ACG | Treonina | AAG | Lisina | AGG | Arginina | |
| G | GUU | Valina | GCU | Alanina | GAU | Ácido Aspártico | GGU | Glicina | | |
| | GUC | Valina | GCC | Alanina | GAC | Ácido Aspártico | GGC | Glicina | | |
| | GUA | Valina | GCA | Alanina | GAA | Ácido Glutâmico | GGA | Glicina | | |
| | GUG | Valina | GCG | Alanina | GAG | Ácido Glutâmico | GGG | Glicina | | |
| Aminoácidos Naturais Aminoácidos Essenciais | | | | | | | | | | |

Fonte: adaptado de <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Codontable1.PNG>>. Acesso em: 13 nov. 2017.



Refleta

Se diversos nucleotídeos codificam o mesmo aminoácido, isso ofereceria alguma vantagem em caso de ocorrer algum erro que passe despercebido pelos mecanismos de correção? Isso auxilia o organismo a mitigar o número de proteínas mutantes?

Além disso, dizemos que o código genético é **universal**, pois a mesma trinca que traduz determinado aminoácido na espécie humana também processa da mesma maneira o mesmo aminoácido de outros animais, plantas, algas, fungos, protozoários e bactérias. É uma das evidências de que todos os organismos da Terra possuem um único ancestral comum. Dessa maneira, o DNA controla todos os processos celulares, produzindo proteínas que irão ter funções muito variadas nas células, como hormônios (adrenalina), defesa contra agentes invasores (anticorpos), catalizadores de reações

(enzimas), transporte de substâncias (hemoglobina), proteínas estruturais (queratina), etc.



Pesquise mais

Leia um pouco mais sobre os processos ocorridos no Dogma Central da Biologia Molecular e amplie seus conhecimentos sobre esses processos tão incríveis que ocorrem a todo momento em nossas células.

DOGMA Central (DNA a RNA a proteína). Khan Academy. Disponível em: <<https://pt.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma#transcription-of-dna-into-rna>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

Sem medo de errar

Utilizando seus conhecimentos após a nossa seção, vamos retomar os problemas a serem solucionados por você, no papel de docente do Departamento de Genética e Melhoramento Animal e Vegetal. Analise a sequência do material genético a seguir:

TAC – CTA – **ACG** – GGG – **ATG** – TAA – **GCA** – **AAT** – **AAA** – GAA – **TAC** – **GAG** – CCA – **GGG** – **AGT** – **AGA** – **GGA** – **GTG** – ATT – **TAA** – **CGC** – **CAT** – **CCC** – **TTT** – **AAT** – TAC – **GCA** – TGG – **TTA** – **TGT** – **AAA** – ATT.

É sabido que nessa molécula, os códons em negrito serão éxons, enquanto o restante serão íntrons. As dúvidas de seu estudante são: como converter essa molécula em uma proteína? Qual a próxima molécula a ser formada? Onde esses processos ocorreriam normalmente em uma célula eucariota? Quais aminoácidos irão compor essa molécula? É comum códons distintos estarem traduzindo o mesmo aminoácido?

Essa molécula de DNA (já que possui timina, logo é DNA) poderá ser convertida em uma proteína seguindo o Dogma Central da Biologia Molecular por meio dos processos de Transcrição e Tradução.

Convertendo este trecho de DNA em um Pré-RNAm, processo que chamamos de transcrição e ocorre no núcleo dos eucariotos, teremos os seguintes códons:

AUG – GAU – UGC – AAA – UAC – AUU – CGU – UUA – UUU
– CUU – AUG – CUC – GGU – CCC – UCA – UCU – CCU – CAC
– UAA – AUU – GCG – GUA – GGG – AAA – UUA – AUG – CGU –
ACC – AAU – ACA – UUU – UAA.

Ainda no núcleo ocorrerá o processamento do Pré-RNAm, que será convertido em RNAm maduro:

AUG – GAU – UGC – UAC – CGU – UUA – UUU – AUG – CUC
– CCC – UCA – UCU – CCU – CAC – AUU – GCG – GUA – GGG
– AAA – UUA – CGU – AAU – ACA – UUU – UAA.

Por meio da tabela de códons e aminoácidos, podemos converter a sequência de nucleotídeos no seguinte peptídeo:

Metionina – Ácido Aspártico – Cisteína – Tirosina – Arginina –
Leucina – Fenilalanina – Metionina – Leucina – Prolina – Serina –
Serina – Prolina – Histidina – Isoleucina – Alanina – Valina – Glicina
– Lisina – Leucina – Arginina – Asparagina – Treonina – Fenilalanina –
Códon de parada. Como visto, é comum dois códons decodificarem
o mesmo aminoácido, característica do código genético chamada
de degeneração ou redundância.

Confira se tudo está correto e faça seu relatório, discutindo os questionamentos levantados pelo estudante, levando assim sua pesquisa adiante.

Avançando na prática

Catalisando acertos

Descrição da situação-problema

No cotidiano no laboratório de genética, o uso de reagentes e enzimas para realizar as pesquisas é indispensável. Você já conhece as funções das principais enzimas que realizam as diversas funções no interior das células, mas deve se precaver que seus estudantes não cometam erros durante seus experimentos. Por isso, você irá facilitar um pouco o trabalho no laboratório e evitar possíveis equívocos e perda de dados e pesquisas.

Analise os kits de enzimas recém-adquiridos pelo laboratório e adicione uma breve descrição do papel dessa enzima nos processos

de Duplicação, Transcrição e Tradução:

- Helicase: abre a dupla fita de DNA, rompendo as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.
- DNA Polimerase I:
- DNA ligase:
- RNA Polimerase:
- DNA Polimerase III:
- Girase:
- Primase:

Resolução da situação-problema

Descrevendo brevemente as funções de cada enzima no laboratório teremos:

- Helicase: abre a dupla fita de DNA, rompendo as ligações de hidrogênio.
- DNA Polimerase I: retira os *primers* de RNA (nos fragmentos de Okazaki) e sintetiza DNA no local e possíveis falhas na inserção de nucleotídeos.
- DNA ligase: liga os fragmentos de Okasaki na molécula de DNA.
- RNA Polimerase: abre a molécula de DNA e sintetiza a fita de RNA.
- DNA Polimerase III: a partir do *primer*, a enzima DNA Polimerase III inicia a inserção de nucleotídeos complementares, além de conferir e corrigir erros na inserção de nucleotídeos.
- Girase: auxilia a distorcer a dupla hélice da molécula de DNA, facilitando a duplicação celular.
- Primase: insere o *primer* de RNA para servir de iniciador para a DNA Polimerase III.

Faça valer a pena

1. Durante o crescimento de animais e plantas, a duplicação celular é intensa, gerando um grande número de células e formando novos tecidos. A replicação do material genético é necessária para que novas células sejam formadas, contendo todo o genoma da célula inicial. Esse processo

é controlado por um complexo de enzimas, que duplica e corrige possíveis falhas na síntese do novo genoma.

O complexo enzimático envolvido na duplicação do ácido desoxirribonucleico é chamado:

- a) RNA Polimerase.
- b) Replicases ácidas.
- c) Ácidos Nucleicos.
- d) DNA Polimerase.
- e) Polirribossomo.

2. Proposto por Francis Crick em 1958, o Dogma Central da Biologia Molecular postula que existe uma ordem no fluxo de informações na célula, de forma que o material genético possa controlar todos os processos intracelulares. Analise as sequências de processos abaixo e responda:

- I. Tradução.
- II. Transcrição.
- III. Replicação.

Supondo que uma célula se divida e em seguida realize os processos para a produção de um hormônio proteico, a ordem dos eventos será:

- a) I, II, III.
- b) I, III, II.
- c) II, III, I.
- d) III, II, I.
- e) III, I, II.

3. O DNA é o material genético de todos os seres vivos conhecidos. Contudo, partículas virais podem apresentar RNA como seu único material genético. Exemplos são os vírus da família *Retroviridae*, como o HIV, causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Quando um retrovírus infecta uma célula, ele necessita introduzir seu material genético no cromossomo do hospedeiro na forma de DNA, para isso ele utiliza o processo de:

- a) Transcrição reversa, convertendo RNA em DNA.
- b) Tradução inversa, convertendo RNA em DNA.
- c) Tradução inversa, convertendo suas proteínas em DNA Polimerases.
- d) Replicação de RNA, convertendo RNA em DNA.
- e) Transcrição, convertendo seu DNA em RNA viral.

Seção 3.3

Regulação da expressão gênica

Diálogo aberto

Adentraremos pouco a pouco nos processos moleculares da duplicação, transcrição e tradução do material genético. Nesta Seção abordaremos a regulação da expressão gênica, e você saberá porque esses processos são importantes nas nossas células, atuando como um dos docentes do Departamento de Genética e Melhoramento Animal e Vegetal, uma das áreas de maior importância da genética aplicada, principalmente em nossa universidade, com campus voltado para pesquisas no ramo agropecuário.

Todo ano, o departamento de genética realiza um curso de inverno, ministrado aos alunos de graduação, sobre as atualidades em genética. Você recebeu um convite para ministrar um curso sobre expressão gênica, em que irá apresentar como, a partir de um zigoto, ocorre a formação de um organismo tão complexo e diferenciado. Como as células definem quais genes serão expressos e quais não serão? O que são histonas, metilação e acetilação?

Portanto, prepare um breve *briefing* (documento com informações básicas) que será convertido em uma apostila de seu curso, sobre os principais métodos de regulação da expressão gênica.

Não pode faltar

Todas as nossas células têm o mesmo genoma, contendo informações para se diferenciar em qualquer tecido, bem como todos os genes que codificam as mais diversas proteínas do nosso corpo, desde hormônios até enzimas. Então, por que as células do seu olho não produzem insulina? Por que seus hepatócitos não produzem anticorpos? Quem controla o fluxo de informações que vêm do núcleo, ditando o que uma célula irá ou não produzir, e em que tipo de tecido ou órgão aquela pequena parte do embrião irá se diferenciar?

Hoje você irá aprofundar seus conhecimentos sobre o controle da expressão gênica nos organismos, desde seres procaríotos até

organismos eucariotos, como o do ser humano. Entender quais processos moleculares estão envolvidos para que suas células desempenhem a função correta de acordo com as necessidades, garantindo, assim a homeostase. Você acompanhou nas seções anteriores a estrutura e a função do DNA e RNA e estudou os processos envolvidos no Dogma Central da Biologia Molecular. Dessa forma, você possui embasamento para entender esta seção, que evidenciará como esses processos são regulados no ambiente intracelular.

Regulação da expressão gênica em eucariotos

Como um zigoto origina um ser tão complexo, com tecidos e células tão especializadas? Todas as informações contidas nos 23 pares de cromossomos são controladas por processos moleculares muito sensíveis. As diferenças entre células tão distintas, como um neurônio e um enterócito, se dá pela expressão de diferentes genes e, conseqüentemente, pela produção de diferentes proteínas.

Ressaltamos que existem muitas proteínas que estão presentes em todas as células, como componentes celulares (enzimas, citoesqueleto, proteínas componentes de ribossomos, proteínas transportadoras, etc.), contudo, existem proteínas muito específicas, produzidas, muitas vezes, por um só tipo de célula (como por exemplo a produção de neurotransmissores pelos neurônios; a produção de hemoglobina por eritrócitos, etc.). O conjunto de proteínas de uma célula específica, quando sujeita a estímulos, é chamado de **proteoma** e está ligado à produção de RNAm e a sua tradução no citoplasma. Isso quer dizer que um neurônio possui o gene para produzir hemoglobina, mas não o expressa. Apesar de conter a informação em seu genoma, essa célula não produzirá essa proteína, não fazendo parte de seu proteoma.



Refleta

Por que todas as células não produzem todas as proteínas possíveis e as distribuem pelo corpo por meio do sangue? Existe algum motivo evolutivo para a especialização das células?

Ao seguir o fluxo de informação de uma célula, como estudamos no Dogma Central, a expressão gênica de um eucarioto pode ser controlada basicamente em sete fases durante esse processo:

1. **Fase de transcrição:** fatores impedem que o pré-RNAm seja produzido.
2. **Fase de processamento do RNAm:** o pré-RNAm não é processado e não se torna um RNAm maduro, capaz de ser traduzido em proteínas.
3. **Degradação de RNAm em nucleotídeos:** as fitas de RNAm maduro são degradadas, impedindo, reduzindo ou paralisando a tradução.
4. **Regulação da tradução:** o processo de síntese proteica pode ser regulado, impedindo a produção das macromoléculas.
5. **Regulação do processamento de proteínas:** após a síntese, as proteínas necessitam de processamento para atingirem sua estrutura tridimensional (forma ótima de funcionamento).
6. **Degradação de proteínas:** as proteínas produzidas podem ser desnaturadas e perder até sua estrutura primária, sendo degradada novamente em aminoácidos.
7. **Endereçamento e transporte de proteínas:** após sua produção, o transporte de determinadas proteínas pode ser controlado, o que impede que a célula receptora expresse a informação.

Iremos detalhar os processos que podem agir nessas fases da expressão gênica, que envolvem alterações que não modificam as sequências de nucleotídeos do DNA (chamado de controle epigenético). Um dos fatores básicos que controla a expressão gênica nos eucariotos é a condensação do seu DNA. Quanto mais compactada ou condensada estiver a fita de DNA, mais difícil será o acesso das enzimas até a sequência de nucleotídeos, impedindo a expressão daquela sequência genética.

Diversas enzimas participam da transcrição, juntamente com a RNA Polimerase, e são chamadas fatores de transcrição. Existem fatores em todos os genes, chamados de **fatores gerais de transcrição**. Essas proteínas auxiliam a RNA Polimerase II a localizar a região promotora (como a *TATA box*, entre outras) e a realizar efetivamente a transcrição. Existem também **fatores específicos de**

transcrição, que agem em determinados genes em certo período de desenvolvimento. Essas proteínas garantem uma regulação muito sensível da transcrição. Além disso, certas sequências podem intensificar a tradução (*enhancers* ou intensificadoras), bem como reprimir a transcrição (silenciadoras), por interações de fatores de transcrição específicos.

A atividade da expressão gênica também pode estar relacionada ao nível de condensação do material genético. O DNA nuclear não se apresenta como uma dupla fita isolada e está sempre associado às proteínas, compondo, assim a cromatina. A conformação da cromatina é dinâmica, podendo estar muito condensada ou compactada (como nos cromossomos metafásicos) ou pouco condensada (com a dupla fita de DNA aberta e associada a poucas proteínas). Existem dois tipos básicos de proteínas associadas ao DNA: as histônicas e as não-histônicas.

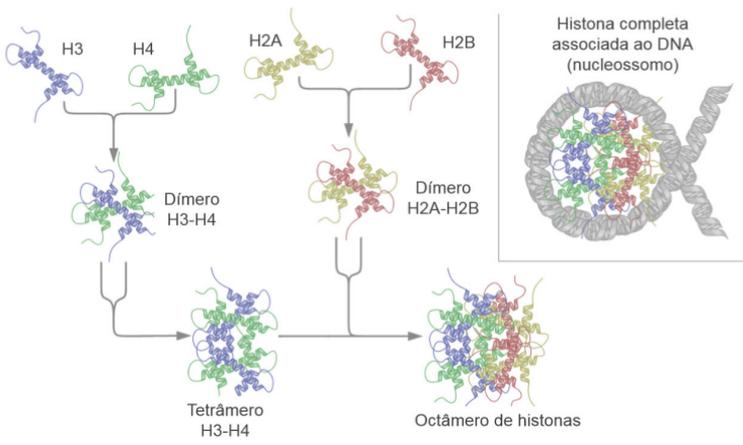
As proteínas histônicas ou histonas são moléculas alcalinas bastante estáveis, ricas em aminoácidos arginina e lisina. Elas se ligam ao DNA pela interação do radical amina com os fosfatos dos nucleotídeos, dessa forma, não dependem da sequência nucleotídica para se associarem. É formada por monômeros classificados de acordo com seu teor de aminoácidos em H1, H2A, H2B, H3 e H4, e, ao se associarem, formam estruturas em que o DNA se espiraliza, produzindo o nucleossomo (figura 3.13). A fita de DNA tem 2nm, enquanto fibras de nucleossomo têm 10nm. No estágio máximo de condensação (cromossomo metafásico), o DNA pode ter 1400 nm.

A cromatina será dividida em dois grupos: a **euromatina** e a **heterocromatina**. A euromatina é menos compactada e dividida em dois subgrupos: a euromatina ativa (menos condensada e com seus genes expressos; constitui 10% da euromatina) e a euromatina inativa, (que é mais condensada e que não tem seus genes expressos; constitui 90% da euromatina). Em um estágio ainda maior de condensação, há a heterocromatina, que não é expressa em RNA em nenhum momento. Durante o ciclo celular, a compactação da cromatina se altera entre as fases de divisão celular e intérfase.



A inativação do cromossomo X na mulher é um exemplo da heterocromatina. Uma de suas cópias é inativada no início do período embrionário, condensando em cada célula a cópia materna ou paterna. A inativação ocorre ao acaso, sendo assim, a mulher adulta possui cópias maternas ou paternas ativas em diferentes células. O padrão de células diferentes é visível em gatos cálicos (tricolores), com faixas de pelo distintas.

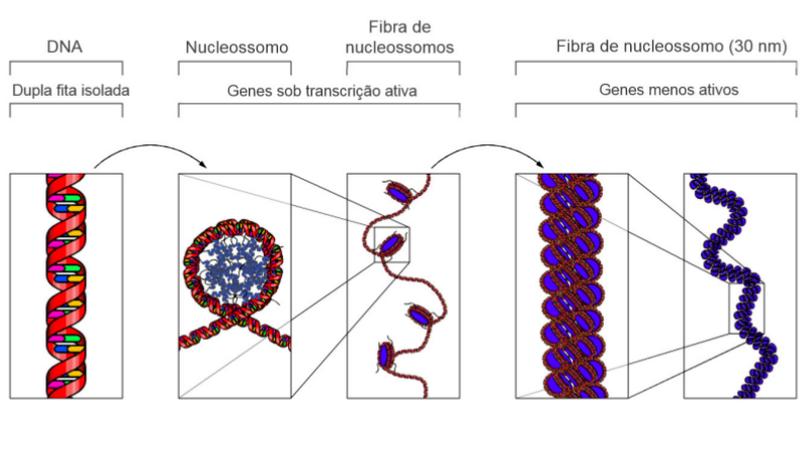
Figura 3.13 | Monômeros de uma histona associados compondo um nucleossomo



Fonte: adaptada de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Histona#/media/File:Nucleosome_structure.png>. Acesso em: 20 nov. 2017.

Os genes que estão enovelados não serão transcritos e, se regiões promotoras, como a caixa TATA (ou *TATA box*), também estiverem enoveladas, fatores de transcrição não irão se associar e não haverá expressão gênica. Em contrapartida, se essa região for descondensada, haverá a possibilidade de transcrição e o gene estará ativo.

Figura 3.14 | Compactação do DNA em nucleossomos



Fonte: adaptada de: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatin#/media/File:Chromatin_Structures.png>. Acesso em: 20 nov. 2017.

A atividade da transcrição da cromatina pode ser alterada por processos de ligação de radicais nas histonas. Isso irá alterar a conformação das proteínas pela mudança de cargas elétricas, enfraquecendo a atração das histonas pelo radical fosfato do DNA, expondo as regiões enoveladas. Exemplos comuns de modificações por radicais ligados às histonas são a acetilação, ubiquitinação, metilação, fosforilação, etc. Todos esses processos aumentam a expressão gênica, tornando ativa a eucromatina que estava inativada. São ligações reversíveis e enzimas podem retirar esses radicais, inativando novamente a região.

A **acetilação** ocorre pela ligação de radicais acetila nas histonas H2A, H2B, H3 e H4, descompactando o nucleossomo e permitindo ação do complexo RNA Polimerase. Esse processo é feito por enzimas que incluem o radical acetil (histona acetiltransferase) e retiram o radical (Histona desacetilase). De forma semelhante temos a **ubiquitinação**, em que a proteína ubiquitina se liga às histonas H2A e H2B e altera a estrutura das fibras dos nucleossomo, bem como permite a ação da RNA Polimerase em determinadas sequências. A **metilação das histonas** também se dá pela ligação do radical **metil** (CH₃) na lisina dessas proteínas, que altera sua carga, enfraquecendo a ligação com a dupla hélice de DNA.

Além das histonas, a cromatina pode conter proteínas não histônicas diversas, como enzimas (DNA polimerases, helicases, etc.), estar associada à organização e compactação do DNA nos cromossomos e aos processos de ativação ou repressão gênica (Grupo HGM – *high mobility group*).

Outro exemplo do controle da expressão gênica é pelas **Regiões Controladoras de Locus** (LCRs). São sequências que determinam a abertura da cromatina, controlando um número grande de genes. Um exemplo bem estudado é a produção das globinas (proteínas precursoras da hemoglobina), controlada por uma LCR. Durante a vida embrionária e pós-natal, diferentes regiões do DNA irão produzir diferentes globinas (genes γ , ϵ , ζ , α , δ e ψ) necessárias para a formação dos eritrócitos. Certos genes serão silenciados, enquanto outros passarão a se expressar. A LCR se liga ao promotor do gene, tornando aquela sequência ativa e inativando as demais.

Porém, existem mecanismos para inativar promotores e genes, como a **metilação do DNA**. A ligação do radical metil ocorre na base nitrogenada citosina (formando 5-metilcitosina), impedindo a ligação com a RNA Polimerase e silenciando a expressão gênica. Existem regiões com grandes quantidades de citosina-guanina, chamadas de **ilhas CpG**, que ocorrem próximas dos promotores de genes. Se essas ilhas forem metiladas, a RNA Polimerase não conseguirá se associar ao promotor e transcrever a fita. Cerca de 70% dos promotores de genes se localizam próximos a essas ilhas (SAXONOV; BERG; BRUTLAG, 2006). Nas aves, por exemplo, o promotor do gene da ovalbumina não está metilado nos tecidos do oviduto, mas em todas as outras células do corpo.

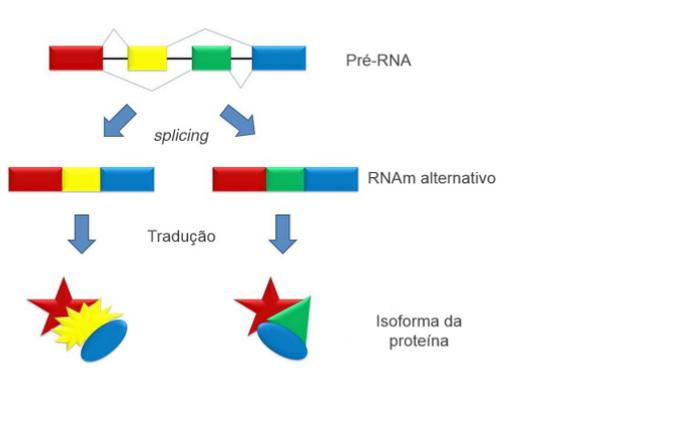
Figura 3.15 | Metilação de ilhas CpG e inativação do gene



Fonte: adaptada de: <https://en.wikipedia.org/wiki/CpG_site#/media/File:Cpg_island_evolution.svg>. Acesso em: 21 nov. 2017.

A regulação também pode ocorrer pelo **Splicing alternativo**. Lembra-se do processamento do Pré-RNA? A retirada dos íntrons e manutenção dos éxons forma o RNAm maduro. Contudo, pode haver uma alternância e manutenção de certas sequências, formando RNAm diferentes e, conseqüentemente, proteínas diferentes vindas de um mesmo gene. A miosina (proteína relacionada à contração muscular) possui diferentes sequências de aminoácidos em células diferentes, sendo transcrita do mesmo gene.

Figura 3.16 | O processo de *Splicing* alternativo



Fonte: adaptada de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Splicing_alternativo#/media/File:Splicing_overview.jpg>. Acesso em: 21 nov. 2017.

Após ser transcrito, existem mecanismos que podem regular a expressão gênica, como os **micro-RNAs** ou **miRNA**, pequenas moléculas de ácido ribonucleico (17 a 27 nucleotídeos) que não são traduzidas e se ligam à sequências de RNAm específicas, reduzindo a expressão dessas moléculas ou até clivando o RNAm. Enzimas também podem alterar a **regulação da estabilidade do RNAm**, pela retirada do Cap5' da cauda poli-A ou pela degradação de nucleotídeos, fazendo com que não ocorra a tradução da molécula.

E por fim, mesmo após a tradução existem controles pela **regulação da estabilidade da proteína**. Isso pode ocorrer para degradar proteínas envelhecidas ou para regular a atividade celular por meio da ubiquitinação, que marca a proteína que será degradada ou inativada por um complexo chamado proteossomo.

A ubiquitinação pode servir apenas como sinal para a proteína ser realocada na célula; as proteínas também podem ser ativadas ou desativadas por cofatores (vitaminas, por exemplo) e a **regulação do endereçamento de proteínas** pode alterar a atividade de cada uma delas. Peptídeos sinalizadores são os responsáveis por endereçar uma proteína recém-formada para seu destino, como por exemplo, para a mitocôndria, para o cloroplasto, ou para outra organela.

Regulação da expressão gênica em procaríotos

Nas bactérias e arqueas, em que o material genético encontrado no nucleóide não é protegido pela carioteca, inexistentes nesses seres, a expressão gênica ocorre de forma parecida com os eucariotos. Contudo, nos procaríotos só existe um tipo de RNA Polimerase, enquanto nos eucariotos existem três tipos. Além disso, a RNA Polimerase bacteriana não necessita de proteínas auxiliares para iniciar a transcrição do DNA.

Nos procaríotos também ocorre a presença de uma única sequência regulatória, geralmente próxima ao promotor da transcrição. Além de todos esses fatores, nos procaríotos o DNA está localizado em um único cromossomo circular e o organismo é unicelular, simplificando o controle da expressão gênica. Os genes de um procaríoto estão localizados em uma sequência nucleotídica chamada de **operon**, e têm basicamente um promotor (em que a RNA Polimerase se associa), uma região codificadora (que contém genes que serão codificados em proteínas) e um terminador, conforme Figura 3.17.

Figura 3.17 | Gene de um procaríoto



Fonte: elaborada pelo autor.

A RNA Polimerase se liga à região do promotor ou operador, que será o responsável por ativar ou reprimir a expressão daquele determinado gene, convertendo-o em um RNA mensageiro. Um operon pode expressar uma molécula de RNAm que codifica mais de uma proteína. Portanto, um mesmo operon tem mais de uma região codificadora, contudo são reguladas por um único promotor (organismos policistrônicos).



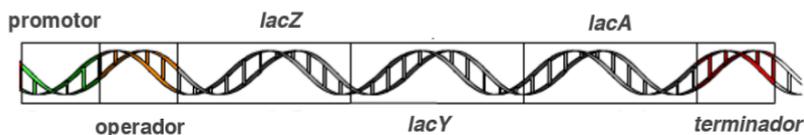
Assimile

Somente seres procaríotos são policistrônicos, o que ocasiona uma maior produção de proteínas com menor número de pares de base (pb). A bactéria *Escherichia coli* tem aproximadamente 5 mil pb e codifica 2 mil proteínas. O ser humano possui 3 bilhões de pb e codifica 27 mil proteínas.

O controle da expressão gênica nos procaríotos também pode ser feito pela maior produção ou degradação de RNAm. Dessa forma, um aumento na transcrição ampliará a produção de certa proteína, mas, sua degradação pode reduzir ou cessar a produção de determinada proteína.

Ativadores e **repressores** induzem ou reprimem a expressão gênica. Quando um ativador se liga a um determinado operador, há o aumento da transcrição desse gene. No entanto, o desligamento do ativador reduz sua atividade (regulação positiva). Quando ligados ao operador, os repressores reduzem ou inibem a transcrição e, se não se associam, a transcrição ocorre normalmente (regulação negativa). Existem cofatores que, quando ligados aos ativadores ou repressores, podem criar regulação por feedback, tornando os repressores aptos ou inaptos a se ligarem ao operador do operon. Um exemplo da regulação em um procaríoto é o operon *lac*, que ocorre na bactéria *E. coli*. É uma região gênica responsável por produzir proteínas relacionadas ao metabolismo do dissacarídeo lactose, em que pode ocorrer o controle negativo e positivo.

Figura 3.18 | O operon *lac* e seus genes



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Operon_lac#/media/File:Lac_operon1.png>. Acesso em: 21 nov. 2017.

O gene *lacZ* expressa informações para a proteínas β -galactosidase, que lisa, ou seja, quebra o dissacarídeo lactose em glicose e galactose. Já o Gene *lacY* codifica uma permease de membrana que bombeia a lactose para dentro da célula. O gene *lacA* codifica uma enzima que acetila β -galactosídeos.

Existe um gene anterior ao operador chamado *lacI*, que na ausência de lactose, codifica uma proteína repressora ligada ao operador e impede a ação da RNA Polimerase, o que bloqueia a expressão (controle negativo). Na presença de lactose, o repressor é inativado e o *lacI* não se expressa, assim a RNA Polimerase expressa o operon *lac*.

O controle positivo do operon *lac* ocorre em situações de diminuição da glicose na célula e na ativação da produção de 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMP cíclico ou cAMP), que por sua vez se associa a uma proteína CAP (Proteína ativadora de catabólito). O complexo cAMP+CAP se liga ao promotor do operon *lac*, induzindo uma maior expressão do gene. Dessa maneira, o procaríoto tem a possibilidade de usar a lactose como fonte de energia no lugar de glicose. Mas isso só ocorre quando não há glicose disponível, pois, nesse caso, a produção de cAMP é baixa.

Existem muitos mecanismos de controle epigenético e cascatas de reações que controlam a expressão de grande parte de nossos genes. Você conheceu nesta seção alguns dos principais processos de regulação, portanto, esse aprendizado lhe oferece uma base para buscar maiores informações sobre o assunto. Então, a partir do embasamento teórico assimilado até aqui, você será capaz de resolver nossos questionamentos iniciais. Boa sorte na aplicação do seu conhecimento.



O artigo a seguir detalha alguns dos processos epigenéticos e relaciona a regulação da expressão gênica ao câncer e às terapias a partir da aplicação desses processos.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: um novo campo da genética. **RUBS**, v.1, n.3, p.61-69, set. /dez. 2008. Disponível em: <http://www.colegiogregormendel.com.br/gm_colegio/pdf/2012/textos/3ano/biologia/8.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2017.

Sem medo de errar

Você tem um grande desafio à frente, uma vez que recebeu um convite para ministrar um curso sobre expressão gênica. Será necessário abordar assuntos sobre a epigenética, explicando como um zigoto dá origem a um organismo tão complexo e diferenciado. Como as células definem quais genes serão expressos e quais não serão? E o que são histonas, metilação, acetilação? Prepare um breve *briefing* (documento com informações básicas) que será convertido em uma apostila de seu curso, sobre os principais métodos de regulação da expressão gênica.

Um zigoto humano sadio tem uma célula com os 23 pares de cromossomos com a informação genética para se tornar qualquer célula. Conforme o desenvolvimento do organismo, as células formadas necessitam bloquear a expressão de vários genes e, ao mesmo tempo, induzir a expressão de outros com o auxílio de diversos processos de regulação da expressão desses genes.

Quando se trata de regulação da expressão gênica, sabe-se que ela pode ocorrer em sete fases distintas do Dogma Central da Biologia Molecular:

1. **Fase de transcrição.**
2. **Fase de processamento do RNAm em RNA maduro.**
3. **Degradação de RNAm em nucleotídeos.**
4. **Regulação da tradução.**
5. **Regulação do processamento de proteínas.**
6. **Degradação de proteínas.**

7. Endereçamento e transporte de proteínas.

A seguir, alguns dos principais exemplos de regulação da expressão gênica:

Compactação com histonas: o nível de condensação do material genético controla genes que serão expressos, garantindo ou impedindo a associação do complexo RNA Polimerase. O DNA nuclear está sempre associado às proteínas, compondo a cromatina. As histonas são proteínas alcalinas estáveis, ricas em aminoácidos arginina e lisina que enovelam o DNA, formando estruturas como o nucleossomo e, em estágio muito condensado, os cromossomos. Dessa forma, quando a fita de DNA não estiver enovelada nessas proteínas estará disponível para transcrição.

As histonas irão se abrir e permitir o processo com a ligação de radicais, diminuindo a interação das mesmas com o DNA. São processos conhecidos de ligação de radicais às histonas: a **acetilação**, a **ubiquitinação**, a **metilação**, a **fosforilação**, entre outros.

Regiões Controladoras de Locus (LCRs): são sequências que definem a abertura da cromatina. Uma LCR pode se ligar a um promotor de um gene, tornando uma determinada sequência ativa, bem como inativar as demais sequências.

Metilação do DNA: A ligação do radical metil na base nitrogenada citosina impede a associação da RNA Polimerase, silenciando o gene. Regiões com grande quantidade de citosina-guanina, chamadas de **ilhas CpG**, podem ser metiladas e impedir a transcrição de grandes trechos.

Splicing alternativo: o controle e alternância da retirada ou manutenção de íntrons e éxons pode fazer com que um mesmo gene possa codificar RNAm maduro diferentes e, conseqüentemente proteínas diferentes, sendo transcritas do mesmo gene.

Regulação por micro-RNAs ou miRNA: pequenas moléculas de ácido ribonucleico que se ligam à RNAm, reduzindo a expressão dessas moléculas ou até clivando o RNAm.

Regulação da estabilidade do RNAm: enzimas retiram o Cap5', a cauda poli-A ou até degradam nucleotídeos, fazendo com que não ocorra a tradução da molécula.

Regulação da estabilidade da proteína: a ubiquitinação de proteínas pode degradar ou inativar a molécula.

Regulação do endereçamento de proteínas: peptídeos sinalizadores podem controlar o destino de certas proteínas sintetizadas, controlando processos no organismo.

Todos esses processos são exemplos da regulação epigenética e devem constar em seu *briefing* para que atraia vários interessados pela relevância de conteúdo. Faça o seu e ensine seus estudantes.

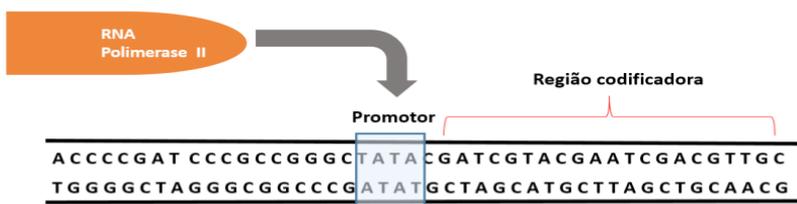
Avançando na prática

Para comer com alegria e não com alergia

Descrição da situação-problema

O melhoramento genético de plantas e animais depende muito do conhecimento básico dos processos de transcrição, tradução e regulação epigenética. Analise o trecho do código genético a seguir, que codifica uma proteína peculiar de uma leguminosa:

Figura 3.19 |Código genético a ser analisado



Fonte: elaborada pelo autor.

A fita superior codifica em seu gene uma proteína que causa alergia em muitas pessoas que ingerem esse legume, provocando fortes reações. Pensando em conquistar esse público, seu instituto deseja desenvolver uma variedade dessas leguminosas que não a produzam. Para isso, você deve pesquisar maneiras de modificar geneticamente a produção dessa proteína. Uma das formas é tentar realizar a inibição da expressão do gene que a codifica.

As análises preliminares da fita resultaram que 67,5% do pareamento de nucleotídeos ocorre entre citosina e guanina. Observando a região anterior ao promotor, qual controle epigenético seria mais adequado para reprimir a expressão gênica e impedir a ligação da RNA Polimerase? Por qual motivo você considera esse método o mais indicado? Considerando a porcentagem e o pareamento de nucleotídeos, qual será a porcentagem de cada base nitrogenada dos nucleotídeos no trecho de DNA em questão?

Resolução da situação-problema

O trecho em questão apresenta características de ilhas de citosina-guanina (**Ilhas CpG**), comumente inativadas pela **metilação da citosina**. Dessa maneira, o complexo da DNA polimerase não será capaz de transcrever o DNA e, conseqüentemente, não haverá síntese proteica do alergênico na leguminosa.

Sabendo que 67,5% dos nucleotídeos contêm as bases nitrogenadas citosina e guanina (C-T), o restante da fita (32,5%) terá o pareamento com as bases adenina e timina (A-T). Como o pareamento sempre se manterá idêntico ao longo da fita, em porcentagens individuais teremos os nucleotídeos da fita contendo:

- a) 33,75% de guanina (G)
- b) 33,75% de citosina (C)
- c) 16,25% de adenina (A)
- d) 16,25% de timina (T).

Faça valer a pena

1. O DNA dos eucariotos não é encontrado de forma livre no núcleo celular. Está associado à proteínas, podendo estar altamente condensado ou associado a poucas moléculas proteicas, na configuração de nucleossomos, unidade fundamental da cromatina. Quando não está sendo transcrito, o DNA dos eucariotos é mantido em uma cromatina muito condensada, chamada de cromossomo.

Na cromatina dos organismos eucariotos, um nucleossomo é composto basicamente de:

- a) RNA transportador e DNA.
- b) DNA e RNA mensageiro.
- c) Água e proteínas.
- d) DNA e RNA ribossômico.
- e) Histonas e DNA.

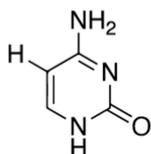
2. A expressão gênica em organismos procariotos foi amplamente estudada, especialmente em algumas espécies, como a bactéria *Escherichia coli*. A partir desses estudos, foram descobertos mecanismos altamente eficientes da expressão de operons, regiões do código genético que codificam proteínas de acordo com a demanda do organismo.

Assinale a alternativa que define corretamente o que é um operon, região presente no DNA procarioto.

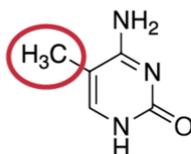
- a) É um conjunto de genes regulado por apenas um operador e um terminador, capaz de codificar várias proteínas com apenas um RNA mensageiro.
- b) É uma sequência gênica que regula a expressão de uma proteína específica, como o Operon Lac, que codifica a produção de lactose na célula bacteriana.
- c) Trata-se de genes envolvidos na transcrição de RNA mensageiro no núcleo da célula, que é enviado ao citoplasma para síntese proteica.
- d) É uma sequência proteômica codificada por um RNA mensageiro procarioto.
- e) É o conjunto de proteínas produzido por apenas um gene, também chamado de proteoma bacteriano.

3. Analise a figura a seguir que demonstra a metilação da base nitrogenada citosina, um dos compostos que formam os nucleotídeos do DNA. A adição do radical metil no carbono 5 da molécula altera sua estrutura e converte a citosina em 5-metilcitosina.

Figura 3.20 | Metilação da base nitrogenada citosina



Citosina



5-Metilcitosina

Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_methylation#/media/File:DNA_methylation.png>. Acesso em: 23 nov. 2017.

A respeito da reação de metilação disposta anteriormente, assinale a alternativa correta.

- a) A metilação de nucleotídeos citosina é um processo conhecido por indução da expressão gênica em eucariotos.
- b) A adição do radical metil converte o nucleotídeo em um composto energético, gerando energia para as mitocôndrias.
- c) A metilação de áreas ricas em citosina e guanina é um processo que ativa a transcrição e aumenta a catálise do complexo RNA Polimerase.
- d) O processo de metilação da citosina é regulatório, impedindo a transcrição dos nucleotídeos ou da associação da RNA Polimerase em áreas próximas ao promotor, como as ilhas CpG.
- e) A conversão da citosina em 5-metilcitosina é uma mutação comum em células cancerígenas, fazendo com que o organismo deixe de regular a expressão do gene.

Referências

EZKURDIA, I. et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. **Human Molecular Genetics**, v. 22, 2014. DOI: 10.1093/hmg/ddu309.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 740p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 376 p.

SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1412–1417, 2006. Doi:10.1073/pnas.0510310103.

Biologia molecular e suas aplicações

Convite ao estudo

Independentemente da sua dieta, você provavelmente já consumiu hoje algum produto que dependeu da aplicação da biologia molecular. A agropecuária dependeu de muita tecnologia para melhorar a produtividade e a eficiência na produção agrônômica e na criação de animais. Desde o início da agricultura neolítica, o homem já buscava escolher plantas e sementes mais produtivas, iniciou o cruzamento de plantas e a seleção de variedades e espécies para o cultivo. A biologia molecular otimizou esse processo, possibilitando colheitas mais resistentes a pragas e doenças, além de uma produção que atendesse a demanda mundial pelo consumo de alimentos.

Nesta última unidade, iremos trabalhar como os conhecimentos da biologia molecular podem ser utilizados na agronomia, em técnicas como a produção de organismos geneticamente modificados, clonagem, transgenia, identificação de pragas e doenças, entre outras técnicas. A engenharia genética é um ramo promissor, e trabalha com o estudo e manipulação de genes de um ser vivo. Esse ramo passou por relevantes avanços e descobertas na última metade do século XX, com pesquisas envolvendo organismos geneticamente modificados, produtos transgênicos etc. Nada seria possível sem a aplicação dos conhecimentos básicos da biologia molecular, o que inclui a compreensão acerca dos principais conceitos e definições referentes a biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula.

Iremos abordar mais profundamente sobre essa área assumindo nossa personagem da unidade: um pesquisador de um Instituto de Engenharia Genética, que utiliza as diversas técnicas de sua área para extração de DNA, análise de marcadores moleculares, desenvolvimento de organismos geneticamente modificados, otimização de protocolos, entre outras atividades.

Para atingir sucesso em suas pesquisas, você deve possuir conhecimento referentes a biologia celular e molecular, sendo capaz de identificar as células eucarióticas e procarióticas, o ciclo e diferenciação celular e a estrutura e fisiologia da célula, que inclui também o funcionamento e localização do seu genoma. Pensando nas habilidades necessárias para lhe tornar um ótimo profissional, construímos com você, em nossas unidades anteriores, um forte alicerce de conhecimento sobre os conceitos básicos da citologia, os diversos tipos de células e suas estruturas e evolução, além dos fundamentos da biologia celular. Mas, como todo esse conhecimento é aplicado na ciência? Nossa última unidade trará informações sobre a aplicação da biologia molecular. A Seção 4.1 abordará a aplicação da engenharia genética em organismos geneticamente modificados, clonagem, mapeamento genético, entre outros tópicos da biologia molecular aplicada. A Seção 4.2 traz os principais métodos de extração do DNA, bem como seus avanços e limitações. Fechando nosso ciclo de estudos, a Seção 4.3 tratará sobre bioética e biossegurança, propondo uma reflexão a respeito da ética na pesquisa, boas práticas laboratoriais, e as normas vigentes que regem a pesquisa e utilização da biologia molecular no Brasil.

Seção 4.1

Biologia molecular e suas aplicações

Diálogo aberto

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção agropecuária, com destaque na produção de açúcar, soja, milho, carne bovina, laranja, entre outros produtos. Se olharmos para trás, há três décadas o país não tinha posição de destaque nos líderes na exportação de produtos agro. Isso só foi possível com a aplicação de muita tecnologia nas lavouras, como melhoramento de plantas e animais, proteção de cultivos, análise mais eficiente de doenças e pragas etc. Essas técnicas são exemplos de aplicações da biologia molecular, tema da nossa atual seção, na qual trabalharemos tópicos como os organismos geneticamente modificados (OGM), clonagem, marcadores moleculares, sequenciamento e mapeamento genético e aplicações da genômica, bioinformática e o estudo da diversidade genética.

Nosso local de trabalho da unidade, o Instituto de Genética Molecular, recebe verbas para desenvolver uma nova pesquisa que busca realizar o mapeamento genético de uma planta que possui determinada proteína que causa doenças em insetos-praga quando ingerida. Contudo, não é uma planta de interesse comercial.

Em paralelo, as pragas agrícolas apresentam uma ameaça constante às plantações de grande interesse comercial, como soja, cana-de-açúcar, milho café, entre outras. Você precisa escrever um projeto para concorrer a tal verba e desenvolver pesquisas sobre esse tema em seu laboratório. Sendo assim, pense nas seguintes perguntas: haveria alguma utilidade prática dessa planta para auxiliar em outras culturas? Qual a utilidade de um mapeamento genético? Qual sua aplicação em outros organismos? Qual seria a utilidade de um PCR nesse contexto? Os genes da planta serão encontrados em que partes da célula?

Prepare um resumo de um projeto de pesquisa inserindo as informações básicas requisitadas, bem como sobre o mapeamento genético, explicando a justificativa de estudar a planta em questão. Inclua também exemplos de sucesso da aplicabilidade do uso de proteínas de outros organismos para a defesa fitossanitária.

Não pode faltar

Com o avanço das técnicas de engenharia genética, passamos a estudar a fundo a biologia molecular dos organismos do nosso planeta. As tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração permitem realizar o sequenciamento de milhões de pares de bases em um tempo muito menor que as técnicas anteriores. Genomas pequenos, como de bactérias, podem ser mapeados facilmente utilizando algumas plataformas, montando bibliotecas genômicas com as sequências nucleotídicas dos organismos de interesse. A **genômica** é a ciência que estuda o genoma dos indivíduos em sua totalidade. No ano de 1995, tivemos o primeiro genoma sequenciado com cerca de 1,8 Mb, pertencente à bactéria *Haemophilus influenzae*. Poucos anos depois, em 2001, já obtivemos os primeiros resultados do sequenciamento do genoma humano. Assim, a genômica pode ser dividida em três aspectos principais de estudo:

- A **genômica comparativa** analisa os genomas de espécies relacionados no cladograma evolutivo, investigando sequências conservadas para servir de guia no estudo da evolução e do funcionamento gênico.
- A **genômica funcional** utiliza técnicas moleculares para compreender processos de interação gênica, funções dos genes na célula, produção de proteínas e sua função biológica nos indivíduos, como por exemplo localizando genes de interesse.
- A **Bioinformática** engloba áreas como matemática, engenharia, estatística e genética, para criar ferramentas digitais para análise do grande fluxo de informações obtidas pelo sequenciamento de genomas e estudo de proteomas.

Somos descendentes de um mesmo ancestral comum, então, de onde vêm essas diferenças entre os indivíduos? A diversidade genética é consequência da variação biológica herdada através de anos de evolução, oriunda de trocas de genes na reprodução sexuada (*crossing over*), mutações nas sequências nucleotídicas, que podem ocorrer ao acaso ou durante a replicação do DNA, entre outros processos.

A variação do DNA pode gerar novas espécies, fenômeno chamado **especiação**. Mas, diferenças podem também ocorrer dentro de indivíduos da mesma espécie, fenômeno chamado **polimorfismo** ou **diversidade intraespecífica**. Dessa forma, indivíduos podem possuir diferenças no seu DNA (**genótipo**) e na expressão dos seus genes, como em sua morfologia, fisiologia, bioquímica e comportamento (**fenótipo**). A genômica estuda as diferenças genotípicas e fenotípicas entre os indivíduos, investigando o fluxo de genes entre as populações, também encontra genes e proteínas de interesse científico ou comercial que possam ser avaliadas e aplicadas em certas áreas, como na produção agrônômica e pecuária.



Assimile

As diferenças polimórficas são responsáveis pela vantagem de certos indivíduos na competição intraespecífica ou interespecífica. Esse fenômeno é a base da seleção natural e da evolução das espécies, prevista pela teoria Darwiniana, e complementada, posteriormente, pelos conceitos da genética (conhecido como Neodarwinismo).

A **variação genotípica** ocorre pela alteração do genoma de uma espécie, que é herdada à prole daquele ser vivo, sendo detectada por meio do sequenciamento de seus genes. A variação genética que é expressada e pode ser identificada é chamada de **variação fenotípica**, como características morfológicas, comportamentais, bioquímicas e fisiológicas.

Ao contrário do que muitos de nós podemos imaginar, os genomas de indivíduos são extremamente parecidos. A semelhança entre o genoma humano com o genoma de um chimpanzé é mais de 98% enquanto a diferença entre um indivíduo e outro da espécie humana se resume a pouco mais que 1250 pb (FIORAVANTI; PIVETTA, 2001). Os bonobos (*Pan paniscus*) são primatas com um parentesco semelhante aos chimpanzés, com cerca de 98,7% de semelhança genética. Mas, mesmo em mamíferos que consideramos parentes distantes, como os ratos, nossa semelhança é de 97,5% do genoma funcional (MURAL, et al., 2002).



Pouco mais de 1% de diferença genética separam os *Homo sapiens* de alguns primatas. De que seria capaz uma diferença ainda maior na evolução do DNA dos humanos? Seria ético desenvolver melhoramento genético em nossa própria espécie?

Os genomas de vários seres vivos estão disponíveis em bancos de dados públicos como o GenBank, mantido e administrado pelo *National Institutes of Health* dos Estados Unidos, que possui todas as sequências genômicas publicamente disponíveis. Mas como as sequências do mapeamento genético são obtidas? O ser humano por exemplo, possui 24 fileiras de pares de base (pb), considerando os 22 cromossomos autossômicos e os 2 cromossomos sexuais (X e Y). Como mapear as sequências nucleotídicas? Como se obter genomas completos de indivíduos?

Devemos realizar algumas etapas para o estudo. Primeiramente, temos que desnaturar a molécula do DNA, descondensar as fitas e clivar o genoma em várias sequências aleatórias. Com auxílio de **enzimas de restrição** (1); realizar o sequenciamento das sequências aleatórias (2); analisar com ferramentas computacionais as sequências em que há superposição de nucleotídeos, onde as sequências se sobrepõem, chamadas de **sequências contigs** (3); analisar a superposição dos pedaços maiores da fita até que todos os pequenos fragmentos sejam unificados, obtendo-se uma **sequência de consenso**, na qual há uma concordância entre os fragmentos e se obtém a montagem da fita completa de DNA (4).

Ao final desse processo, se obtém o mapeamento completo do genoma, lembrando que a montagem é a etapa mais complexa do sequenciamento, já que o ser humano, por exemplo, possui pouco mais de 3×10^9 pb. O sequenciamento deve ser repetido várias vezes, realizando várias leituras do sequenciamento, minimizando erros que prejudiquem a montagem e o mapeamento final.

Existem duas estratégias para sequenciar e montar o mapa de um genoma. O Sequenciamento *shotgun* de genoma inteiro (WGS) e o Sequenciamento de Clone Ordenado. Ambas estratégias se baseiam no sequenciamento de muitos clones de segmentos de DNA, que formam **bibliotecas genômicas** (que contém conjuntos

dos curtos segmentos dos genomas). Os segmentos são inseridos em cromossomos acessórios (cromossomos artificiais, plasmídeos bacterianos, vírus bacteriófagos, etc.), que também são chamados de **vetores**. A inserção de um DNA em um cromossomo ou plasmídeo, forma uma sequência chamada DNA recombinante ou rDNA.

O enfoque do método WGS é sequenciar os nucleotídeos primeiro e gerar o mapeamento do genoma depois. Portanto, sequências de fragmentos são geradas, sem saber seu *locus* no genoma do indivíduo, obtendo uma **biblioteca shotgun**. É o tipo de sequenciamento mais utilizado atualmente, com uma limitação crítica na análise de seus dados, dependente de algoritmos mais eficientes e precisos.

Já o método de Sequenciamento de Clone Ordenado funciona de maneira inversa. Primeiro, o Genoma é mapeado e depois sequenciado. É realizada uma triagem dos fragmentos clonados observando sua similaridade e tamanho após a clivagem com enzimas de restrição. A triagem é feita por eletroforese em gel de agarose, obtendo-se um mapa físico com a ordem dos clones de DNA. A sobreposição de clones contigs caracterizados vão compondo sequências maiores até que o número de clones contigs seja igual ao número de cromossomos, obtendo, dessa forma, um mapa físico completo. Após a obtenção desse mapa, um conjunto de clones, minimamente sobrepostos, englobam todo o genoma cromossômico, e esse conjunto é sequenciado.



Assimile

Uma técnica interessante para pesquisa genômica é a obtenção de cDNA (DNA complementar), sintetizado pela transcrição reversa de RNAm maduro (com os íntrons já retirados pelo *splicing*). Desta forma, sabemos qual a sequência nucleotídica que codifica determinada proteína.

Obtendo um mapeamento genético, ou sabendo o sequenciamento de um determinado gene de interesse, é possível realizar sua replicação por métodos *in vitro* pelo procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Lembra-se de como

esse processo é feito? Comentamos em nossa unidade passada sobre a **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**, processo feito em aparelhos denominados termocicladores. Vamos detalhar como esse processo ocorre. Para isso, utiliza-se uma variação termoestável da enzima DNA Polimerase, a *Taq Polimerase*, que possui esse nome por ser oriunda da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. Com a enzima que resiste a altas temperaturas, é possível realizar vários ciclos sem que ocorra a desnaturação da molécula. Vamos relembrar os ciclos que são feitos em um termociclador:

1. **Fase de desnaturação** – 94 a 96 °C: abre a dupla hélice do DNA expondo as fitas. O gene a ser copiado depende de um par de *primers* de RNA sintetizados quimicamente, contendo de 15 a 20 pb. A síntese também dependerá de nucleotídeos livres para a *Taq Polimerase* sintetizar a fita.

2. **Fase de hibridização ou anelamento** – 55 a 65 °C: a temperatura é reduzida para que os *primers* se liguem aos filamentos opostos de DNA e, a partir deles, a *Taq Polimerase* poderá iniciar a síntese das cópias do gene de interesse assim que for ativada.

3. **Fase de extensão** – 72 °C: a temperatura é elevada e a ação do DNA Polimerase *Taq Polimerase* é ativada. A partir dos *primers*, a enzima inicia a ligação dos nucleotídeos e realiza a síntese das fitas complementares. Os ciclos serão repetidos até que haja grande número de fitas replicadas. Em 25 ciclos, a fita é replicada 10⁶ vezes.

Com o advento do PCR, foi possível aumentar a eficiência da clonagem de fragmentos de DNA, realizar seu sequenciamento e estudar indivíduos geneticamente relacionados. Para esses e outros propósitos, pode-se utilizar os **marcadores moleculares**. Tratam-se de sequências específicas de DNA que codificam determinados fenótipos e são herdados geneticamente. Ao longo de um genoma, existe uma quantidade muito grande de polimorfismos no genoma dos indivíduos. A seguir, exemplificaremos alguns marcadores mais comumente utilizados:

RFLP, RAPD e AFLP: baseados na técnica de PCR, os marcadores moleculares do tipo *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) foram amplamente utilizados para estudos genéticos, gerando informações para os primeiros mapeamentos de espécies cultivadas, estudos

de diversidade e da função de determinados genes. Cada tipo apresenta vantagens e limitações.

SSR ou microssatélites: os marcadores do tipo *simple sequence repeat* (SSR) são sequências de até 6 nucleotídeos que se repetem ao longo de genomas eucarióticos. As regiões que se localizam ao lado das SSR são conservadas dentro de uma espécie, permitindo a síntese de *primers* entre 20 a 30 pb para amplificar esses marcadores. É possível analisar os polimorfismos no tamanho dos fragmentos amplificados, sendo úteis para construção de mapas genéticos em estudos de diversidade e para o melhoramento genético. É uma técnica de fácil execução, limitada pela dependência de *primers* SSR, aspecto negativo que vêm sendo superado com sequenciamentos em grande escala e bancos de dados públicos com a sequência de *primers* de espécies animais e vegetais.

ISSR: marcadores do tipo *inter simple sequence repeat* (ISSR) utilizam somente um *primer* baseado nas sequências dos microssatélites na extremidade 5' com alguns nucleotídeos adicionais na extremidade 3'. Os *primers* se associam dentro das repetições e amplificam as sequências entre os SSRs. É uma técnica alternativa diante da dificuldade de se obter *primers* específicos das SSR.

DARts: os marcadores do tipo *diversity arrays technology* (DARts) trabalham por meio da digestão de fragmentos de DNA que representam o genoma de um indivíduo por meio de duas enzimas de restrição. Após a digestão, são clonados e impressos em uma lâmina de microarranjo de DNA. A presença ou ausência do fragmento detectam se há ou não o polimorfismo. É uma técnica que pode ser utilizada em espécies que não foram sequenciadas e também pode gerar marcadores para espécies com genoma conhecido.

SNP e InDels: chamados de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), são as variações mais comuns no genoma de um indivíduo, portanto dependem do prévio sequenciamento. Ocorrem abundantemente e sofrem uma lenta taxa de mutação dentro das gerações. Polimorfismos gerados por pequenas inserções e deleções de um a três nucleotídeos são chamados de *InDels*. Os SNPs e os *InDels* fundamentam as variações alélicas nos indivíduos

e podem ser considerados marcadores, com amplas aplicações em mapeamentos de alta resolução.

Existe uma diversidade muito grande de marcadores moleculares, alguns com alta especificidade e variações das técnicas apresentadas anteriormente. Novas tecnologias de sequenciamento automatizadas dão origem a marcadores cada vez mais específicos, possibilitando estudos diretamente no gene de interesse. Dessa forma, a técnica de PCR se torna mais eficiente e com mais aplicações práticas.



Exemplificando

A utilização de marcadores pode ocorrer para caracterizar uma espécie ou variedade (análise de *fingerprint*). A lei de proteção de cultivares (Lei nº 9.456/1997) exige que uma variedade de planta seja identificada geneticamente para seu registro e proteção. Marcadores moleculares como o RAPD podem ser utilizados para gerar o padrão (*fingerprint*) da variedade por meio dos padrões de bandas em eletroforese.

De maneira geral, os marcadores moleculares são ferramentas muito eficientes para o estudo da sistemática, sinalização de genes de resistência a pragas e doenças, avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento e seleção genética, mapeamento genético, testes de pureza genética, reconstituição de *pedigrees*, testes preventivos de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em uma região, entre outras aplicações. Podemos dividi-los em dois padrões:

- Marcadores moleculares de evolução lenta: sofrem poucas alterações com o tempo, portanto, indivíduos de uma mesma família não apresentarão diferenças nas sequências. São adequados para estudos de filogenia, desde que envolvam indivíduos de diferentes espécies ou táxons, como: RFLPs e SNPs.
- Marcadores moleculares de evolução rápida: sofrem uma alta taxa de alteração, então, indivíduos com alto grau de parentesco apresentarão diferenças genéticas. É adequado para o estudo de espécies, populações e famílias, por exemplo RAPDs e microssatélites (SSRs).

Contudo, há limitações do uso de marcadores moleculares, principalmente as que estão envolvidas com o alto custo da técnica e a complexidade de elaboração dos procedimentos na maioria dos marcadores disponíveis. Por outro lado, novos tipos de marcadores estão sendo desenvolvidos, trazendo maior perspectiva de uso dessa tecnologia em um futuro próximo.

Com tantas informações, você deve estar se perguntando como processar tamanha quantidade de sequências, marcadores moleculares e analisar os diferentes resultados obtidos por técnicas cada vez mais específicas. Entramos então no campo da **bioinformática**, uma área em pleno desenvolvimento que alia os campos da ciência da computação, informática, biologia, genética, matemática, programação, estatística, engenharia, tecnologia da informação, entre outras.

A bioinformática possui os objetivos de desenvolver novas ferramentas para uso e gestão das informações genômicas, como também criar novos algoritmos ou análises estatísticas para avaliar as sequências gênicas, montar sequências genômicas, determinar as relações entre grandes conjuntos de dados obtidos pelos métodos de sequenciamento, localizar genes dentro de um determinado genoma, localizar mutações, entre várias outras funcionalidades. Um dos maiores polos de desenvolvimento da bioinformática no Brasil é o Laboratório de Bioinformática (LBI) do Instituto de Computação da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas).

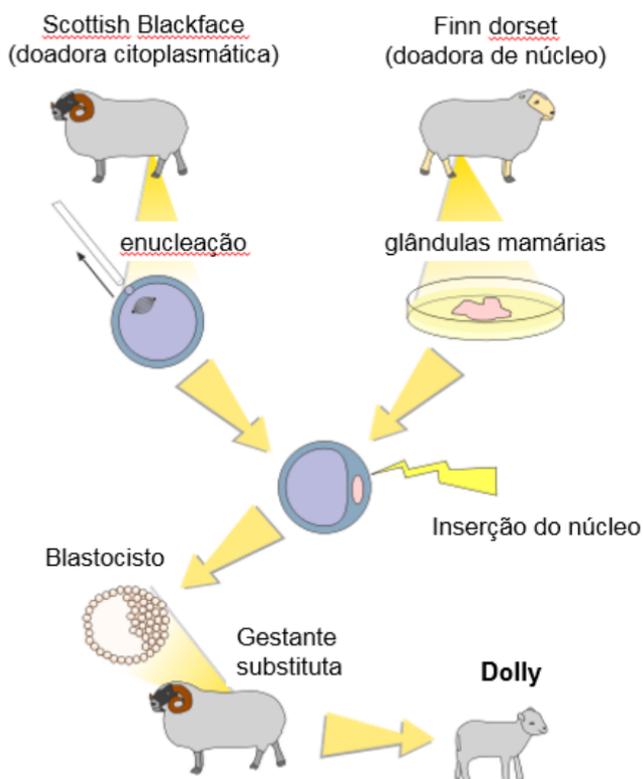
Por meio da análise dos dados obtidos nas pesquisas de base, um novo campo surgiu a partir dos anos 70, a **engenharia genética**. A manipulação e recombinação dos genes de indivíduos de mesma espécie ou até de espécies diferentes envolve conceitos multidisciplinares, como conhecimentos de genética, biologia celular e molecular, bioquímica, embriologia etc. A engenharia genética possui aplicações em técnicas como o uso de células tronco, a clonagem e a criação de organismos geneticamente modificados (OGM).

Clonagem

A clonagem é um processo de produção de indivíduos geneticamente idênticos. A biotecnologia realiza a clonagem reprodutiva para obtenção de clonar animais pelo uso de células

embrionárias. A técnica é feita pela **transferência nuclear da célula somática (SCNT)**. Um dos processos mais conhecidos é a clonagem da ovelha Dolly, que foi o primeiro mamífero clonado utilizando o processo SCNT, no ano de 1996, por pesquisadores da Universidade de Edimburgo, na Escócia. O processo é mostrado na Figura 4.1.

Figura 4.1| Clonagem da ovelha Dolly



Fonte: adaptada de <[https://en.wikipedia.org/wiki/Dolly_\(sheep\)#/media/File:Dolly_clone.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Dolly_(sheep)#/media/File:Dolly_clone.svg)>. Acesso em: 12 mar. 2018.

O processo utilizou três ovelhas, uma doadora de ovócito, cujo núcleo celular foi retirado (uma ovelha da raça Scottish blackface); uma ovelha doadora de célula somática, da qual se retirou os cromossomos de uma célula de glândula mamária congelada (raça finn dorset) que foram introduzidos no ovócito. Uma última ovelha (raça Scottish blackface) foi utilizada como gestante por substituição

(barriga de aluguel) para a implantação do óvulo. Dolly morreu precocemente aos 6 anos com doenças pulmonares e problemas de artrite, casos que animais clonados estão sujeitos. Contudo, o núcleo somático se mostrou capaz de gerar células embrionárias totipotentes e estimulou o desenvolvimento de outras tecnologias.



Assimile

Técnicas mais recentes de transferência nuclear para fertilização *in vitro* realizaram, com sucesso, a doação de DNA de 3 indivíduos diferentes. Um óvulo da mãe, espermatozoides do pai, e mitocôndrias (que contém cerca de 3% do DNA celular) de uma terceira doadora (NEW SCIENTIST, 2016).

A clonagem humana é proibida no Brasil (Lei nº 11.105/2005) no entanto, a clonagem de outros animais é permitida. Existem projetos de clonagem de animais em alto risco de extinção, como o lobo-guará, o mico-leão-preto e a onça-pintada. Na área da pecuária é uma técnica de amplo uso comercial na melhoria de rebanhos, e já existem pesquisas para criação de animais transgênicos. O custo médio inicial da geração de uma vaca ou touro *in vitro* é de R\$ 58 mil, para os equinos, geralmente R\$ 100 mil (O GLOBO, 2016).

A clonagem terapêutica também é proibida por lei no Brasil. No processo, o núcleo de um doador é introduzido em um óvulo enucleado (com núcleo retirado) para gerar células-tronco, que irão gerar tecidos idênticos ao doador, sem possibilidade de rejeição. Atualmente, é permitida a pesquisa com células-tronco embrionárias, desde que produzidas por fertilização *in vitro* e não utilizadas no procedimento, sendo também inviáveis e congeladas por 3 anos ou mais. Há também a necessidade de consentimento dos progenitores e da aprovação de um comitê de ética em pesquisa.

Organismos geneticamente modificados (OGM)

Você se lembra qual a diferença entre um OGM e um transgênico? Quando um organismo recebe modificações em seu genoma, sem receber material genético de organismos exógenos, ele recebe a nomenclatura de OGM. Quando um indivíduo recebe material

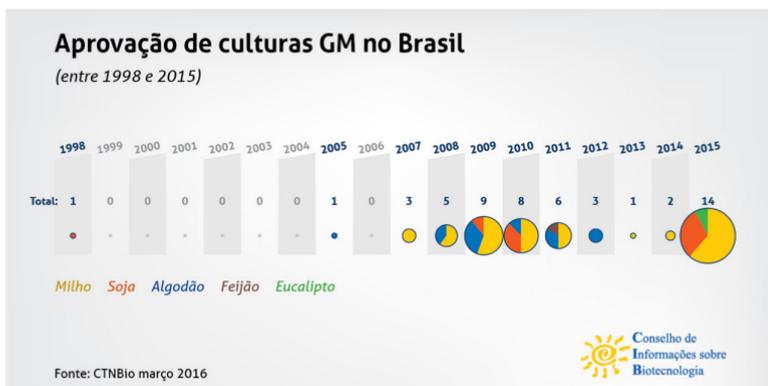
genético proveniente de um ser vivo de outra espécie, ele também é um OGM, mas é chamado de organismo transgênico.

O Brasil cultivou 44,2 milhões de hectares de transgênicos em 2015, apresentando o maior crescimento do mundo, mas ainda ocupa a segunda posição de maior área plantada (1º lugar: EUA, com 70,9 mi de ha). Na safra deste mesmo ano, a adoção de transgênicos no Brasil atingiu 94,2% no plantio de soja, 84,6% de milho e 73,3% de algodão (CIB, 2016).

Os genes inseridos nessas plantas são, principalmente, de resistência de cultivos à pragas e herbicidas. O gene *Bt*, oriundo da bactéria *Bacillus thuringiensis* produz proteínas Cry. Quando ingeridas, essas proteínas causam a morte de insetos, em especial, da ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas), mas também podem promover mortalidade de dípteros, coleópteros, himenópteros além de outros. Com as plantas emitindo essas proteínas, o uso de inseticidas químicos é reduzido e em alguns casos, dispensável.

Outro gene largamente utilizado é o RR® (*Roundup Ready*, propriedade da Monsanto) que garante às plantas a resistência contra o herbicida glifosato, permitindo a aplicação do agrotóxico nas lavouras para controlar plantas daninhas e não prejudicar o cultivo de interesse. O número de aprovações de cultivos com OGM no Brasil oscilou nos últimos anos, mas atingiu seu ápice no último levantamento feito em 2015 (Figura 4.2). As culturas transgênicas no Brasil incluem hoje, além da soja, milho e algodão, o cultivo de feijão e eucalipto.

Figura 4.2 | Aprovação de culturas geneticamente modificadas no Brasil



Fonte: <<http://cib.org.br/brasil-lidera-crescimento-mundial-da-adocao-de-transgenicos/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

A biologia molecular possui ferramentas para auxiliar uma gama muito grande de áreas das ciências de base e aplicada, como visto com a agropecuária, como também a bioquímica, farmácia, medicina etc. Nossa seção trouxe uma breve introdução sobre o assunto, embasando você para estudos mais profundos na sua área de interesse. Busque maiores informações sobre esse tema tão extenso e com grande potencial para as próximas décadas, que promete ter um grande crescimento e campos de trabalho, principalmente na análise de dados. Com os conhecimentos que possui, você é capaz de resolver nossos questionamentos. Vamos revisar e colocá-los em prática.



Pesquise mais

Conheça um pouco mais sobre os marcadores moleculares e sua aplicação prática na agropecuária: GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, v. 30, n. 253, nov. dez., p.86-95, 2009. Disponível em: <<http://www.epamig.br/download/informe-agropecuario-253-biotecnologia-2009/>> . Acesso em: 12 mar. 2018.

Sem medo de errar

Realizando seu trabalho no Instituto de Genética Molecular, é sua incumbência fazer o mapeamento genético de uma planta com a característica de produzir uma proteína que causa doenças em insetos-praga quando ingerida. Como você sabe, pragas agrícolas são uma das principais responsáveis pelas perdas na produção em cultivos de grande interesse comercial, como soja, cana-de-açúcar, milho, café, entre outras.

Você é capaz de escrever um projeto aliando sua incumbência para uma aplicação prática de sua pesquisa? Qual a utilidade de um mapeamento genético? Qual sua aplicação em outros organismos? Qual seria a utilidade de um termociclador nesse contexto? Os genes da planta serão encontrados em quais partes da célula?

Prepare um resumo de uma página de um projeto de pesquisa inserindo informações básicas sobre o mapeamento genético, explicando a justificativa de estudar a planta em questão e da aplicação dos dados que podem ser obtidos. Inclua também exemplos de sucesso da aplicabilidade do uso de proteínas de outros organismos para a defesa fitossanitária que você aprendeu nesta seção ou em estudos anteriores.

Nesta seção, você compreendeu um pouco mais sobre o material genético presente nos organismos, conhecendo a estrutura e a função do DNA e RNA. Você observou em seções anteriores que o DNA dos organismos eucariotos se localiza em três locais em um organismo vegetal: no núcleo, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. Sua pesquisa busca sequenciar o genoma de uma planta de que possui a capacidade de sintetizar proteínas que causam doenças em insetos que predam essa planta. O mapeamento ou sequenciamento genético dessa espécie seria a maneira de encontrar os genes responsáveis pela produção desses compostos.

Aplicando os resultados de sua pesquisa, esses genes poderão ser inseridos em plantas de interesse comercial, como por exemplo soja, café, milho e cana-de-açúcar, diminuindo a necessidade de aplicação de inseticidas para controle de pragas, favorecendo o meio ambiente e reduzindo a possibilidade de resíduos de agrotóxicos nos alimentos.

A utilização de aparelhos como termocicladores, que realizam

a PCR, é indispensável nesse tipo de pesquisa. Esses equipamentos são necessários para sintetizar e replicar moléculas de DNA, tanto na pesquisa, sequenciamento genético e desenvolvimento de organismos geneticamente modificados, como os transgênicos.

Exemplos de sucesso nessa área são o desenvolvimento do arroz vermelho, que recebe genes para codificar vitamina A, que está ausente no arroz comum. Outro exemplo visto em seções passadas são plantas que recebem genes da espécie de bactéria *Bacillus thuringiensis* (proteínas *Cry*), que provocam a mortalidade de diversas espécies de lagartas. O gene foi inserido em plantas como soja e milho e já são utilizados no Brasil.

Prepare um breve resumo com essas informações, dissertando sobre o objetivo do seu projeto, as possíveis aplicações e relembrando os casos de sucesso. Bom trabalho para você!

Avançando na prática

Mapa do problema

Descrição da situação-problema

O conhecimento sobre o genoma bacteriano é importante para desenvolver estratégias para combater certas doenças. O Brasil já realizou uma grande pesquisa para o sequenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da **clorose variegada dos citros** (CVC), chamada popularmente de amarelinho. Com o estudo, foi possível investigar o desencadeamento da doença nas plantas e reduzir sua disseminação, principalmente no estado de São Paulo.

Você conhece as bases para o sequenciamento de um ser vivo como uma bactéria. Imagine-se no papel de um pesquisador que participa de um projeto para o sequenciamento e mapeamento de uma bactéria responsável por uma doença em bovinos, a *Brucella abortus*, causadora da Brucelose. O projeto necessita de apoio e uma das maneiras de chamar atenção é levando o conhecimento até o público. Você foi encarregado de explicar os métodos de sequenciamento à uma revista de divulgação científica muito popular entre os estudantes e deve responder ao jornalista: quais os dois métodos possíveis de sequenciamento? O que é um mapeamento genético? Qual é o método mais utilizado atualmente? Como se

analisa uma quantidade tão grande de dados como milhões de pares de base?

Resolução da situação-problema

Existem dois métodos para o sequenciamento e mapeamento genético, o sequenciamento *shotgun* de genoma inteiro (WGS) e o Sequenciamento de Clone Ordenado.

O objetivo é gerar muitos clones de segmentos de DNA, que são inseridos em cromossomos acessórios, como plasmídeos bacterianos, formando uma molécula de DNA recombinante chamada de vetor.

O método WGS primeiro sequencia os nucleotídeos e depois gera o mapeamento do genoma. Assim, inicialmente, fragmentos serão gerados, sem saber seu *locus* no genoma do indivíduo, obtendo uma **biblioteca *shotgun***. É o tipo de sequenciamento mais utilizado atualmente com uma limitação crítica na análise de seus dados, dependente de algoritmos mais eficientes e precisos.

Outro método utilizado, o de Sequenciamento de Clone Ordenado, funciona de maneira inversa. Primeiro, o Genoma é mapeado e depois sequenciado. É realizada uma triagem dos fragmentos clonados observando sua similaridade e tamanho após a clivagem com enzimas de restrição. A triagem é feita por eletroforese em gel de agarose, obtendo-se um mapa físico com a ordem dos clones de DNA. Existem sequências que irão se sobrepor, chamadas de contigs. As sobreposições dessas sequências vão formando outras maiores, até que o número de clones contigs seja igual ao número de cromossomos, obtendo, dessa forma, um mapa físico completo.

Esses dois métodos são utilizados auxiliados pela bioinformática, que possui ferramentas e algoritmos para analisar a grande quantidade de dados gerada no sequenciamento e irão montar o genoma da bactéria.

Faça valer a pena

1. O Brasil é o segundo maior produtor de alimentos transgênicos, estando atrás somente dos Estados Unidos da América. Entre as culturas produzidas, se destacam, principalmente, os cultivos de soja e milho. Os genes inseridos

nessas plantas geram características como resistência contra pragas e determinados herbicidas.

Para ser considerado um organismo transgênico, a planta ou animal deve conter:

- a) Pelo menos um gene deletado do seu genoma.
- b) Sequências de RNAm que não são codificadas em proteínas.
- c) Genes oriundos de organismos de outra espécie, como bactérias, por exemplo.
- d) Proteínas produzidas a parte da transcriptase reversa.
- e) Ribossomos e polirribossomos produtores de proteínas funcionais.

2. Gêmeos univitelinos são geneticamente idênticos e oriundos a partir da fecundação de um mesmo óvulo que, após formar o zigoto, se divide em dois no ambiente intrauterino. Contudo, a aparência física nem sempre será tão parecida. As impressões digitais, a quantidade de melanina presente na pele, respostas à estímulos ambientais diversos podem diferenciar os irmãos monozigóticos.

Gêmeos idênticos ou monozigóticos apresentam o DNA idêntico, mas podem apresentar por exemplo, cor de pele diferentes porque:

- a) Possuem o mesmo fenótipo, mas genótipos diferentes.
- b) Expressam o mesmo proteoma, mas RNAm diferentes.
- c) Possuem o mesmo genótipo, mas fenótipos diferentes.
- d) Apresentam genótipos e fenótipos distintos entre si.
- e) Possuem genótipo e genótipo idênticos.

3. A genética de populações investiga a frequência alélica de diversos tipos de organismos, em função de alterações causadas por mutações, fluxo gênico, deriva genética e seleção natural, fazendo parte da base da síntese evolutiva moderna. O uso de marcadores moleculares nesse contexto é muito útil para avaliar polimorfismos em diferentes níveis taxonômicos.

Para o estudo de genética de populações, investigando diferenças entre indivíduos de mesma espécie, é indicado utilizar marcadores moleculares:

- a) de evolução lenta, como microssatélites e RAPD.
- b) de evolução rápida, como RFLPs e SNPs.
- c) de evolução lenta, como RAPDs e SSR (microssatélites).

d) de evolução lenta, como RFLPs e SNPs.

e) de evolução rápida, como RAPDs e SSR (microssatélites).

Seção 4.2

Técnicas de extração do DNA

Diálogo aberto

Como pesquisador do Instituto de Genética Molecular, você lida diariamente com procedimentos e protocolos de análise de DNA, RNA e proteínas. Existem diversas metodologias, que são adequadas para determinados tipos de amostras, bem como desafios diários no isolamento do DNA.

Seu laboratório recebe um pedido da Secretaria Estadual do Meio Ambiente para realizar a amplificação de genes de animais silvestres, seu sequenciamento e análise de diversidade genética de populações.

O estudo deve ser conduzido para analisar a diversidade genética de diversas populações de cervídeos do bioma do cerrado e por serem animais silvestres, não será permitido deslocar os animais e mantê-los em cativeiro para as análises, portanto, você deve ir a campo para retirar as amostras, causando o mínimo possível de estresse ao animal.

Que tipo de amostragem você sugere para analisar o genoma dessas espécies? Você propõe algum cuidado para amostrar os tecidos dos animais? Como trata-se de um número muito grande de espécimes, as amostras devem ser acondicionadas? Quais as etapas gerais de um processo de extração e purificação das amostras obtidas?

Escreva um breve relatório para a Secretaria Estadual de Meio Ambiente informando seus procedimentos, bem como qual protocolo e cuidados você utilizará para lidar com o material genético dos animais.

Não pode faltar

O conhecimento sobre a genética dos diversos seres vivos nos possibilitou grandes avanços na medicina, agronomia, ecologia, evolução, entre outras áreas do conhecimento. Você acompanhou

conosco, nas seções anteriores, diversas aplicações da genômica e como são feitos estudos de sequenciamento e mapeamento genético. Mas, você refletiu como é o início de todo esse estudo? Como se retira o DNA de uma célula? Nesta seção, abordaremos quais são as técnicas e protocolos de extração de DNA de diversos indivíduos.

A extração do DNA dos cromossomos ou plasmídeos é a etapa inicial do estudo da genômica e, atualmente, existem diversas técnicas disponíveis para realizar esse procedimento. Inicialmente, a **extração do DNA** é feita pela lise das membranas e exteriorização da molécula. Em seguida, é necessária uma etapa de **purificação**, em que ocorre a separação do DNA de outros componentes celulares, como enzimas (principalmente DNAses, que degradam DNA), proteínas, lipídeos, entre outras moléculas.

Não existe um protocolo único que sirva para qualquer tipo de organismo e possa ser utilizado para qualquer extração, por isso, dependemos de adaptações de protocolos, e diferentes técnicas de acordo com o organismo ou o tipo de célula que estamos estudando. De maneira geral, existem quatro etapas no isolamento do DNA:

(1) As células são cultivadas in vitro ou amostradas do indivíduo.

(2) As membranas das células sofrem lise, liberando seu conteúdo interno.

(3) O conteúdo celular é tratado com reagentes/enzimas e seus componentes são desnaturados, digeridos e removidos, restando somente o DNA.

(4) O DNA é precipitado por componentes químicos e centrifugações e mantido em solução aquosa.

Após esses procedimentos, pode-se realizar estudos de sequenciamento, melhoramento genético, testes de paternidade, estudo de marcadores moleculares etc. Iremos, a seguir, detalhar protocolos de extração de DNA em célula vegetal e animal, descrevendo suas etapas e explicando a ação dos componentes utilizados em cada uma, com o propósito de que você compreenda o objetivo do processo, a finalidade dos reagentes em um protocolo de extração, e que você possa adaptar os protocolos já existentes de acordo com a necessidade.

Extração de DNA de células vegetais

A coleta de amostras e o cuidado com o material recolhido é a etapa inicial e de muita importância, as amostras de células vegetais e animais podem se deteriorar facilmente. Os tecidos devem ser acondicionados adequadamente até os procedimentos de extração. A lavagem com água destilada, higienização e esterilização superficial e refrigeração de -20 a -80°C são recomendadas para amostras de tecidos vegetais e vegetais, permitindo sua conservação para extração posterior.

Aliofilização dos tecidos traz grande vantagem no armazenamento da amostra a longo prazo, mas, em contrapartida, possui alto custo. O uso de luvas e máscara (equipamentos de proteção individual – EPI) para manusear amostras também é indicado, já que os fluidos corporais contêm **nucleases**, enzimas que degradam ácidos nucleicos. Com as amostras prontas, os protocolos de extração podem ser conduzidos.

A extração a seguir é baseada no protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987) para isolamento de DNA de célula vegetal. O método é fundamentado na utilização do detergente brometo cetiltrimetilamônio (**CTAB**), sendo um dos mais utilizados para extração de DNA vegetal. Adaptações nesse protocolo são comumente utilizadas para solucionar problemas intrínsecos do organismo analisado. Os materiais utilizados são:

- Amostra de tecido foliar desidratada.
- Pistilo e almofariz.
- Nitrogênio líquido.
- Solução tampão de extração constituído de: **CTAB** 2%; NaCl 1,4 M; trisaminometano hidrocloreto (**Tris HCl**) 100nM em pH 8,0; ácido etilenodiaminotetracético (**EDTA**) 20 nM em pH 8,0; polivinilpirrolidona (**PVP**) 2,5%.
- β -mercaptoetanol 2%; clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (**CIA**).
- Tubos *ependorf* de 2 mL e 1,5 mL.
- Proteinase K.
- Etanol 100% e 70%.
- Tris-EDTA (**TE**) com RNase (5mL de TE com 5 μL de RNase).
- Centrífuga.

- Balança de precisão.
- Vidrarias (pipetas e béqueres).
- Banho-maria.
- Refrigerador.
- Capela de exaustão.

Procedimentos:

- Inicialmente, pese de 100 a 300 mg do tecido vegetal desidratado e transfira a amostra para um almofariz. Adicione o nitrogênio líquido até cobrir a amostra e macere cuidadosamente com o pistilo. O nitrogênio irá sublimar, restando apenas a amostra do tecido vegetal macerada, formada por um pó fino e seco. Em caso de tecido fresco, será necessária uma amostra maior.

- Leve imediatamente o macerado para a capela de onde serão acrescentados 2 mL da solução tampão de extração, 4 μ L de β -mercaptoetanol e 70 μ L de proteinase K.

A solução tampão contém componentes como o Tris HCl e EDTA, que mantêm o pH em torno de 8,0, proporcionando ação das enzimas de interesse e impedindo a ação de DNAses que poderiam degradar o DNA de interesse. O CTAB é outro componente com função de promover a lise das membranas da célula, rompendo a cadeia fosfolipídica e liberando o conteúdo intracelular no meio. Já o NaCl auxilia na precipitação do DNA ao final do processo e diminui a contaminação da amostra por polissacarídeos.

O PVP e o β -mercaptoetanol evitam que polifenóis se liguem ao DNA. Polifenóis são liberados durante a lise celular e se ligam irreversivelmente à molécula de DNA, o que posteriormente impede a digestão por enzimas e o uso da técnica de PCR. O PVP também auxilia na purificação da amostra, pois provoca a desnaturação de proteínas.

- Após acrescentar PVP e β -mercaptoetanol, homogeneizar a amostra com o pistilo e transferir para tubos *ependorf* de 2 mL. A amostra deve ser mantida em banho-maria a 65 °C por 1 hora, agitando esporadicamente para homogeneizar o conteúdo. O aumento da temperatura potencializa a ação dos reagentes. Após o período em banho-maria, retirar a amostra e aguardar seu resfriamento.

- Adicionar 60% do volume da solução com CIA, um solvente orgânico que remove resíduos de polissacarídeos, lipídios e

proteínas. A amostra deve ser homogeneizada e centrifugada por 15 minutos em uma velocidade de 13.000 rpm.

- Após a centrifugação, será possível visualizar duas fases na amostra. O DNA está no sobrenadante, enquanto os resíduos celulares estarão na fase inferior. Com o auxílio de uma pipeta, o sobrenadante deve ser recolhido cuidadosamente e transferido para um tubo *ependorf* de 1,5 ml. Será possível observar uma massa concentrada de material genético no interior do líquido, chamada de *pellet* de DNA. Uma dica é sempre deixar algum volume do sobrenadante no tubo, evitando contaminar a amostra com resíduos celulares.



Assimile

Um dos erros mais comuns no isolamento de DNA vegetal, desde o ensino básico ao superior, é confundir a molécula de DNA com pectinas, componentes da parede celular vegetal. O DNA forma filamentos finíssimos (2 nm), enquanto a pectina possui aparência gelatinosa, com frequente formação de bolhas.

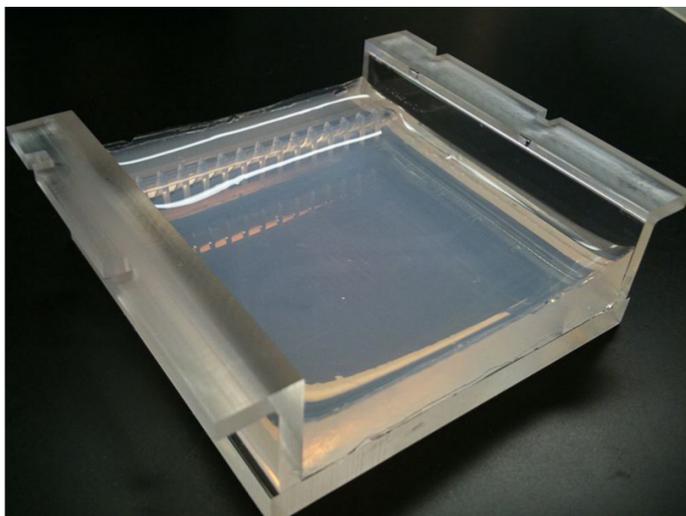
- Acondicionar a amostra em refrigerador $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em um período que irá variar de acordo com o tipo de tecido utilizado. Na literatura, encontramos vários tempos de refrigeração que podem variar de 1 a 12 horas. Após a refrigeração, a amostra deve ser centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, o que deve fazer o DNA precipitar.

- Após centrifugar, leve a amostra à uma capela de exaustão e descarte o sobrenadante em um becker, deixando somente o *pellet* de DNA no tubo *ependorf*. Aguarde o *pellet* secar e adicione 300 μL de etanol 70%. Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante. O processo deve ser repetido novamente com etanol 70% e, posteriormente, com etanol 100%. Esse processo precipita o DNA e o etanol elimina os resíduos ainda existentes na amostra.

- Aguardar o *pellet* de DNA secar e ressuspender o *pellet* em uma solução de 50 a 100 μL de TE RNase, mantendo em banho-maria por $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Após esse procedimento, aguardar a amostra esfriar e acondicionar em refrigerador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Ao final do processo, se obtém uma amostra purificada de DNA, que deve ser quantificada por espectrofotometria ou eletroforese em gel de agarose (Figura 4.3).

Figura 4.3. Bandeja com gel de agarose, utilizado para quantificação e análise de fragmentos de DNA por eletroforese



Fonte: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose#/media/File:Two_percent_Agarose_Gel_in_Borate_Buffer_cast_in_a_Gel_Tray_\(Front,_angled\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose#/media/File:Two_percent_Agarose_Gel_in_Borate_Buffer_cast_in_a_Gel_Tray_(Front,_angled).jpg)>. Acesso em: 12 mar. 2018.

Ao final da quantificação, devemos realizar a PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, que já abordamos em seções anteriores. A amostra de DNA deverá ser mantida em meio aquoso para que a reação possa ocorrer. Para a PCR será necessário:

- Água deionizada.
- Os quatro tipos de dNTPs (dioxinucleotídeos trifosfatos), que serão o substrato para a síntese da nova fita pela DNA Polimerase.
- *Primers* de RNA que se ligarão à sequência de DNA a ser amplificada. Os *primers* são confeccionados para se associarem à extremidade 3' de cada fita do DNA.
- Enzima *Taq* Polimerase (DNA Polimerase termoestável), que permanecerá ativa após sucessivos aquecimentos.

- Íons Mg^{2+} , cofator essencial para o funcionamento da DNA Polimerase.
- Solução tampão para manter o pH do meio.

Os reagentes devem ser inseridos em um tubo *ependorf*, que será colocado em um termociclador para que a PCR ocorra. Devem ser realizados vários ciclos a fim de se obter uma grande quantidade de clones do DNA para análise. A quantidade de ciclos e a temperatura utilizada no termociclador devem ser ajustadas de acordo com a quantidade de amostra inicial de DNA, ou o tipo de análise a ser feita.



Refleta

Todo material utilizado nos procedimentos de extração de DNA deve ser novo e estéril. O que aconteceria se uma pequena fração de DNA contaminante estivesse presente em um tubo reutilizado?

Extração de DNA de células animais

Em células animais, outros protocolos são utilizados. Atualmente, é comum a utilização de kits de extração comerciais, já contendo todos os reagentes necessários e os procedimentos para utilização e obtenção de DNA purificado. Cuidados com o acondicionamento, higienização e manuseio são essenciais, semelhante aos cuidados com as amostras vegetais.

Um dos protocolos mais comuns na rotina laboratorial é a extração de DNA do tecido sanguíneo. Existem diversos kits comerciais que podem ser adaptados a uma grande diversidade de organismos, que geram amostras puras e adequadas para fins de diagnóstico na amplificação por PCR.

Na amostragem de tecido sanguíneo, são utilizados anticoagulantes como o citrato de sódio e o EDTA. Nesses casos, o anticoagulante heparina não é indicado, já que inibe a PCR. O sangue colhido pode ser acondicionado até sete dias em refrigeração a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em maior período a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O protocolo a seguir é utilizado pela EMBRAPA para análise de amostras de sangue com pequeno volume, baseado no protocolo

proposto por Olerup & Zetterquist (1992), com algumas adaptações. Em comparação com o protocolo anterior, aqui é utilizado o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) ao invés de CTAB para lisar as membranas celulares. Os materiais utilizados são:

- Solução A (tampão de hemólise) para cada amostra de 250 ml: 250 μ L Tris HCl 1M em pH 7,0; 250 μ L de MgCl₂ 0,5 M; NaCl 5 M; H₂O ultrapura (q.s.p. 25 ml).

- Solução B para cada amostra de 500 μ L: 5 μ L de Tris HCl 1M; 10 μ L de NaCl 5 M; 10 μ L de EDTA 0,5 M em pH 8,0; 12,5 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 20%; 2 μ L de proteinase K e 460,5 μ L de H₂O ultrapura.

- Solução Tampão TE: Tris HCl 10 nM em pH 7,4 ou 7,5 ou 8,0; EDTA 1nM.

- Solução de RNase (10mg/mL): 10 mg de RNase, Tris HCl 10 nM em pH 7,5, NaCl 15 nM;

- Etanol 70% e 100%; refrigerados a 5°C.

- Vidrarias (béqueres e pipetas).

- Centrifuga com refrigeração, agitador tipo *vortex*, balança de precisão, banho-maria.

- Parafilm® e papel absorvente.

- Refrigerador e estufa de incubação (tipo B.O.D.).

- Capela de exaustão.

- Tubos *eppendorf*.



Assimile

O termo q.s.p. em química é uma abreviação para o termo em latim *Quantum Satis*, que significa quantidade suficiente para.

Procedimentos:

- 1) Colher sangue em tubos com anticoagulante EDTA, ajustar o volume com solução salina (NaCl 0,9 M) e centrifugar por 5 minutos as 390 g, descartando o plasma cuidadosamente para não retirar os leucócitos.

- 2) Promover a lise de eritrócitos com 10 ml da solução A, misturando o tubo no agitador ou por inversão. Após a lise, centrifugar

por 10 minutos as 700 g a 4 °C e após, dispensar o sobrenadante em um Becker. Se o *pellet* obtido no precipitado for muito pequeno, realizar nova centrifugação.

3) Suspender novamente o *pellet* de DNA na solução A (5 ml), tampando o tubo com Parafilm® para evitar derramamento ou contaminação. Misturar em agitador ou por inversão e centrifugar a 2000 rpm por 10 min a 4 °C.

4) Descartar o sobrenadante e repetir a lavagem da amostra como do item 3 até obter somente os leucócitos.

5) Ressuspender o *pellet* de DNA em 500 µL da solução A e transferir para tubos *ependorf* de 1,5 ml e centrifugar por 1 minuto as 16.000 g, e após, descartar o sobrenadante, o *pellet* obtido pode ser acondicionado a -20 °C ou em -80 °C por vários meses.

6) Para purificação do DNA, ressuspenda-o em 500 µL da solução B e misture no agitador, desintegrando a estrutura do *pellet*. Após agitar, manter em banho-maria a 55 °C de 4 a 6 horas, isso dissolverá o *pellet*.

7) Após a incubação, ajustar o volume para 760 µL com tampão TE e adicionar 240 µL de NaCl 5 M. Após ajustado o volume, incubar por 15 minutos em gelo.

8) Agitar os tubos por inversão até observar a formação de coágulos proteicos. Centrifugar por 15 minutos as 16.000 g e dividir o sobrenadante em dois novos tubos, inserindo 500 µL do sobrenadante em cada um.

9) Manter em banho-maria por 37 °C e adicionar 1ml de etanol 100% resfriado a 5 °C, invertendo o tubo repetidas vezes. Após o processo, centrifugar por 15 minutos as 16.000 g novamente. Ao final, secar cuidadosamente o centrifugado em papel absorvente.

10) Lavar com 500 µL de etanol 70% resfriado a 5 °C e revolver o tubo para frente e para trás. Centrifugar por 5 minutos as 16.000 g. Descartar o sobrenadante e aguardar a secagem da amostra. Adicionar 250 µL de tampão TE e Solução de RNase (10 µL por ml de amostra) e incubar por 1 hora a 37 °C. Ao final do processo, haverá uma amostra purificada do DNA dos leucócitos do sangue.

O uso de materiais plásticos é necessário para se obter uma amostra adequada, pois ele não possui afinidade com o DNA.

Materiais de vidro, por exemplo, podem adsorver moléculas de DNA na presença de alguns sais e prejudicar a extração. Outro gargalo do processo é a obtenção de amostras puras e livres de contaminações, essenciais para amplificação e geração de clones de DNA, além dos cuidados na amostragem e procedimentos, é importante a existência de uma sala ou laboratório exclusivo para fins de extração de DNA.



Exemplificando

Uma das grandes dificuldades da extração e purificação de DNA é a presença de material genético de outros organismos. Um exemplo é a extração de DNA de sangue bovino para analisar a presença de parasitas. Na amostra, haverá a presença do DNA bovino e dos pequenos DNAs de microrganismos presentes na amostra, como bactérias e vírus.

A adaptação de protocolos é muito comum e existem muitas publicações detalhando a metodologia da extração de DNA de diversos organismos e tecidos. Os kits comerciais também agilizam o processo e possuem um ótimo custo benefício. A prática em laboratórios de biologia molecular possibilita a adoção de novos métodos de extração e uma maior compreensão dos procedimentos e reagentes e seus similares disponíveis. As técnicas de extração e purificação sofrem constantes mudanças e evoluções, por isso, o profissional dessa área deve se manter atualizado nas novas tecnologias e protocolos disponíveis.



Pesquise mais

Este documento da Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) aborda alguns métodos da extração de DNA de diversas amostras. Veja se você reconhece as principais semelhanças e diferenças com os métodos abordados nesta seção.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.** São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste. 2007. 38p. Disponível em:

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

Sem medo de errar

Seu laboratório de genética recebe um pedido da Secretaria Estadual do Meio Ambiente para auxiliar em um estudo de genômica de cervídeos, animais silvestres do bioma cerrado. Contudo, não será permitido deslocar os animais e mantê-los em cativeiro para realizar as pesquisas.

Que tipo de amostragem você sugere para analisar o genoma dessas espécies? Você propõe algum cuidado para amostrar os tecidos dos animais? Como trata-se de um número muito grande de espécimes, as amostras devem ser acondicionadas? Quais etapas gerais de um processo de extração e purificação das amostras obtidas?

Prepare um breve relatório para a Secretaria Estadual de Meio Ambiente informando seus procedimentos, detalhando qual protocolo e cuidados você utilizará para lidar com o material genético dos animais.

A amostragem mais adequada para os animais silvestres será a retirada de amostras de sangue, que poderá ser feita em campo, sem a necessidade de levar o animal para laboratório, causando o mínimo de estresse possível. Os cuidados devem ser tomados desde o uso de EPIs, como luvas e máscaras para não contaminar a amostra. Após feita a amostragem, por se tratar de um número muito grande de espécimes analisadas, o ideal é acondicionar as amostras em refrigeração, mantendo-a adequada por mais tempo. Outra possibilidade é liofilizar a amostra, o que necessitaria um maior investimento.

Um protocolo utilizado para extração e purificação de amostras de sangue é o proposto por Olerup & Zetterquist (1992), que precisa de um baixo volume de amostras de tecido sanguíneo. Contudo, qualquer protocolo possuirá quatro etapas no isolamento e purificação do DNA:

(1) as células são cultivadas *in vitro* ou extraídas de uma amostra do indivíduo.

(2) as células sofrem lise, liberando seu conteúdo interno.

(3) o conteúdo celular é tratado com reagentes/enzimas e seus componentes são desnaturados, digeridos e removidos, restando somente o DNA.

(4) o DNA é precipitado por componentes químicos e centrifugações e mantido em solução aquosa.

Com esses dados, é possível escrever um relatório para a Secretaria Estadual de Meio Ambiente, detalhando qual é a metodologia do projeto a ser seguido. Boa sorte com seus trabalhos.

Avançando na prática

Indo a fundo na solução

Descrição da situação-problema

Você, como chefe do laboratório de genética, facilitou o trabalho de seus estagiários, mestrandos e doutorandos em genética e montou alguns protocolos de extração de DNA vegetal, como o proposto por Doyle & Doyle (1987). Observando algumas fases do protocolo, um estudante vem com algumas dúvidas sobre o uso dos reagentes e dos equipamentos utilizados. Ele questiona:

Para que serve o Tris HCl e o EDTA na solução tampão?

Por que devo adicionar NaCl? Qual a ação do PVP e o β -mercaptoetanol? O que são polifenóis? Por que colocamos a amostra em banho-maria? Quanto tempo devo deixar a amostra?

Qual a função da solução com CIA? O que acontece se eu pular esta etapa?

Qual a função das centrifugações e as sucessivas lavagens com etanol 100% e 70%?

O estudante se demonstra bem instigado em entender as etapas do protocolo, e somente com uma boa base sobre

extração e purificação de DNA será possível sanar tamanha curiosidade. Você consegue ajudá-lo? Responda às questões levantadas pelo seu estudante.

Resolução da situação-problema

Os componentes da solução tampão possuem funções diversas, agindo em conjunto e garantindo o sucesso da extração. Componentes como o Tris HCl e EDTA mantêm o pH em torno de 8,0, inativando a ação de DNAses (que degradariam a molécula de DNA) e proporcionando ação das enzimas de interesse. Já a adição de NaCl auxilia a precipitação do DNA ao final do processo, reduzindo a contaminação da amostra por polissacarídeos.

O PVP e o β -mercaptoetanol têm o papel de impedir a ligação irreversível de polifenóis ao DNA. Os polifenóis são compostos liberados durante a lise celular e sua ligação ao material genético impede que ocorra o processo de PCR posteriormente. Além disso, o PVP auxilia na purificação da amostra, pois desnatura proteínas.

Utilizamos o banho-maria neste protocolo, deixando a amostra a 65 °C por 1 hora, pois o aumento da temperatura potencializa a ação dos reagentes.

Completamos o volume da solução com CIA, um solvente orgânico que remove resíduos de polissacarídeos, lipídios e proteínas. Se essa etapa não for feita, a amostra poderá conter resíduos, ocasionando erro nos resultados adiante.

Por fim, as sucessivas centrifugações e lavagens com etanol 70 e 100% fazem com que o DNA seja precipitado e que o etanol elimine os resíduos ainda existentes na amostra.

Faça valer a pena

1. Atualmente, existem diversas técnicas disponíveis para realizar o isolamento de moléculas de DNA para análise. Inicialmente, ocorre o processo de _____ do DNA, por meio da lise das membranas e exteriorização da molécula. Em seguida, é necessária uma etapa de _____, em que ocorre a separação do DNA de outros componentes celulares, como enzimas (principalmente DNAses, que degradam DNA), proteínas, lipídeos, entre outras moléculas.

Assinale a alternativa que possui os respectivos termos que preenchem adequadamente as lacunas.

- a) purificação e extração.
- b) síntese e separação.
- c) extração e purificação.
- d) replicação e purificação.
- e) purificação e hibridização.

2. A extração e purificação de DNA são processos guiados por protocolos detalhados e que podem ser adaptados de acordo com a espécie analisada. Detergentes como o SDS - Solução de dodecilsulfato de sódio e o CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio, são reagentes que costumam fazer parte do protocolo de extração de DNA de células eucarióticas.

Os reagentes SDS e CTAB são importantes no processo de extração de DNA pois promovem:

- a) O tamponamento da solução em pH adequado.
- b) A lise das membranas celulares, exteriorizando o DNA.
- c) A degradação de DNAses, enzimas que degradam DNA.
- d) A inativação da DNA Polimerase, que duplica as moléculas de DNA.
- e) A associação de *primers* de RNA específicos na cadeia nucleotídica de interesse.

3. Observe as etapas da extração e purificação de Ácido Desoxirribonucleico:

- A) O conteúdo celular é tratado com reagentes/enzimas e seus componentes são desnaturados, digeridos e removidos, restando somente o DNA.
- B) As células sofrem lise, liberando seu conteúdo interno.
- C) O DNA é precipitado por componentes químicos e centrifugações e mantido em solução aquosa.
- D) As células são cultivadas *in vitro* ou extraídas de uma amostra do indivíduo.

A sequência correta das etapas que um processo de extração e purificação de DNA obedece é:

- a) A, B, C, D.
- b) B, C, A, D.
- c) C, D, D, B.
- d) D, B, A, C.
- e) D, C, A, B.

Seção 4.3

Bioética e Biossegurança

Diálogo aberto

O Instituto de Genética Molecular desenvolve mais atividades além da pesquisa. A clonagem e fertilização *in vitro* de bovinos é uma das principais atividades que geram renda ao Instituto, e o sucesso na realização dessas pesquisas gerou interesse de investidores internacionais.

O seu laboratório deseja iniciar uma nova ala que inclui uma linha de pesquisa com células-tronco embrionárias humanas, com ênfase na fertilização *in vitro*. O capital para construção e instalação desse novo departamento pode vir desses investidores. Contudo, os investidores estrangeiros desejam saber os trâmites legais dessas atividades no país antes de aplicarem dinheiro no instituto.

Eles fizeram diversas questões que são relevantes para a continuidade do projeto e o possível investimento no país: as normas para pesquisa com embriões humanos são as mesmas para embriões animais? É legal a pesquisa com embriões humanos no país? Os embriões podem ser comprados pelo laboratório por meio de doadores anônimos? A qual órgão o Instituto deve responder para desenvolver tais atividades de pesquisa? Existe alguma lei brasileira que trata da ética de experimentação com embriões ou células-tronco humanas? Quais os crimes previstos pela legislação quando se lida com engenharia genética?

Prepare um documento relatando aos investidores a quais normas o instituto deverá estar subordinado, sanando também as demais dúvidas dos pesquisadores. Você sabe responder tais questionamentos? Conhece as normas de biossegurança e ética aplicadas à pesquisa? Nesta seção, abordaremos mais profundamente sobre o assunto, que é frequente alvo de polêmicas e discussões.

Legislação aplicada à biossegurança

A engenharia genética e suas aplicações trouxeram muitas inovações para a pesquisa de base e também para a aplicada. Esse fato fez com que houvesse a necessidade de novas legislações acerca desse tema tão amplo. No Brasil, somente no ano de 2005, houve uma lei específica para organismos geneticamente modificados e seus derivados, estabelecendo normas e mecanismos de fiscalização. Estamos falando da Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, conhecida como Lei de Biossegurança. Essa lei estabelece importantes normas relacionadas a construção, cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, pesquisa, comercialização, consumo, liberação no meio ambiente, e descarte de OGM – organismos geneticamente modificados (art. 1º). Essa lei também criou o **Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS)** e reestruturou a **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)**.

E o que faz a CTNBio? Trata-se de uma instituição de caráter consultivo e deliberativo, vinculado ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, com função de instância decisória a respeito de organismos transgênicos. É composta por 27 membros que devem ser brasileiros com conhecimento notório na área, com titulação mínima de doutor, representantes da comunidade acadêmica (das áreas de meio ambiente; animal; vegetal e saúde humana), dos Ministérios (Ministérios da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; Meio Ambiente; Desenvolvimento Social e Agrário; Saúde; Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Indústria, Comércio e Serviços; Trabalho; Defesa; e Relações Exteriores) e por membros da sociedade civil. Existem também 27 membros suplentes, totalizando 54 membros no Conselho. O presidente tem mandato de 2 anos e é designado pelo Ministro da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.

Nas votações para liberação de produtos transgênicos, são necessários 14 votos favoráveis para aprovação. Além disso, o Conselho delibera sobre assuntos a respeito de biotecnologia, bioética entre outros.

A Lei nº 11.105/2005 (art. 14) atribui a CTNBio as funções de:



- I. Estabelecer normas para pesquisas com OGM e seus derivados e a pesquisas relacionadas;
- II. Estabelecer critérios de monitoramento de risco e avaliação de OGM e derivados;
- III. Realizar a avaliação de risco em projetos com OGM;
- IV. Estabelecer os mecanismos de funcionamento das CIBio – Comissões Internas de Biossegurança, ligadas às instituições de pesquisa científica, ensino, desenvolvimento tecnológico e inovação industrial ligados aos OGM;
- V. Deliberar requisitos para autorização de funcionamento de laboratórios, empresas ou instituições ligadas aos OGM e derivados;
- VI. Manter relações com instituições ligadas à biossegurança de OGM e derivados;
- VII. Incumbir-se da autorização, cadastramento e acompanhamento de instituições ligadas ao uso e pesquisa de OGM, como também autorizar a importação de OGM e derivados para pesquisa;
- VIII. Apoiar tecnicamente e assessorar o CNBS na formulação da Política Nacional de Biossegurança – PNB;
- IX. Emitir Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para instituições;
- X. Emitir decisões técnicas sobre OGM e derivados, no âmbito da pesquisa e comércio, incluindo restrições no uso e grau de periculosidade;
- XI. Classificar os OGM de acordo com seu risco;
- XII. Emitir resoluções normativas a respeito dos OGM;
- XIII. Acompanhar os órgãos de fiscalização e prevenção de acidentes com OGM e derivados;
- XIV. Divulgar no Diário Oficial da União todos os pareceres e processos em andamento e que forem submetidos;
- XV. Identificar potenciais riscos ambientais e para saúde humana no uso de OGM e derivados;
- XVI. Reavaliar suas decisões técnicas por solicitações de membros ou órgãos de registro e fiscalização, desde que fundamentados em fatos científicos;
- XVII. Propor a realização de pesquisas sobre OGM e biossegurança;
- XVIII. Enviar proposta de seu regimento interno ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações.

O CNBS é um órgão composto por 11 ministros de Estado e é presidido pelo Ministério da Casa Civil. Sua função é avaliar, no contexto socioeconômico, a liberação de organismos transgênicos no Brasil. Contudo, essa atribuição não ocorre na prática, fazendo com que o CTNBio seja o órgão mais importante na instância dos organismos geneticamente modificados.

A Lei nº 11.105/2005 também regulamenta algumas práticas ligadas à engenharia genética (art. 6º), baseada no **princípio da precaução**, um princípio do direito que busca evitar qualquer risco desconhecido de dano ao meio ambiente e saúde, proibindo assim as seguintes atividades:



- I. A clonagem humana;
- II. A engenharia genética em células germinativas humanas (espermatozoides e óvulos), zigotos e embriões humanos, manipulando seu genoma e características, por exemplo;
- III. Implementação de projeto relacionados a OGM sem que haja registro e acompanhamento pelos órgãos competentes;
- IV. Engenharia genética ou modificação *in vitro* do DNA e RNA em organismos vivos em desacordo com as normas da lei;
- V. Destruição ou descarte de OGM em desacordo com a legislação;
- VI. Liberação de OGM sem o parecer técnico favorável do CTNBio ou sem a aprovação do CNBS;
- VII. O uso, comércio, registro, patenteamento e licenciamento de tecnologias genéticas de restrição do uso, que inclui a geração de plantas geneticamente modificadas com estruturas reprodutivas estéreis.



Refleta

A cláusula VII do artigo 6º proíbe a produção de plantas que gerem sementes estéreis. Apesar disso, existe um projeto de lei (PL 1117/2015 de autoria do Dep. Alceu Moreira – PMDB/RS) que pretende regulamentar o uso de plantas com sementes estéreis. Você acha que o agricultor deve pagar pelas sementes produzidas pelas multinacionais a cada plantio?

Apesar de proibir o uso e pesquisa com células-tronco geradas a partir de clonagem de indivíduos, essa Lei permite o uso de células-tronco embrionárias para fins de pesquisa e terapia (art. 5º), desde que sejam oriundas de processos de fertilização *in vitro* de embriões não utilizados no processo, atendendo às condições de serem obtidas de embriões inviáveis ou de embriões congelados há 3 anos ou mais. Em ambos os casos, é proibida a comercialização das células e é necessário o consentimento dos doadores dos gametas. As instituições envolvidas na pesquisa e terapia também devem submeter seus projetos aos órgãos competentes de bioética e avaliação.



Assimile

A Lei de Biossegurança teve sua constitucionalidade julgada pelo Supremo Tribunal Federal, por meio de uma Ação Direta de Inconstitucionalidade nº 3.510, movida pelo Procurador Geral da República. Foi julgado se a lei violava o art. 5º da Constituição Federal de 1988 (que prevê o direito à vida). A Lei nº 11.105/2005 foi considerada constitucional, julgando a ação improcedente.

Alguns crimes são previstos pela Lei de Biossegurança, em seus artigos, como utilizar embriões humanos em desacordo com a lei (art. 24); a engenharia genética em células germinativas, zigotos e embriões humanos (art. 25); a clonagem humana (art. 26); o descarte ou liberação de OGM no meio ambiente em desacordo com as normas do CTNBio e órgãos responsáveis (art. 27); utilizar, comercializar, registrar, patentear e licenciar tecnologias genéticas de restrição de uso (art. 28) e realizar em desacordo com as normas do CTNBio e órgãos responsáveis, as atividades de armazenamento, transporte, comercialização, importação e exportação de OGM (art. 29).

A respeito de alimentos transgênicos, o art. 40 traz uma importante norma reservada aos fabricantes e consumidores de alimentos que são destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM. Esses alimentos devem possuir a informação contida em seus rótulos, conforme regulamento. O Decreto nº 4.680/2003 obriga empresas que

comercializam produtos com mais de 1% da matéria prima oriunda de transgênicos a identificá-los com o símbolo "T" no interior de um triângulo amarelo (figura). O consumidor deve também ser informado sobre a espécie doadora do gene nos ingredientes.

Figura 4.4 | Símbolo dos produtos transgênicos adotado no Brasil



Fonte: <<http://embalagensustentavel.com.br/wp-content/uploads/2011/09/transgenicos.jpg>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

Contudo, um projeto de lei avança no senado para desobrigar os fabricantes de informar a existência de OGM nos produtos. Se a concentração de OGM nos produtos for menos que 1%, não haverá a obrigação da rotulagem. Em caso de concentração maior que 1%, a informação deve estar contida no rótulo, mas sem o tradicional símbolo com a letra "T". No caso, a informação deve estar contida textualmente com o tamanho de letra de 1 milímetro e sem a necessidade de informar o organismo doador do gene.

A Lei de Biossegurança entrou em vigor trazendo diversas discussões em torno da bioética das pesquisas genéticas, estabelecendo limites para a engenharia genética. Como observado, no Brasil não é permitido realizar modificações em laboratório para alterar fenótipos, como o sexo, aparência dos olhos ou cabelos, assim como também não é permitida a clonagem de seres humanos. Mesmo a utilização de células embrionárias gerou muita polêmica, principalmente em torno da questão de quando uma vida se inicia.

Apesar da proibição de alteração dos fenótipos, a seleção de características é comum em procedimentos de fertilização *in vitro*. Após a fecundação artificial, há a formação de vários embriões, dos quais são feitas retiradas de uma célula. Esse processo, chamado de microbiópsia, possibilita diagnosticar algumas doenças genéticas e determinar o sexo do bebê. A escolha do sexo muitas vezes é determinante, como em casos de casais com predisposição à Doença muscular de Duchenne ou a hemofilia. Como a doença se manifesta em bebês do sexo masculino, os casais têm a possibilidade de eliminar a probabilidade de obter filhos com a doença selecionando embriões do sexo feminino.

A fertilização *in vitro* também gera discussões sobre a idade que uma mulher pode gerar filhos. Regulada no Brasil desde 1992, a geração de “bebês de profeta” não prevê uma idade limite para as mulheres se submeterem ao método. Nosso código de ética é baseado em países como Estados Unidos, França e Itália. Existem casos polêmicos como o do médico italiano Severino Antinori, que realiza o procedimento em mulheres acima dos 60 anos e que desejam a gravidez tardia, assunto que gera discussões em torno das perspectivas que uma mulher senil pode oferecer à uma criança ou adolescente, além das complicações médicas em uma gravidez nesse período da vida, que podem comprometer e colocar em risco a vida da mulher.

A baixa oferta de óvulos gerou a busca por doadores e também por sua obtenção em fetos abortados ou mulheres mortas. São questões complicadas e que podem gerar consequências, até agora, desconhecidas, como problemas psicológicos em crianças que são geneticamente filhas de mulheres que nunca vieram a nascer, ou não estão mais vivas. O princípio da precaução, no qual se baseia a Lei de Biossegurança, busca justamente evitar que os riscos desconhecidos aconteçam, que acabam se aplicando tanto ao meio ambiente como também ao bem-estar dos cidadãos.

Por outro lado, a engenharia genética possibilita progressos até então considerados improváveis pela medicina, tais como o tratamento de doenças neurodegenerativas, geração de tecidos que não são regenerados pelo corpo, como neurônios na medula óssea de pacientes paraplégicos e tetraplégicos. Após o avanço contra infecções pela descoberta dos antibióticos e a grande luta pelo

fim das doenças parasitárias em regiões tropicais e subtropicais, as doenças genéticas são a próxima barreira da ciência. Esses estudos são baseados em pesquisas com células-tronco embrionárias que, no Brasil, dependem de embriões provenientes de procedimentos de fertilização *in vitro*.

A pesquisa no Brasil caminha para um destino muito positivo. As técnicas de fertilização *in vitro* e manipulação genética buscam melhorar o diagnóstico e prevenção de doenças genéticas, com estudos que investigam a posição de determinados genes e sua importância na causa e tratamento de doenças. A biologia molecular é aplicável na detecção de diversas doenças, inclusive no início da gestação, possibilitando prever que problemas a criança poderá desenvolver. Na agropecuária, a técnica de clonagem é usada para produção de animais e plantas, gerando cópias exatas de organismos com características desejáveis, como maior produção de sementes ou o maior ganho de peso por um animal.



Exemplificando

A anemia falciforme e a fibrose cística do pâncreas são exemplos de doenças detectáveis por meio de microbiópsias em embriões. Se as células analisadas forem saudáveis, ocorre o prosseguimento da fertilização *in vitro*. No mesmo processo, é possível escolher o sexo do bebê pela análise do cariótipo.

Ainda no ramo agrônomo, recentemente, ressurgiu o debate em torno do pagamento de *royalties* às multinacionais produtoras de sementes para plantio. O Projeto de Lei 827/2015 de autoria do Deputado Dilceu Sperafico (PP), divide a bancada ruralista, por impedir que os agricultores familiares guardem parte de sua produção para plantio, instituindo propriedade intelectual sobre as sementes. Dessa forma, o agricultor deve pagar novamente para adquirir as sementes. O projeto altera a Lei nº 9.456/1997 (Lei de proteção de cultivares) e fere o Tratado Internacional sobre Recursos Filogenéticos para Alimentação e Agricultura da FAO (Food and Agriculture Organization), assinado em 2002 pelo Brasil, e promulgado em 2008. É previsto que o PL 827/2015 siga para votação em plenário no final de 2017.

As grandes invenções sempre dependem do seu uso devido ou indevido. Basta estudarmos nosso passado, não tão distante, e observarmos a desilusão de Santos Dumont ao ver sua maior realização ser utilizada para bombardear cidades, ou a energia atômica sendo utilizada para a criação de bombas que devastaram cidades como Hiroshima e Nagasaki. Os avanços da engenharia genética não estarão indiferentes aos interesses dos mal-intencionados e dependem do apoio das pesquisas sérias que são realizadas no Brasil ou internacionalmente.

O conhecimento sobre as técnicas e objetivos da pesquisa são inerentes para a formação de um pensamento crítico a respeito desse tema. Existem diversos casos discutidos em artigos e periódicos na literatura. Busque se informar sobre exemplos de casos e debater abertamente sobre o assunto, ouvindo as demais opiniões e não construindo um ideal enviesado. A construção da ética, em qualquer área científica, é sempre o melhor caminho, defronte ao controle estatal ou legislativo que frequentemente se encontrará em uma posição defasada diante do avanço rápido e dinâmico da ciência.

Boas práticas de laboratório

Tão importante como ser um profissional responsável eticamente, é possuir conhecimento sobre como realizar seus procedimentos laboratoriais com segurança e eficiência. Por isso, separamos um espaço nesta última seção para abordar as boas práticas de laboratório. Inicialmente, devemos lembrar que cada laboratório possui suas peculiaridades, métodos, práticas e cuidados, sendo as práticas adaptáveis a cada tipo ou grau de periculosidade do laboratório ou pesquisa. Contudo, algumas práticas são básicas para cumprir o objetivo de diminuir os riscos do ambiente de laboratório e são chamadas de Boas Práticas de Laboratório (BPL).

As BPL incluem ações como o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e equipamentos de proteção coletiva (EPCs); organização e higienização adequada do ambiente de trabalho, higiene pessoal, entre outras. A seguir, temos um quadro com as principais BPL, baseadas na Norma Regulamentadora nº 32 do Ministério do Trabalho (NR 32 - Segurança e Saúde No Trabalho em Serviços De Saúde):

Quadro 4.1 | Principais boas práticas laboratoriais.

| | |
|---|--|
| Higiene adequada do ambiente laboral, com boa iluminação e bem sinalizado. | Manual de biossegurança e protocolos à disposição dos trabalhadores. |
| Produtos e reagentes devidamente identificados e organizados. | Capacitação dos funcionários a respeito da periculosidade e uso do laboratório. |
| Ambientes adequados para equipamentos de risco (autoclaves, estufas etc.). | Fácil acesso às Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). |
| Uso correto de EPIs e EPCs, com devido treinamento, quantidade e manutenção. | Não preparar, comer ou beber alimentos no laboratório; não pipetar com a boca. |
| Utilizar jaleco ou avental somente no laboratório (Lei Estadual nº 14.466/2011). | Evitar levar as mãos às mucosas (boca, nariz, olhos, ouvidos). |
| Não utilizar colares, anéis, brincos, <i>piercings</i> , pulseiras e acessórios em geral. | Usar luvas ao manipular materiais de risco, retirando-as ao final da utilização. |
| Utilizar a cabine biológica/ capela de exaustão quando necessário. | Evitar trabalhar sozinho. |
| Lavar corretamente as mãos. | Descartar os materiais adequadamente. |

Fonte: adaptado de <<http://www.trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR32.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

Esperamos que com nossa seção final você se sinta mais preparado para adentrar em um laboratório, conhecendo os conceitos básicos da Biologia Celular e Molecular, seus fundamentos e principais aplicações no cotidiano de sua profissão. Busque sempre ampliar seu leque de conhecimento, iniciando pelas áreas de seu maior interesse. Nosso objetivo é que, com o alicerce de informações do nosso material, você possa se aprofundar e tornar-se um profissional competente. Vamos testar a nossa competência mais uma vez? Voltaremos aos nossos questionamentos iniciais para avaliar sua evolução após esta seção.



Conheça o texto na íntegra da Lei de Biossegurança e analise seu conteúdo:

BRASIL. **Lei nº 11.105 de 24 de março de 2015.** Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm>. Acesso em: 13 mar. 2018.

Sem medo de errar

Seu laboratório deseja iniciar uma nova ala no Instituto de Genética, incluindo pesquisa com células-tronco embrionárias humanas, com ênfase na fertilização *in vitro* e com possível investimento de capital estrangeiro, que deseja saber os trâmites legais dessas atividades no país.

Os investidores desejam obter informações como: as normas para pesquisa com embriões humanos são as mesmas para embriões animais? É legal a pesquisa com embriões humanos no país? Os embriões podem ser comprados pelo laboratório, por meio de doadores anônimos? A qual órgão o instituto deve responder para desenvolver tais atividades de pesquisa? Existe alguma lei brasileira que trata da ética de experimentação com embriões ou células-tronco humanas? Quais os crimes previstos pela legislação quando se lida com engenharia genética? Prepare um documento relatando aos investidores a quais normas o instituto estará subordinado, sanando também as demais dúvidas dos pesquisadores.

As normas com pesquisas em embriões humanos são diferenciadas na lei com os embriões animais. A Lei de Biossegurança

(Lei nº 11.105/2005) determina em seu artigo 6º a proibição da clonagem e engenharia genética em células germinativas, zigotos e embriões humanos. No entanto, a lei não determina a proibição em células de animais e vegetais. Portanto, a transgenia e engenharia genética é permitida nesses casos.

A pesquisa com células-tronco embrionárias humanas é permitida no Brasil, desde que sejam embriões obtidos de procedimentos de fertilização in vitro, haja consentimento dos doadores e atendam as condições de:

1. Serem obtidas de embriões inviáveis; ou
2. Serem obtidas de embriões congelados há 3 anos ou maior período.

Em qualquer caso, não é permitida a venda das células-tronco. Apesar de rígidas, a legislação permite a pesquisa, sendo viável o investimento no país.

Alguns crimes são previstos na lei, como utilizar embriões humanos em desacordo com a lei (art. 24); a engenharia genética em células germinativas, zigotos e embriões humanos (art. 25); a clonagem humana (art. 26); o descarte ou liberação de OGM no meio ambiente em desacordo com as normas do CTNBio e órgãos responsáveis (art. 27); utilizar, comercializar, registrar, patentear e licenciar tecnologias genéticas de restrição do uso (art. 28); e realizar em desacordo com as normas do CTNBio e órgãos responsáveis, as atividades de armazenamento, transporte, comercialização, importação e exportação de OGM (art. 29).

Prepare um documento sanando as dúvidas dos investidores, e aguarde a resposta pelos investimentos.

Avançando na prática

Praticando boas ideias

Descrição da situação-problema

Após conseguir verbas para a ampliação do departamento, um novo laboratório é construído e o prédio já se encontra finalizado com os equipamentos novos e prontos para serem instalados. Um laboratório necessita de profissionais preparados e bem treinados,

também, é essencial que haja organização do ambiente de trabalho. Uma das maneiras de auxiliar a organização e prevenir acidentes é seguindo boas práticas de laboratório, as famosas BPL. Você já ouviu falar desse termo e, provavelmente, lembra-se de algumas das práticas. Reúna suas ideias e prepare uma lista de BPL que você deseja deixar à vista do seu novo pessoal no ambiente laboratorial e informe se você possui alguma fonte para basear as ações recomendadas pelo seu informativo.

Resolução da situação-problema

Existe uma série de boas práticas que podem ser recomendadas no laboratório baseadas por exemplo na Norma Regulamentadora nº 32, que trata sobre “Segurança e Saúde No Trabalho Em Serviços De Saúde”. Algumas das principais práticas são:

- Higiene adequada do ambiente laboral, com boa iluminação e bem sinalizado.
- Produtos e reagentes devidamente identificados e organizados.
- Ambientes adequados para equipamentos de risco (autoclaves, estufas, etc.).
- Uso correto de EPIs e EPCs, com devido treinamento, quantidade e manutenção.
- Utilizar jaleco ou avental somente no laboratório (Lei Estadual nº 14.466/2011).
- Não utilizar colares, anéis, brincos, *piercings*, pulseiras e acessórios em geral.
- Utilizar a cabine biológica/capela de exaustão quando necessário.
- Lavar corretamente as mãos.
- Manual de biossegurança e protocolos à disposição dos trabalhadores.
- Capacitação dos funcionários a respeito da periculosidade e uso do laboratório.
- Fácil acesso às Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ).
- Não preparar, comer ou beber alimentos no laboratório; não pipetar com a boca.

- Evitar levar as mãos às mucosas (boca, nariz, olhos, ouvidos).
- Usar luvas ao manipular materiais de risco, retirando-as ao final da utilização.
- Evitar trabalhar sozinho.
- Descartar resíduos adequadamente.

Seguindo essas ações, seu laboratório terá o risco de acidentes reduzido. Bom trabalho!

Faça valer a pena

1. O Poder Legislativo brasileiro foi compelido a deliberar sobre a engenharia genética e outras técnicas da biologia molecular, pois muitas dessas técnicas trazem discussões éticas e morais. A Lei nº 11.105 de 24 de março de 2015 estabeleceu normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados e seus derivados, além de criar o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS e reestruturar a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio.

Assinale a alternativa que apresenta uma técnica considerada crime pela Lei de Biossegurança:

- a) Pesquisas com organismos geneticamente modificados (OGM).
- b) Pesquisas com células-tronco embrionárias.
- c) Pesquisa, uso e comércio de vegetais transgênicos.
- d) Engenharia genética em células germinativas humanas.
- e) Clonagem de embriões de bovinos e equinos.

2. As células-tronco possuem a característica de se desenvolverem em qualquer tipo de tecido e são por essa peculiaridade denominadas como totipotentes ou pluripotentes. Estão presentes em alguns tecidos, como medula óssea e dentes. Contudo, as células-tronco embrionárias possuem uma maior capacidade de se diferenciarem nos mais diversos tecidos que as células-tronco retiradas de tecidos já formados.

No Brasil, o desenvolvimento de pesquisa e terapia utilizando células-tronco embrionárias é:

- a) Permitido, desde que sejam retiradas de embriões inviáveis oriundos de fertilização *in vitro* e não tenham sido utilizadas no processo, com consentimento dos doadores e congeladas há mais de 3 anos.

b) Proibido, já que a Lei nº 11.105/2005 foi considerada inconstitucional pelo Supremo Tribunal Federal (STF) em 2005 por violar o art. 5º da Constituição Federal de 1988.

c) Permitido, desde que as células-tronco sejam obtidas da clonagem de células do próprio indivíduo, produzindo embriões inviáveis pela técnica de transferência nuclear.

d) Proibido, já que a Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105/2005) proíbe em seu artigo 6º o uso de tal técnica, assim como a clonagem humana e a importação e exportação de transgênicos.

e) Permitido, desde que sejam utilizados embriões inviáveis de processos de fertilização *in vitro* e que não haja conhecimento por parte dos doadores das células germinativas.

3. A biologia molecular possibilita diversas técnicas aplicadas à medicina, agronomia, entre outras grandes áreas, como:

I. Fertilização *in vitro* em células germinativas humanas.

II. Clonagem humana.

III. Produção de organismos transgênicos.

IV. Pesquisa com células-tronco embrionárias.

V. O uso e patenteamento de tecnologias genéticas de restrição do uso.

De acordo com a Lei nº 11.105/2005, no Brasil são permitidas somente as técnicas dispostas nos itens:

a) I, II e III.

b) I, III e IV.

c) II, III e IV.

d) III, IV e V.

e) I, IV e V.

Referências

_____. **Lei nº 11.105 de 24 de março de 2015.** Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm>. Acesso em: 13 mar. 2018.

_____. Ministério do Trabalho. NR 32 - Segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde. Disponível em: <<http://www.trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR32.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

_____. **Projeto de lei nº 827, de 2015.** Altera a Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997, que institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=1049258>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

BRASIL. **Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997.** Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9456.htm>. Acesso em: 13 mar. 2018.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Brasil apresenta crescimento da adoção de transgênicos, 13 abr. 2016. Disponível em: <www.cib.org.br/brasil-lidera-crescimento-mundial-da-adocao-de-transgenicos/>. Acesso em: 12 mar. 2018.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

FIORAVANTI, C.; PIVETTA, M. Golpe no orgulho vão. **Pesquisa Fapesp**, v. 62, p. 24-33, 2001.

GRIFFITHS, A. J. F.; et al. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 740p.

GUIMARÃES, C. T.; et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, v. 30, n. 253, nov. dez., p. 24-33, 2009. Disponível em: <<http://www.epamig.br/download/informe-agropecuaria-253-biotecnologia-2009/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

MURAL, R. J.; et al. A Comparison of Whole-Genome Shotgun-Derived Mouse Chromosome 16 and the Human Genome. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1661-1671, 2002.

NEW SCIENTIST. Exclusive: World's first baby born with new "3 parent" technique. 2016. Disponível em: <<https://www.newscientist.com/article/2107219-exclusive-worlds-first-baby-born-with-new-3-parent-technique/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

O GLOBO. Clonagem é um grande negócio 20 anos depois da ovelha Dolly, 26 jun. 2016. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/ciencia/clonagem-um-grande-negocio-20-anos-depois-da-ovelha-dolly-19580298>>. Acesso em: 12 mar 2018.

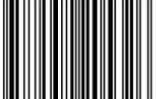
OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric trans-plantation. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 225-235, 1992.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste. 2007. 38p.

RASKIN, S. Ética e genética. **Educar Em Revista**, v. 11, p. 27-32. Editora da Universidade Federal do Paraná, 1995.

SÃO PAULO. **Lei nº 14.466 de 8 de junho de 2011**. Proíbe o uso, por profissionais da área da saúde, de equipamentos de proteção individual fora do ambiente de trabalho. Disponível em <<http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2011/lei-14466-08.06.2011.html>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

ISBN 978-85-522-0532-6



9 788552 205326 >