

# Biotecnologia



Prof. M.Sc. Rodrigo Alessandro Riemma Vela



**IBAP**  
INSTITUTO BIOMÉDICO  
DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL



## Sumário

<b>1. Introdução à Biotecnologia .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Histórico .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Dogma Central da Biologia Molecular .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Duplicação do DNA .....	8
1.2.2 Transcrição do DNA.....	8
1.2.3 Tradução do RNA .....	10
<b>1.3 Tecnologia do DNA recombinante .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 DNA recombinante .....	14
<b>2. Metodologias Biotecnológicas .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Enzimas de restrição .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Clonagem de DNA .....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Plasmídeo.....	21
2.2.2 Fagos .....	22
2.2.3 Cosmídeos.....	22
2.2.4 Vírus .....	23
2.2.5 Vetores de leveduras .....	23
<b>2.3 Eletroforese em gel de agarose.....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Princípios da eletroforese .....	24
2.3.2 Gel de agarose .....	25
2.3.3 Eletroforese de amostras em gel de agarose.....	26
2.3.4 Revelação do gel de agarose.....	28
<b>2.4 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 PCR em tempo real (QPCR).....</b>	<b>33</b>
2.5.1 Intercalantes de dupla fita de DNA.....	36
2.5.2 Oligonucleotídeos marcados .....	37
<b>2.6 Sequenciamento de DNA.....</b>	<b>39</b>
<b>3. Terapias Moleculares.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Sistemas não virais.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Técnicas que utilizam vetores biológicos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.3 Células Tronco .....</b>	<b>59</b>
<b>4. Aplicações Biotecnológicas .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Biofármacos.....</b>	<b>63</b>
4.1.1 Proteínas e Polipeptídeos .....	66
<b>4.2 Vacinas .....</b>	<b>68</b>
4.2.1 Vacinas atenuadas .....	69
4.2.2 Vacinas inativadas.....	70
4.2.3 Vacinas conjugadas.....	72



**IBAP**  
INSTITUTO BIOMÉDICO  
DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

4.2.4 Vacinas combinadas.....	73
4.2.5 Vacinas de DNA.....	74
<b>4.3 Diagnóstico e terapêutica de doenças.....</b>	<b>75</b>
4.3.1 Anticorpos policlonais.....	76
4.3.2 Anticorpos monoclonais.....	76
<b>5. Perspectivas Futuras em Biotecnologia.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Nanobiotecnologia.....</b>	<b>82</b>
5.1.1 Nanopartículas.....	85
<b>5.2 Farmacogenômica.....</b>	<b>87</b>
5.2.1 Polimorfismos genéticos.....	89
<b>5.3 Empresas biotecnológicas.....</b>	<b>93</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>99</b>

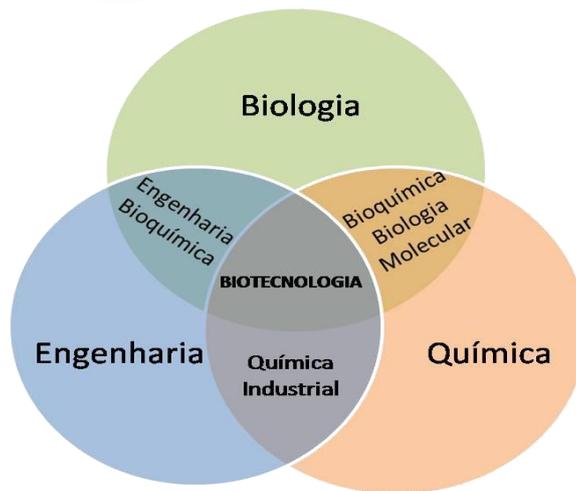
## 1. Introdução à Biotecnologia

### 1.1 Histórico

Entendemos Biotecnologia como o conjunto de processos tecnológicos que possibilitam a utilização de sistemas biológicos, envolvendo, em alguns casos, o uso de micro-organismos manipulados geneticamente.

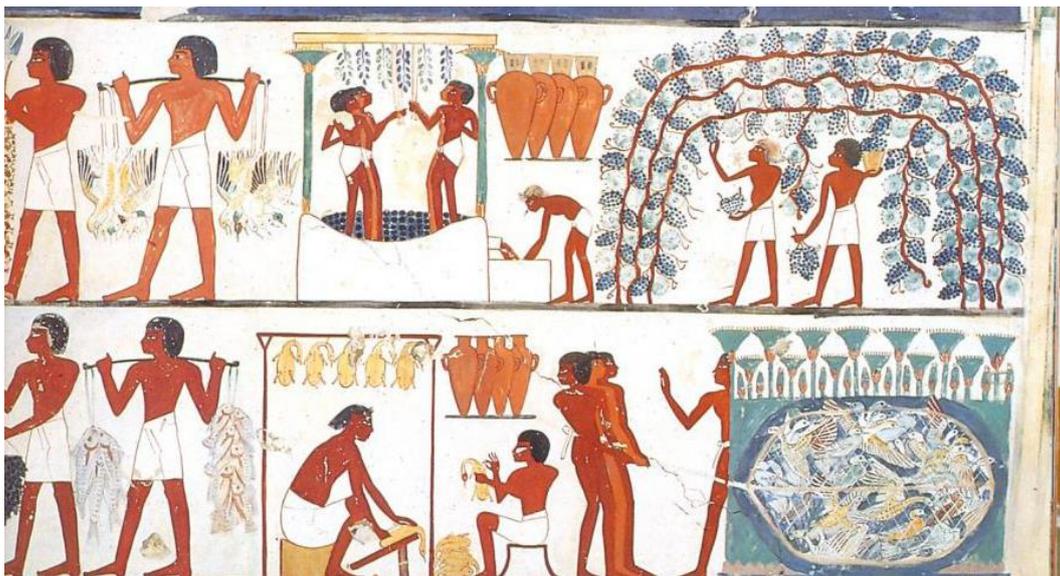
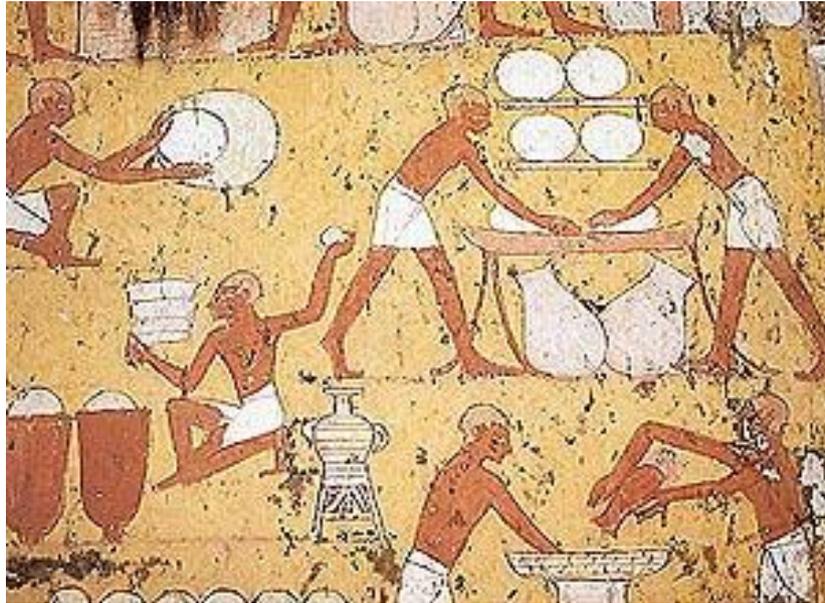
Neste curso veremos que a Biotecnologia é uma ciência que engloba muitas outras áreas do conhecimento. Passando pela genética e microbiologia até a área de nanotecnologia, por exemplo. Ela é derivada de principalmente três grandes áreas: A Biologia, a Engenharia e a Química. É essa associação que permite que profissionais que atuam em Biotecnologia possam ter em mãos técnicas de manipulação genética em nível nanométrico, por exemplo (Fig. 1.1).

Trata-se de uma área que está sempre inovando, valendo-se das mais modernas tecnologias disponíveis para pesquisa, tratamento e diagnóstico de doenças e disfunções humanas, principalmente relacionadas às doenças mais agressivas, como o câncer.



**Figura 1.1:** Diagrama mostrando a associação de diversas áreas para formar a Biotecnologia.

O início desta ciência ocorreu de maneira natural e muito próxima aos conceitos culinários do ser humano. Há muito tempo que o homem utiliza a biotecnologia para produção de alimentos e bebidas, como a produção de pães e vinhos. É possível reconhecer na arte antiga (Egito, Grécia, Roma) que há milhares de anos antes de Cristo, o homem já manipulava micro-organismos para a produção destes alimentos (fig. 1.2).



**Figura 1.2:** imagens pintadas em templos e tumbas de Faraós mostram a produção de pães e bebidas fermentadas.

Mas a Biotecnologia como ciência propriamente dita ocorreu após 1665, com a descoberta das células, por Robert Hooke. Ele

realizou tal descoberta ao analisar um pedaço de cortiça com um microscópio rudimentar e conseguiu visualizar as células vegetais. Como não sabia do que se tratava, chamou cada unidade observada de célula. Aproximadamente dez anos mais tarde, Anton Van Leeuwenhoek, construiu um microscópio que possuía maior poder de aumento e foi possível observar, pela primeira vez, os micro-organismos.

Aproximadamente 170 anos após esses eventos, Mathias Schleiden e Theodor Schwann lançaram a teoria de que todos os organismos vivos são formados por células, passando-se assim a compreendermos melhor a formação dos tecidos. Esta teoria incentivou muitas pesquisas na área, incluindo a genética, que nem existia como ciência ainda, mas questões como hereditariedade já eram discutidas.

Foi em 1865, que o monge Gregor Mendel, fazendo cruzamentos de ervilhas com diferentes cores de flores, conseguiu desvendar como funcionava a hereditariedade e assim deu origem à Genética (Fig. 1.3).



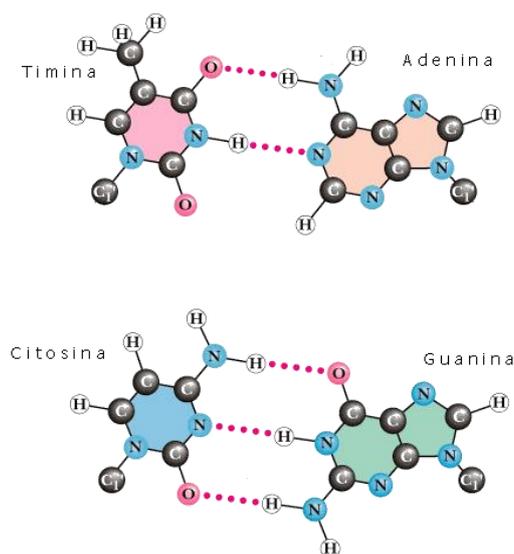
**Figura 1.3:** Gregor Mendel, pai da Genética.

Posteriormente em 1953, James Watson e Francis Crick desvendaram a estrutura helicoidal da molécula de DNA, dando início a grande quantidade de pesquisas na área da genética e biologia molecular. A partir daí, em 1973 Hebert Boyer e Stanley Cohen, realizaram a primeira transformação gênica, construindo um gene com partes de sapo e partes de bactérias, surgindo desta forma a Engenharia Genética, que hoje é a base para a Biotecnologia.

## **1.2 Dogma Central da Biologia Molecular**

Com a descoberta da estrutura helicoidal da molécula de DNA por James Watson e Francis Crick, foi possível também fazer a correlação das 4 bases nitrogenadas presentes na cadeia de DNA.

(Adenina, Citosina, Guanina e Timina.) (Fig. 1.4). A partir desse estudo e da compreensão da existência do DNA, do RNA e das proteínas, surgiu a dúvida de como esses elementos estavam associados entre si.



**Figura 1.4:** estrutura molecular das 4 bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Guanina e Timina) que formam o DNA e suas correlações.

Com esse questionamento, Francis Crick postulou o Dogma Central da Biologia Molecular, ou "Hipótese da Sequência". Essa hipótese foi baseada em dois modelos. Um chamado de modelo possível e o outro modelo testado experimentalmente, pois pode ser testado em experimentos da época. O modelo possível define que a

especificidade de uma porção de ácido nucleico é expressa somente pela sequência de seus pares de bases e, por sua vez, estas contêm o código necessário para gerar uma proteína. O modelo experimental, mais preciso, aborda o fluxo de informações contidas no código genético e postula que a informação de uma sequência de ácido nucleico, uma vez transformada em proteína, não pode retornar para o ácido nucleico. Em maiores detalhes, a transferência de informação de ácido nucleico para outro ácido nucleico e deste para proteína pode ser possível, mas de proteína para proteína ou desta para o ácido nucleico seria impossível.

Observamos neste postulado que há um fluxo de informações para os dois lados, ou seja, uma das biomoléculas envolvidas pode dar origem a outra.

Hoje, por meio de ferramentas e experimentos mais modernos, conseguimos compreender melhor como estas moléculas estão relacionadas. Dessa forma, podemos diferenciar os mecanismos da duplicação do DNA, da Transcrição e da Tradução.



### 1.2.1 Duplicação do DNA

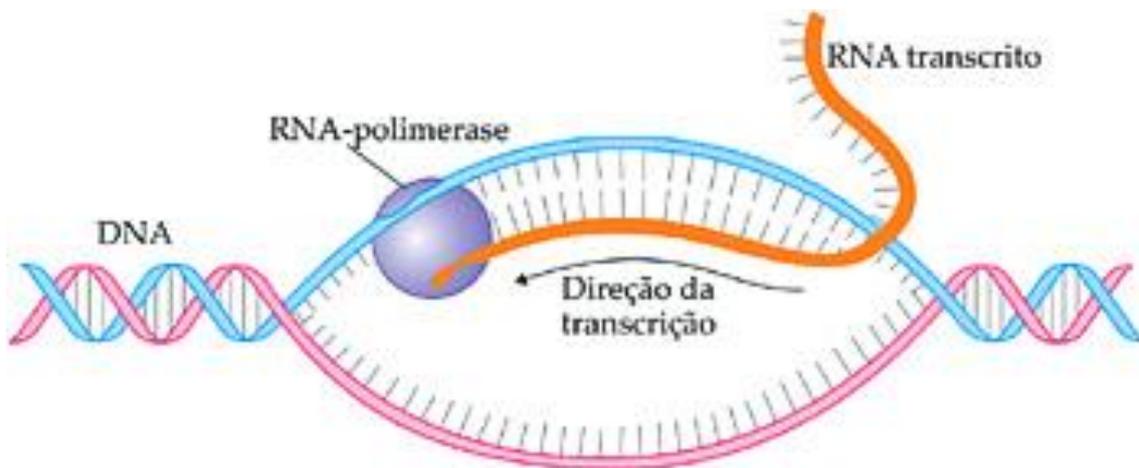
Uma célula apresenta eventos clássicos durante sua vida e estes eventos apresentam processos distintos. Tais processos são chamados de ciclo celular e podemos dividi-lo em duas grandes etapas, a intérfase, etapa compreendida entre duas divisões sucessivas, onde ocorre crescimento celular e preparação para a divisão e a mitose, onde ocorre a divisão celular propriamente dita.

A duplicação do DNA ocorre na intérfase, como já vimos e envolve vários mecanismos e enzimas. Neste processo uma das fitas de DNA originárias serve de modelo para que uma nova fita seja sintetizada e dessa forma todo o material genético seja duplicado.

### 1.2.2 Transcrição do DNA

O processo de transcrição do DNA consiste na formação de uma molécula de RNA mensageiro (RNAm) - que se trata de um ácido nucleico intermediário entre o DNA e a proteína - tendo como molde a molécula de DNA. Esta etapa é mediada pela enzima RNA polimerase (RNAPol), que forma o RNAm. Este processo ocorre no núcleo celular.

Nesta etapa, as fitas de DNA separam-se e apenas uma delas servirá de modelo para a produção de um RNAm, sendo que a outra fita ficará inativa (Fig. 1.5). A transcrição inicia-se em uma região específica do DNA, pois apenas será formado o RNAm que servirá para a síntese da proteína de interesse. Isso é possível pois a RNAPol liga-se em uma região chamada "promotora", cuja função é "indicar" o início da transcrição para aquele determinado RNAm.



**Figura 1.5:** processo de transcrição do DNA. Uma das fitas de DNA serve de molde enquanto a outra permanece inativa.

A polimerização da cadeia de RNAm alonga-se até que a RNAPol reconhece sequências especiais que indicam o término da cadeia. A partir daí o RNAm recém-sintetizado e a RNAPol desligam-

se da fita de DNA e o fragmento de RNA migra para o citoplasma celular para ser utilizado de molde para a síntese proteica.

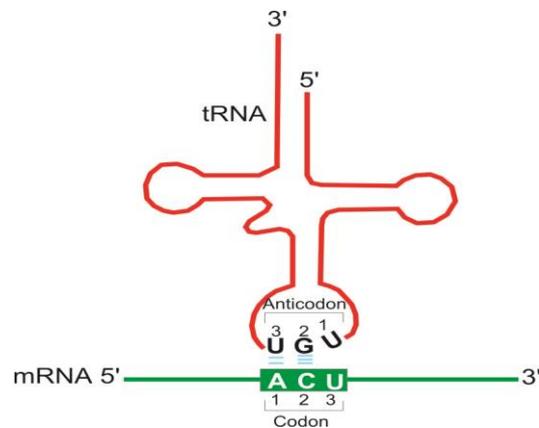
### 1.2.3 Tradução do RNA

10

Agora no citoplasma celular, o RNAm migra para o interior do Retículo Endoplasmático Rugoso, onde encontram-se os ribossomos, que são compostos de duas unidades, uma pequena e uma grande, que cercam o RNAm e – para cada códon (sequência de três nucleotídeos) – agregam uma molécula chamada de RNA transportador (RNAt), que carrega o aminoácido correspondente, formando proteínas.

Quando o RNAm se liga no ribossomo, este reconhece uma sequência de três bases, chama de códon. Esta sequência é complementar à outra, também formada por três bases, presente no RNAt. Esta sequência é chamada de anticódon (fig. 1.6). O RNAt que se liga ao códon traz consigo o aminoácido correspondente. Ele deixa o aminoácido e desliga-se do ribossomo. O códon seguinte é lido e mais um aminoácido é adicionado. Este processo continua até

que no RNAm apareça um códon de parada, indicando o fim da síntese.



**Figura 1.6:** ilustração mostrando o códon no RNAm e o anticódon no RNAt. A figura também mostra a complementariedade entre eles.

Cada códon serve de modelo para síntese de um aminoácido e a sequência dos aminoácidos determinam a proteína a ser formada. Porém cada aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, como mostra a tabela da figura 1.7.

**Segunda base no códon**

	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>		
<b>Primeira base no códon</b>	<b>U</b>	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr <b>STOP</b> <b>STOP</b>	Cys Cys <b>STOP</b> Trp	<b>Terceira base no códon</b>
	<b>C</b>	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	
	<b>A</b>	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	
	<b>G</b>	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	

Figura 1.7: tabela de codificação de aminoácidos. À esquerda vemos a 1° base do códon, acima vemos a segunda base e à direita vemos a terceira base.

Por exemplo, o aminoácido histidina, representado na tabela por His, é codificado quando temos o códon CAC ou o códon CAU. Já o aminoácido Valina, representado na tabela por Val, é codificado pelos códons GUU, GUC, GUA e GUG. Existem também os códons que representam o fim da tradução, representados na tabela por **STOP**.

Dessa forma temos que as proteínas são formadas por sequências de aminoácidos, codificadas pela "leitura" das informações contidas no RNAm, que por sua vez foi sintetizado no núcleo celular tendo o DNA como modelo.

### **1.3 Tecnologia do DNA recombinante**

A manipulação do DNA sempre foi o alvo dos pesquisadores desde que suas características de hereditariedade e controle do ciclo celular foram desvendadas.

A tecnologia do DNA recombinante compreende uma série de técnicas de manipulação do material genético sendo que as principais são provenientes da Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Genética Microbiana e permitiram que a análise do DNA ganhasse um novo enfoque, principalmente após a década de 1970, onde estas áreas ganharam grandes inovações tecnológicas.

Essa tecnologia, também chamada de engenharia genética, além de ter cada vez mais interesse, tem uma série de aplicações, como os mecanismos de replicação e expressão gênica, principalmente após os projetos genoma, que decifraram a sequência

genética de vários organismos, incluindo o humano; pode-se citar também o desenvolvimento de culturas microbianas capazes de sintetizar substâncias para uso clínico humano.

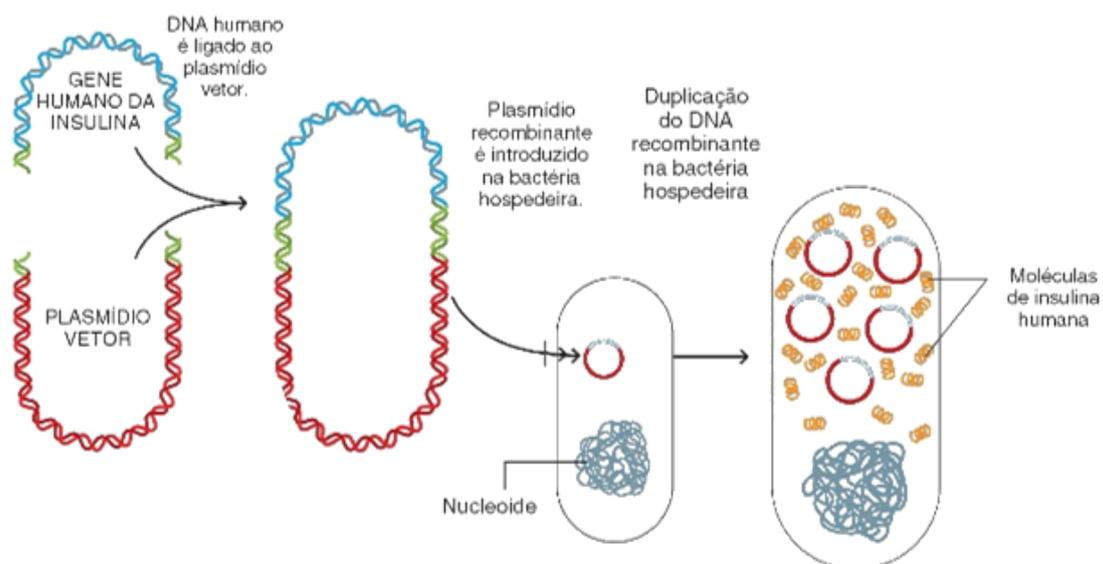
A utilização deste DNA recombinante vem cada vez mais tendo novas e mais versáteis aplicações que permitem uma grande mudança dos paradigmas humanos. Um bom exemplo disso é o desenvolvimento e o aprimoramento dos testes de paternidade, que permitem, atualmente, determinar a paternidade de um indivíduo com mais de 99,99% de certeza; mesma técnica que pode ser utilizada para identificar vítimas de desastres.

### **1.3.1 DNA recombinante**

Entende-se por DNA recombinante todo fragmento de DNA que mistura um determinado DNA com a inserção de um fragmento de outro DNA, totalmente exterior ao primeiro.

A obtenção deste DNA recombinante ocorre por meio da técnica chamada de clonagem. O termo clonagem é derivado de colônias bacterianas, uma vez que cada indivíduo de uma colônia é um clone da outra, pois seus indivíduos são geneticamente iguais.

O princípio da clonagem envolve o isolamento e a propagação de moléculas de DNA idênticas. Para que isto seja possível, primeiramente isola-se o chamado **inserto**, que consiste do fragmento de DNA de interesse previamente isolado. O inserto precisa ser ligado à uma outra molécula de DNA chamado de **vetor**, que é utilizado para replicar o inserto. A associação destes dois ácidos nucleicos que é o chamado DNA recombinante (fig. 1.8).



**Figura 1.8:** Mecanismo ilustrando a produção de insulina humana em um vetor bacteriano. Mecanismo de DNA recombinante.

A seguir, o DNA recombinante precisa ser inserido em uma célula hospedeira compatível, para que se possa utilizar a maquinaria celular para replicar este recombinante. Tal célula é chamada de

**transformante**, pois este processo recebe o nome de transformação. Esta célula, contendo o DNA recombinante, produzirá milhares de células com o inserto.

## 2. Metodologias Biotecnológicas

### 2.1 Enzimas de restrição

A tecnologia do DNA recombinante trouxe grande revolução para ciência e a medicina por meio da manipulação dos ácidos nucleicos, principalmente pela manipulação direta do DNA. Para que essa manipulação seja possível as enzimas de restrição desempenham papel fundamental.

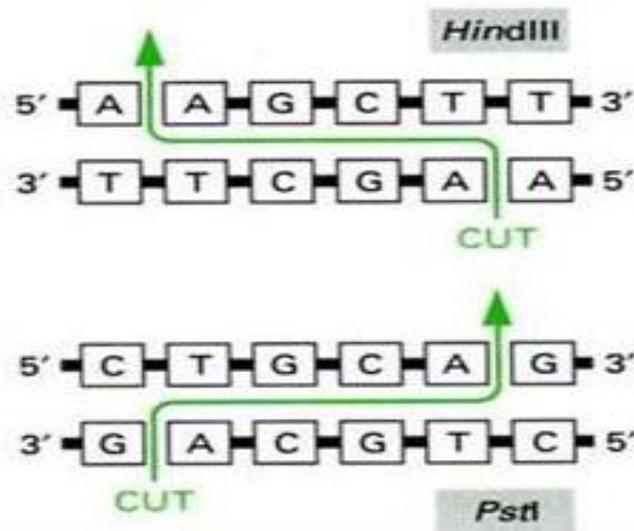
Em 1943 Luria e Delbruck observaram que bacteriófagos infectavam facilmente uma determinada linhagem de bactéria, mas não eram capazes de infectar outra linhagem. Esse fenômeno foi chamado de restrição dos bacteriófagos em relação às bactérias. Experimentos posteriores mostraram que este evento estava associado às enzimas.

Em 1962 Arber e Dussoix propuseram um mecanismo molecular para o fenômeno de restrição. Certas linhagens de

bactérias conteriam endonucleases capazes de clivar o DNA invasor, mas protegeriam seu próprio DNA através da metilação (adição de grupamentos metila à base citosina (C) DNA, silenciando-o).

A partir desses experimentos, as enzimas de restrição ou, endonucleases, foram reconhecidas como as enzimas responsáveis pelos eventos descritos. Sendo assim, podemos definir enzimas de restrição como proteínas que desempenham função de clivagem da molécula de DNA em pontos específicos, em reconhecimento a determinadas sequências de nucleotídeos.

Existem diferentes tipos de enzimas de restrição que clivam diferentes sequências de DNA compostas de 4, 6 e 8 bases. Essas sequências são Palindrome, ou seja, apresentam o mesmo sentido de leitura nas duas direções (fig. 2.1). Podemos exemplificar palíndrome coma a palavra ARARA. Ela tem o mesmo significado quando lida da esquerda para a direita ou da direita para a esquerda. Outros exemplos: osso, ovo etc.



**Figura 2.1:** Dois exemplos de enzimas de restrição. Acima vemos a enzima *HindIII*, que cliva a sequência de DNA reconhecida por AAGCTT. A clivagem separa um fragmento AGCT. Abaixo vemos a enzima *PstI*, que cliva a sequência de DNA reconhecida por GACGTC. A clivagem separa um fragmento ACGT.

As enzimas de restrição são utilizadas para "cortar" o fragmento de DNA de interesse e ser inserido no DNA que formará o recombinante. O processo é conhecido como clonagem de DNA, que será abordado no próximo tópico.

## 2.2 Clonagem de DNA

A clonagem de DNA consiste em inserir um fragmento isolado de DNA em outra molécula de DNA de uma célula hospedeira. Para

que o processo seja funcional, a célula deve ter a capacidade de replicação independente.

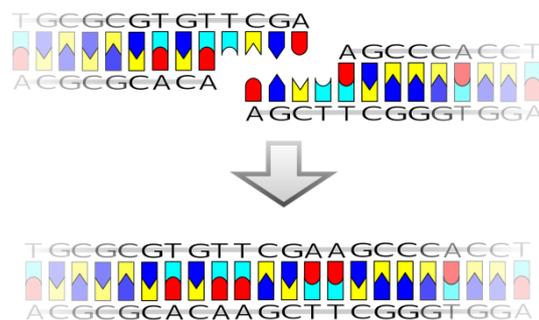
Uma das grandes vantagens da clonagem é a obtenção de grandes quantidades do fragmento do DNA recombinante. Esse DNA tem usos múltiplos que vão desde a simples expansão do DNA alvo para a pesquisa, como a produção de biomoléculas utilizadas para a terapia em pacientes com doenças metabólicas.

Para realizar o processo de clonagem existem duas etapas básicas a serem seguidas:

1. O fragmento de DNA de interesse, chamado de inserto, é ligado à outra molécula de DNA (vetor de clonagem), gerando a molécula de DNA recombinante.
2. O DNA recombinante é propagado em uma célula hospedeira.

O primeiro passo da clonagem é a seleção do fragmento de DNA de interesse. Esse processo é realizado utilizando-se enzimas de restrição, que irão clivar o DNA alvo nas regiões de interesse. Após essa etapa, o DNA deve ser ligado ao vetor de clonagem. Para que o inserto possa ligar-se corretamente no vetor, também existe a necessidade de clivar o DNA do vetor com enzimas de restrição. Para

que seja possível a união do inserto e do vetor é necessária a utilização de enzimas chamadas **ligases (fig. 2.2)**. Tais enzimas catalisam a formação de uma ligação fosfodiéster entre grupos 3'-OH e 5'-PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, unindo covalentemente moléculas de DNA de fita dupla, resultando em uma molécula de DNA recombinante.



**Figura 2.2:** representação esquemática da função das enzimas ligase.

A partir da obtenção do DNA recombinante, existe a necessidade de inserir o DNA recombinante em uma célula capaz de amplificar aquela informação genética em centenas de cópias. Este processo de amplificação é obtido através do uso de moléculas de DNA que são os chamados **vetores de clonagem molecular**.

A seguir veremos os tipos básicos de vetores utilizados atualmente.

### 2.2.1 Plasmídeo

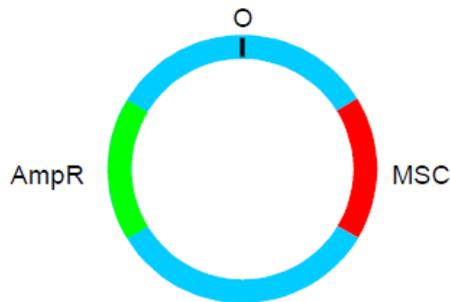
São pequenas moléculas de DNA dupla fita, normalmente presentes em bactérias, que apresentam elementos essenciais à replicação, possuindo pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico (fig. 2.3).

21

Para que o plasmídeo seja um bom vetor, ele deve apresentar:

- uma **origem de replicação** (O), ou seja, uma sequência de DNA que permita a replicação do vetor em uma célula hospedeira;
- dois ou mais sítios únicos de clivagem para enzimas de restrição. O conjunto desses sítios, denominado de **Múltiplos Sítios de Clonagem** (MSC), é o local onde o inserto é incorporado ao vetor de clonagem;
- gene que codifica um produto que distingue a célula transformada da célula não transformada.

Os plasmídeos têm limite de clonagem de 100 a 10.000 pares de base.



**Figura 2.3:** esquema ilustrando um plasmídeo de clonagem.

### 2.2.2 Fagos

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam somente bactérias. Um dos fagos mais utilizados é o chamado bacteriófago  $\lambda$ , que se comporta como vírus da *E. coli*.

A utilização do fago  $\lambda$  apresenta a vantagem de empacotamento do DNA *in vitro*, aumentando a eficiência.

O limite de clonagem dos fagos é de até 50.000 bases, mas geralmente o limite é menor, girando em torno de 15.000 bases.

### 2.2.3 Cosmídeos

É o resultado da hibridação entre uma molécula de DNA de um fago e um plasmídeo bacteriano. Recebem este nome pois as

enzimas responsáveis pela ligação da molécula de DNA de fago  $\lambda$  na membrana proteica necessitam apenas de locais **cos** para funcionar. Um cosmídeo é basicamente um plasmídeo que contém uma região **cos**.

#### 2.2.4 Vírus

Vírus são seres acelulares e, portanto, são classificados como parasita intracelular obrigatório. Além disso os vírus apresentam DNA ou RNA como material genético, dessa forma vários estudos foram realizados com a finalidade de selecioná-los como vetores.

#### 2.2.5 Vetores de leveduras

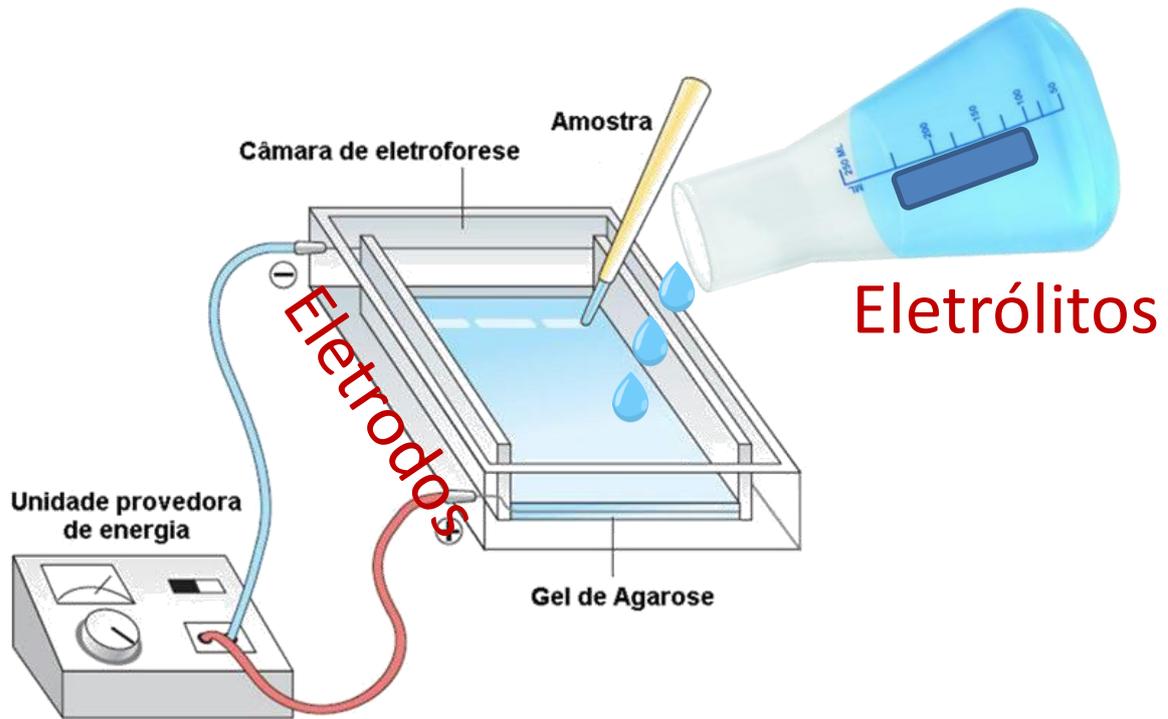
Leveduras são seres eucariotos e dessa forma possuem estruturas celulares semelhantes às dos eucariotos superiores, como as células animais. Além disso, existem muitas proteínas que são similares às proteínas de mamíferos.

## 2.3 Eletroforese em gel de agarose

### 2.3.1 Princípios da eletroforese

A eletroforese é definida como o movimento de partículas carregadas eletricamente em um meio líquido elétrico, sobre a influência de um campo elétrico. Esse movimento também é responsável pela separação das moléculas, como DNA, RNA, proteínas, carregadas pela corrente elétrica. Quanto menor o peso molecular da molécula a ser carregada, maior será a migração dela no processo, ficando mais próxima do polo pelo qual será atraída.

Neste sistema existem os eletrólitos, papel realizado pela solução tampão, que fornece os íons adequados e os eletrodos, instalados dentro dos reservatórios de tampão, fazem a conexão elétrica e aplicação do campo elétrico através da coluna (fig. 2.4).



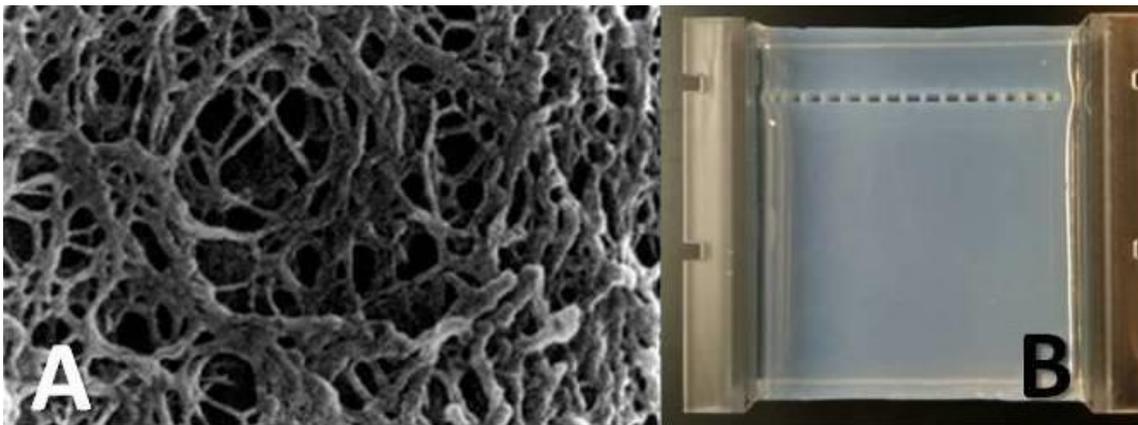
**Figura 2.4:** desenho esquemático da eletroforese em gel de agarose mostrando os eletrodos e os eletrólitos.

### 2.3.2 Gel de agarose

A agarose é um polissacárido que é dissolvido numa solução tampão quente e solidifica à temperatura ambiente, formando uma rede de poros microscópicos responsáveis por controlar a migração das moléculas na eletroforese (fig. 2.5).

A concentração de agarose determina o tamanho dos poros da matriz solidificada, dessa maneira, quanto maior sua concentração,

menores serão as dimensões dos poros formados, permitindo dessa forma a separação de fragmentos de **DNA** menores com maior resolução.



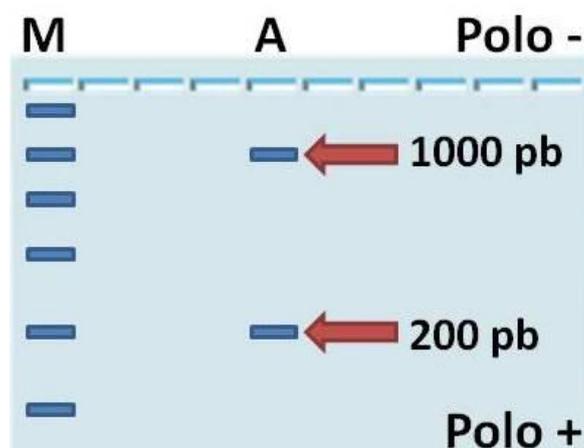
**Figura 2.5:** Em A vemos uma micrografia eletrônica de um gel de agarose. No detalhe vemos os poros. Em B o gel solidificado montado no aplicador de amostras.

### 2.3.3 Eletroforese de amostras em gel de agarose

Como vimos a eletroforese em gel de agarose tem a finalidade de separar as amostras por peso molecular. Dessa forma, podemos aplicar, por exemplo, uma amostra que seja formada de dois fragmentos de DNA, um com 200 pares de base (pb) e outro com 1000 pares de base. Nessa "corrida" hipotética, quando aplicarmos

a corrente elétrica no gel de agarose que está mergulhado na solução tampão, os fragmentos de DNA, que apresentam carga elétrica negativa, irão migrar para o polo positivo do sistema. Como temos dois fragmentos de pesos diferentes, o de 200 pb será "arrastado" mais rapidamente pelo sistema. Ao final de um determinado tempo, o fragmento menor estará mais próximo do polo positivo e o fragmento maior, mais distante (fig. 2.6). Comparando-se com um padrão, que irá migrar juntamente com a amostra, poderemos identificar os dois fragmentos de DNA.

Em um mesmo gel pode-se aplicar várias amostras ao mesmo tempo, podendo-se compará-las entre si ou com um padrão determinado.

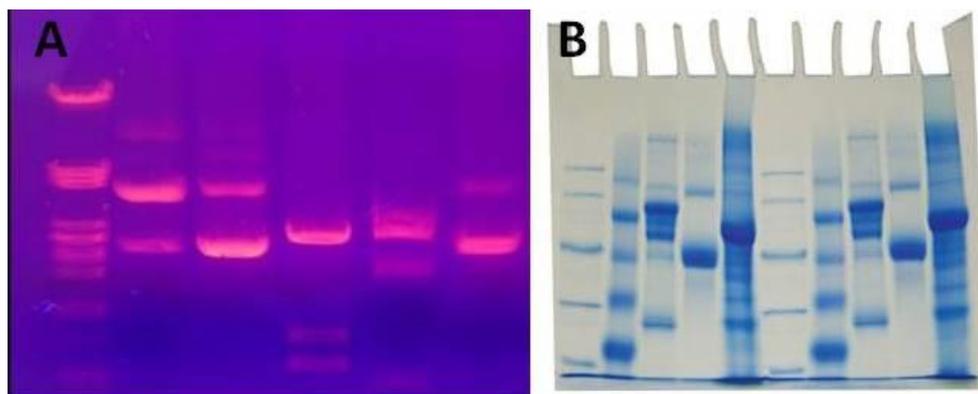


**Figura 2.6:** Esquema de um gel de agarose. M representa o marcador padrão com 6 fragmentos de DNA: 2000 pb, 1000 pb, 500 pb, 300 pb, 200 pb e 100 pb,

de cima para baixo respectivamente. A representa uma amostra hipotética com dois fragmentos de DNA.

### 2.3.4 Revelação do gel de agarose

Depois que a eletroforese termina e os fragmentos de interesse já foram separados, existe a necessidade de revelar os resultados. Ao fim da corrida, os fragmentos separados ainda não são visíveis sem um corante específico. Os corantes utilizados dependem das moléculas que foram separadas. Caso os fragmentos sejam ácidos nucleicos, utiliza-se um intercalante de DNA, que apresenta propriedades fluorescentes quando expostos à luz ultravioleta. Caso sejam proteínas, o corante mais utilizado é o nitrato de prata (fig. 2.7).



**Figura 2.7:** Em A temos uma eletroforese de DNA e em B de proteínas.

Para corar as amostras pode-se colocar o corante juntamente com elas no início da corrida e ao final pode-se observar o resultado de uma forma mais prática - comum para DNA - ou preparar uma solução com o corante e banhar o gel após o término da eletroforese.

## 2.4 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Até a década de 1980 só existia uma forma de se obter uma grande quantidade de um fragmento de DNA: por meio de clonagem. Apesar de eficiente, tal técnica é demorada e a reprodutibilidade é muito variável. Além disso depende de técnicas de cultivo microbiano e de uma seleção correta do DNA de interesse.

Pensando nessas dificuldades, Karry B. Mullis desenvolveu uma técnica, que lhe rendeu o prêmio Nobel de química em 1993, que permitia separar um fragmento de DNA de interesse e amplificá-lo *in vitro*, exponencialmente, em apenas um dia.

Esse procedimento somente foi possível após a descoberta da enzima DNA polimerase termoestável, isolada do micro-organismo *Thermus aquaticus*. Com ela, pode-se realizar uma reação em altas

temperaturas sem que ocorra sua desnaturação, tornando possível a reação em cadeia da Polimerase, conhecida como PCR.

Esta técnica envolve três etapas: desnaturação do DNA pelo calor entre 94-95°C, anelamento de *primers* à sequência alvo em fita simples, ocorrendo a temperaturas entre 35 a 60°C e uma etapa de extensão do *primer* anelados por uma DNA polimerase termoestável (72 a 78°C).

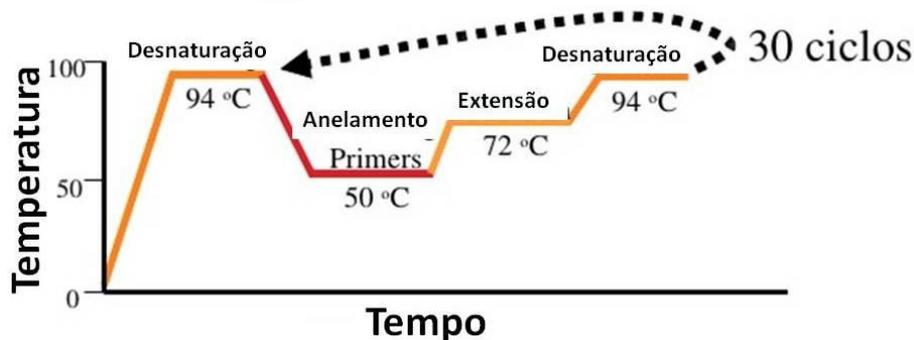
Componentes necessários para a reação:

1. DNA polimerase termoestável, conhecida como Taq (*Thermus aquaticus*) ou Tth (*Thermus thermophilus*).
2. Um par de *primers*, oligonucleotídeos que funcionam como início da polimerização, pois são essenciais para a enzima. Também atuam determinando o fragmento de interesse.
3. Cátions divalentes, como MgCl<sub>2</sub>, também essenciais à ação da enzima.
4. Deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), com quantidades iguais de dATP, dCTP, dTTP e dGTP, que são as bases nitrogenadas que formarão as fitas novas de DNA.
5. Tampão para manutenção do pH, geralmente entre 8,3 e 9 à temperatura ambiente.

6. DNA de interesse, que tem melhor eficiência se extraído por metodologia específica.

Todos esses componentes formam o chamado *mix* da reação e são aplicados em um microtubo que será colocado em um equipamento (termociclador) que fará ciclos repetidos das temperaturas acima descritas.

A reação inicia-se com uma desnaturação inicial à 95°C, que dura cerca de 5 minutos, para que as ligações existentes entre as dupla-fitas do DNA sejam rompidas e tenhamos a maior quantidade possível de DNA fita simples. A partir daí começam os ciclos. Em geral, temos mais uma etapa, de 30 segundos de duração à 95°C. Posteriormente segue-se o anelamento dos *primers*, também de duração média de 30 segundos, a temperaturas entre 35 a 60°C (a temperatura é determinada pelo conjunto de *primers* e é fixa). Após essa etapa segue-se a extensão das fitas, em torno de 72°C por 30 segundos a 1 minuto. Esses três passos são repetidos de 30 a 40 vezes, para que se obtenha grande quantidade de fragmentos amplificados. Ao final, procede-se mais uma extensão, à 72°C por cerca de 5 a 10 minutos (Fig. 2.8).



**Figura 2.8:** Desenho esquemático das temperaturas da PCR.

O número de cópias obtidas na PCR é dada pela fórmula  $C=2^n$ , onde  $C$  é o número de cópias e  $n$  é o número de ciclos envolvidos na reação. Desta forma a amplificação pode ser expressa por uma curva exponencial.

Após a PCR ser realizada em um termociclador, o resultado precisa ser visualizado. A forma tradicional é a aplicação de cada uma das amostras no gel de agarose para que se proceda à eletroforese. Dessa forma, pode-se verificar se a amplificação ocorreu e em caso afirmativo, se o fragmento corresponde ao interesse.

Caso seja necessário recuperar o DNA que está aplicado no gel de agarose, existem kits comerciais que fazem a extração, porém normalmente perde-se um pouco do DNA. Por esta razão, convém

aplicar no gel apenas uma fração do amplificado, em quantidade suficiente para a visualização.

## 2.5 PCR em tempo real (QPCR)

33

Atualmente a eficiência da PCR é alta, se comparada à do início da técnica, porém quando realizada de forma convencional tem limitações como o tempo de observação dos resultados, pois existe a necessidade de terminar a reação, proceder à eletroforese e corar as amostras para somente depois observar os resultados. Outro limitante é a quantificação do amplificado. Da maneira tradicional, observando-se o amplificado na luz ultravioleta, apenas pode-se quantificar visualmente as amostras, tendo um valor aproximado apenas.

A técnica de PCR em tempo real foi descrita pela primeira vez em 1993 por Higuchi e seus colaboradores, acoplado uma câmera de vídeo e monitorando a PCR durante todos os ciclos para detectar a fluorescência emitida à medida que os ciclos avançavam. Isto permitiu que os resultados fossem vistos à medida que eram formados e permitia também a quantificação destes.

O princípio da QPCR é o mesmo da PCR convencional, com a diferença que no termociclador existe um sistema de detecção de sinais fluorescentes, emitidos por compostos adicionados à reação com esta finalidade, pois desta forma pode-se acompanhar em tempo real a reação.

Além desta técnica permitir o monitoramento da reação em tempo real, ela também permite a quantificação dos resultados pois a quantidade de amplificação é proporcional à fluorescência emitida. Isso é útil para quantificação de vírus, por exemplo. Em um soro com baixa carga viral, terá baixa fluorescência; já em um soro com muitas partículas do mesmo vírus, terá alta emissão de fluorescência e a quantificação mais alta.

Os dados são analisados por *softwares* específicos, que fazem análise, armazenam e comparam os dados, permitindo fazer acompanhamentos de forma mais precisa e específica (Fig 2.9). A amplificação das amostras pode ser observada na janela chamada de curva de amplificação, onde vemos as amostras envolvidas e os controles.



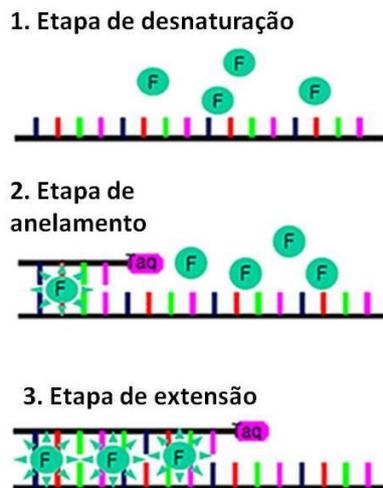
**Figura 2.9:** Exemplo de uma curva de amplificação onde vemos uma amostra positiva, o controle positivo e o controle negativo.

A QPCR trouxe várias inovações para a área da biotecnologia como rapidez, precisão, quantificação além de resultados mais fidedignos melhorando a qualidade das pesquisas e diagnósticos. Outra vantagem gerada por esta técnica, é o fato de não ter a necessidade dos tubos serem abertos após a amplificação, pois a leitura dos resultados já foi realizada, desta forma não há contaminação do laboratório com o produto amplificado, que é muito contaminante.

Basicamente existem dois tipos de corantes nesta reação, os intercalantes de dupla fita de DNA e os oligonucleotídeos marcados.

### 2.5.1 Intercalantes de dupla fita de DNA

Os intercalantes de dupla fita de DNA são moléculas que se intercalam entre as duas fitas do DNA e emitem fluorescência quando expostas à luz ultravioleta (2.10). Estes compostos não emitem a fluorescência se não estiverem associados à dupla fita de DNA, portanto a emissão da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA existente inicialmente.



**Figura 2.10:** Figura ilustrando os intercalantes de DNA.

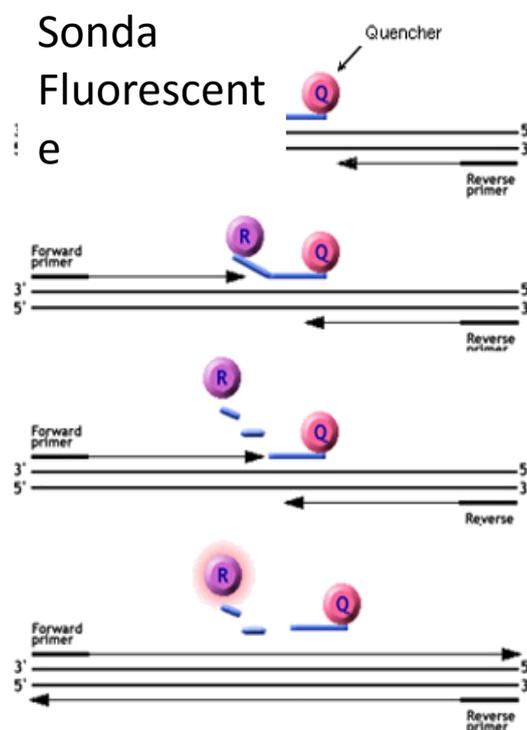
Como o sistema de detecção não consegue distinguir entre a fluorescência oriunda da amplificação de dois fragmentos diferentes de DNA, apenas é possível amplificar uma sequência de cada vez.

## 2.5.2 Oligonucleotídeos marcados

Alternativamente aos intercalantes de dupla fita de DNA existem os oligonucleotídeos marcados (sondas). São fragmentos curtos de DNA de fita simples, complementares à região de interesse a ser amplificada. Normalmente estes elementos são marcados com agentes fluorescentes que, quando excitados por determinados comprimentos de onda, emitem fluorescência proporcional à amplificação obtida.

Ligado a estes compostos existe uma molécula, chamada de *quencher*, que é responsável por absorver a fluorescência do fluoróforo em estado natural. Durante a fase de anelamento dos *primers*, a sonda também anela-se na região específica. Ao atingir a temperatura de extensão, a DNA polimerase reconhece a sonda ligada à frente do *primer* e como apresenta propriedade de correção de erros, remove a sonda clivando-a. Nesta clivagem o fluoróforo e o *quencher* separam-se e agora a fluorescência pode ser captada pelo sistema óptico do equipamento (fig. 2.11). Quanto mais moléculas de DNA forem formadas na QPCR, mais fluorescência será emitida, sendo proporcional à quantidade de DNA presente na amostra.

Como existem vários fluoróforos que emitem fluorescência em vários comprimentos de onda diferentes, é possível realizar um *multiplex PCR*, reação de amplificação de mais de um fragmento de DNA ao mesmo tempo. É possível a reação de várias regiões ao mesmo tempo, respeitando as temperaturas de anelamento dos *primers* e a eficiência da enzima.



**Figura 2.11:** Desenho esquemático do sistema de sonda fluorescente.

Atualmente a QPCR é utilizada para diversas finalidades incluindo o diagnóstico clínico, como doenças infecto contagiosas, identificação de mutações relacionadas ao câncer em diversos

sistemas, para identificação de micro-organismos de interesse médico e industrial.

## 2.6 Sequenciamento de DNA

39

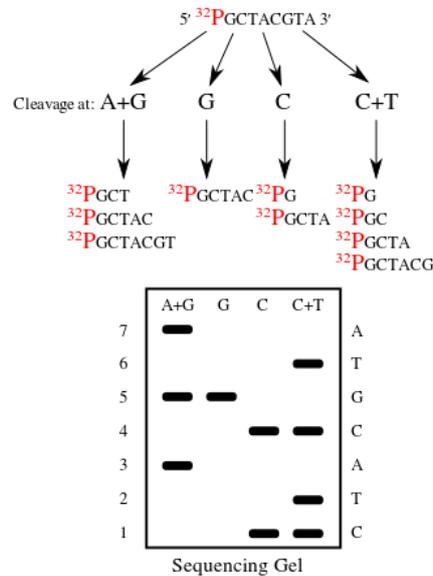
Desde a identificação da estrutura em dupla hélice da molécula de DNA por Watson e Crick que os pesquisadores imaginavam poder identificar toda a sequência das bases do genoma humano. Essa informação é de suma importância para a identificação de mutações que são, por exemplo, a raiz de uma série de doenças genéticas humanas bem como a causa de vários tipos de câncer.

Com a finalidade de identificar a sequência de bases de uma cadeia de DNA Allan Maxam e Walter Gilbert em 1977 desenvolveram o método de sequenciamento por degradação química, no qual empregavam substâncias químicas que degradavam o DNA em pontos específicos (bases nitrogenadas). Dessa maneira eram obtidos vários fragmentos de DNA, mas cada um deles era clivado em pontos específicos.

A reação de degradação química ocorria em quatro tubos separados, contendo cópias do mesmo fragmento de DNA. No

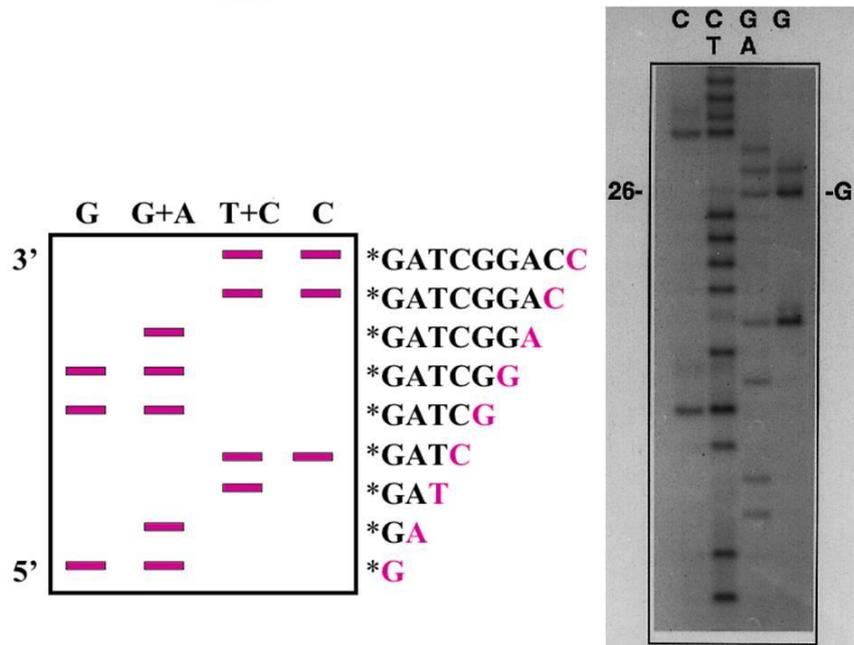
primeiro tubo ocorria a clivagem do DNA em pontos com a base guanina (G) especificamente. Em um segundo tubo a clivagem ocorria para a base adenina (A), porém reação inespecífica ocorria para a base A. No terceiro tubo a reação de clivagem ocorria para a base timina (T), com reação inespecífica para a citosina (C). Finalmente, em outro tubo ocorria a clivagem específica da base C. Essas reações eram então, colocadas em um gel de agarose ou poliacrilamida e submetidas à eletroforese. Ao final, comparava-se manualmente o padrão de migração comparando-se as bases e montando a sequência (fig. 2.12).

Para que fosse possível a visualização dos produtos do sequenciamento, nas reações precisava ser incorporado um isótopo radioativo, que sensibilizava um filme e as reações de clivagem poderiam então ser visualizadas.



**Figura 2.12:** Esquema mostrando o sequenciamento por degradação química.

Como para a obtenção dos resultados utilizavam-se quatro reações separadas sendo que duas eram inespecíficas e a leitura dos resultados era totalmente manual (fig. 2.13), dependendo exclusivamente do analista, a leitura era complexa, cansativa e frequentemente sujeita a muitos erros, não era comumente utilizada em diagnósticos, ficando restrita a poucos pesquisadores, além do fato de se utilizar isótopos radioativos para a revelação, o que era mais um problema à execução.



**Figura 2.13:** Esquema ilustrando a leitura dos dados do sequenciamento de Maxam e Gilbert. À esquerda vemos uma representação de um gel e à direita imagem real do gel, evidenciando a dificuldade de leitura dos resultados.

Praticamente um ano após a inovação de Maxam e Gilbert, Frederick Sanger inovou o sequenciamento com seu método dideoxi ou de terminação da cadeia.

O princípio da técnica de Sanger baseia-se na síntese enzimática de uma fita complementar ao DNA, cujo crescimento é interrompido pela adição de um dideoxinucleotídeo (ddNTP) (fig. 2.14), ao invés da adição de um deoxinucleotídeo (dNTP).

Os dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) são fundamentais para a síntese da cadeia de DNA, uma vez que compõe a matéria-prima fundamental para formação da nova fita.



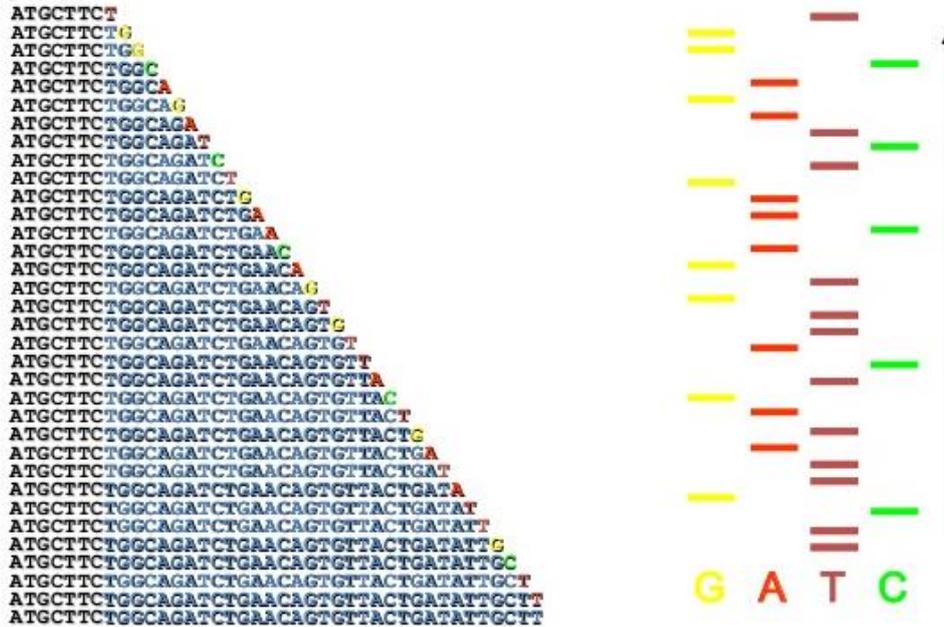
**Figura 2.14:** Comparação entre o ddNTP e o dNTP. A diferença encontra-se na região da hidroxila do dNTP.

Para que a DNA polimerase possa incorporar uma nova base à molécula de DNA em síntese, existe a necessidade da existência da hidroxila (OH) no carbono 3 (3') da pentose, pois nesta posição ela fará a ligação com o carbono 5 (5') da outra base. Como o ddNTP não apresenta este radical e sim apenas um hidrogênio, a enzima não consegue continuar a polimerização e a reação para, terminando neste dideoxi.

Na reação de sequenciamento são adicionados praticamente os mesmos elementos de uma PCR, com adição de ddNTPs, em

proporção menor que os dNTPs. A incorporação de dNTP ou de ddNTP é aleatória e, como as proporções são diferentes, uma maior quantidade de dNTP é adicionada, fazendo com que a fragmentos de todos os tamanhos sejam gerados, pois a incorporação das cadeias terminais ocorre em todas as bases em fitas distintas (fig. 2.15).

Essas reações também aconteciam em tubos separados pois estes ddNTPs eram marcados com elementos radioativos e não existiam mecanismos para diferenciá-los. Com o advento de fluoróforos, nos anos 80, foi possível a realização das reações em um único tubo, melhorando a reação de uma forma geral e a leitura dos resultados.



**Figura 2.15:** Sequenciamento de Sanger. Reações específicas realizadas em tubos separados.

Nos anos 1980 essa metodologia foi aprimorada com o desenvolvimento de sequenciadores automatizados, nos quais ao mesmo tempo que a eletroforese acontecia, os resultados já eram automaticamente obtidos, facilidade proporcionada pelos leitores ópticos e os fluoróforos.

Inicialmente os sequenciadores utilizavam placas grandes de vidro com gel de poliacrilamida sendo posteriormente substituídas por capilares contendo o gel em seu interior. O método de Sanger é utilizado até hoje, porém como sua eficiência fica restrita para a

escala de 1000 bases, novas e mais complexas tecnologias foram desenvolvidas, como o pirosequenciamento, por exemplo.

Com o desenvolvimento de sequenciadores automatizados foi possível a conclusão de diversos projetos de biotecnologia incluindo o projeto genoma humano, que desvendou a sequência de bases dos genes podendo-se dessa forma identificar mutações e associá-las com determinadas doenças genéticas. Muitas doenças ainda permanecem em estudo utilizando-se tanto a técnica de Sanger quanto tecnologias mais modernas.

As aplicações do sequenciamento hoje em dia vão desde o teste de paternidade, como a identificação de mutações em ponto (apenas um par de base no gene) que estão associadas a doenças genéticas raras.

### 3. Terapias Moleculares

Doenças genéticas são definidas como desordens ou disfunções geneticamente determinadas, seja pela mutação em um ou mais genes seja pela alteração cromossômica.

Com o advento de técnicas modernas em biologia molecular, ficou mais fácil identificar as doenças e seus causadores tornando possíveis o desenvolvimento de testes genéticos mais modernos ou eficazes. Tais testes são definidos como a análise dos cromossomos, do DNA, do RNA ou proteínas a fim de determinar anormalidades que possam causar uma doença genética.

T. Avery e seus colaboradores, em 1944 mostraram que era possível transferir genes de uma cepa bacteriana patogênica para outra não patogênica, identificando o DNA como portador da informação genética. Essa descoberta com a de Watson e Crick foram o empurrão inicial para as tentativas de manipulação genética.

Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas na área de terapia gênica, que visa amenizar os sintomas ao invés de agir na causa primária que é o gene. Não há como sanar definitivamente

uma doença genética uma vez que o problema está no genoma de todas as células do indivíduo, porém a finalidade da terapia é amenizar os sintomas permitindo que o indivíduo tenha melhor qualidade de vida e/ou possa prolongar sua vida.

Dentre as diversas tecnologias empregadas atualmente, todas têm em comum: introdução de material genético para atuar na causa fundamental da doença, que é o gene, fragmento gênico ou oligonucleotídeos.

As terapias gênicas têm como alvo as células germinativas ou as células somáticas. Na primeira, a modificação de gametas visa modificar definitivamente o genoma de um indivíduo, fazendo com que o embrião apresente características distintas das apresentadas pelo organismo que deu origem a ele. Porém qualquer alteração inadequada pode levar a um problema mais grave do que aquele que se tenta corrigir ou alterar.

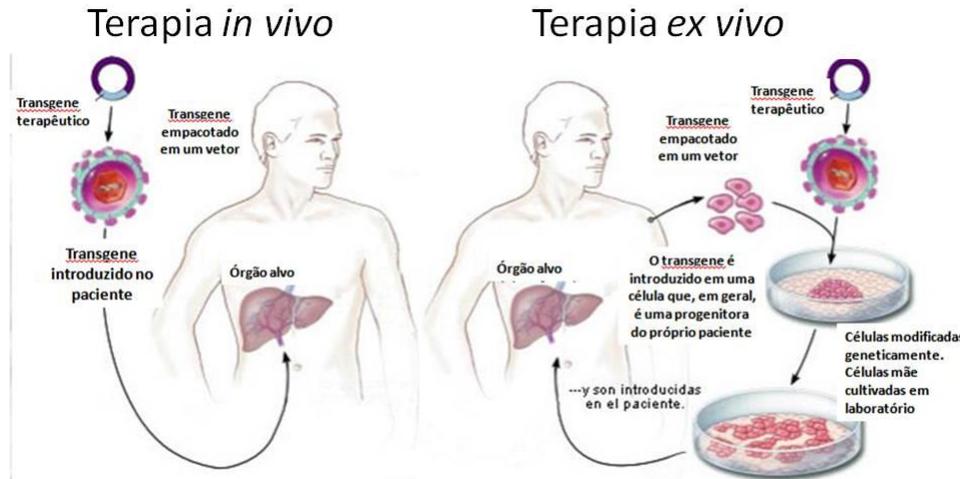
Já a terapia de células somáticas, tem como finalidade a alteração de um grupo de células, que, a partir da alteração, irão produzir algum produto que antes não produziam ou pararão de produzir algo que está sendo erroneamente produzido. É mais viável,

pois pode ser mais controlado e pode ser realizado em um indivíduo adulto.

A terapia gênica ocorre nas células, podendo ser denominada terapia *in vivo* ou terapia *ex vivo* (fig 3.1).

Na terapia *in vivo* as células do paciente são tratadas no próprio corpo do paciente. A modificação genética irá ser realizada no órgão-alvo em questão. A partir daí o tecido em questão passará a apresentar as características da modificação em questão.

Na terapia *ex vivo* as células do paciente são retiradas e manipuladas geneticamente em laboratório. Estas células são cultivadas *in vitro* para que se aumente o número, pois agora todas apresentarão a alteração e posteriormente por técnicas genéticas, elas são reimplantadas no paciente. Agora de volta ao corpo do paciente, com a alteração genética, irão manifestar as características desejadas.



**Figura 3.1:** Esquematisação dos modelos *in vivo* e *ex vivo*.

Nem todas as células são alvos potenciais para a terapia gênica. Os tecidos dos mamíferos apresentam características muito diversas uns dos outros, isto porque suas células apresentam inúmeras variações entre si, por apresentarem necessidades e funções diferentes. Por essa razão, o metabolismo de cada grupo celular dos diferentes tecidos do corpo difere bastante influenciando na vida celular e na forma como ela reage a produtos externos e manipulações em seu genoma. Dessa maneira, para um grupo de células ser um alvo potencial de terapia, precisam ser acessíveis, possuir tempo de vida longo no corpo e alta taxa de proliferação. Abaixo estão citados os tipos de células mais favoráveis para esse fim:

- Células tronco (medula óssea - cordão umbilical)
- Linfócitos
- Fibroblastos de pele
- Células musculares (mioblastos)
- Células vasculares endoteliais
- Hepatócitos

Para que a terapia celular tenha sucesso, necessita-se de uma introdução adequada do material genético no interior da célula. Para isso existem algumas estratégias utilizadas, uma vez que células eucariotas são formadas por membranas celulares, que apresentam uma bicamada lipídica, estrutura impermeável em alguns casos. Essas estratégias são chamadas de técnicas de introdução de genes.

As técnicas para introduzir os genes nas células de mamíferos podem ser classificadas em sistemas virais e não virais. Os não virais incluem a injeção dos genes sem a utilização de sistemas biológicos. Já os virais, são aqueles que utilizam os sistemas biológicos sendo que, os mais comuns são os vírus.



### 3.1 Sistemas não virais

O desenvolvimento de novos vetores genéticos tem buscado superar os problemas encontrados nos trabalhos iniciais de terapia gênica. Cada vez mais as novas tecnologias permitem que os vetores se tornem mais e mais eficientes na internalização e eficiências de genes externos à célula.

Para esses sistemas de injeção de DNA temos técnicas que utilizam métodos físicos ou químicos para a injeção, sendo que os principais são (fig. 3.2):

- microinjeção de DNA
- eletroporação (choque elétrico)
- biobalística (gene gun)
- precipitado de fosfato de cálcio
- lipossomos

**Microinjeção de DNA:** consiste na injeção direta de fragmentos de DNA (genes) no núcleo de uma célula. Normalmente utiliza-se a terapia *ex vivo* para a manipulação celular ou *in vivo*, quando o alvo da terapia é o embrião. São utilizados micro injetores que conseguem

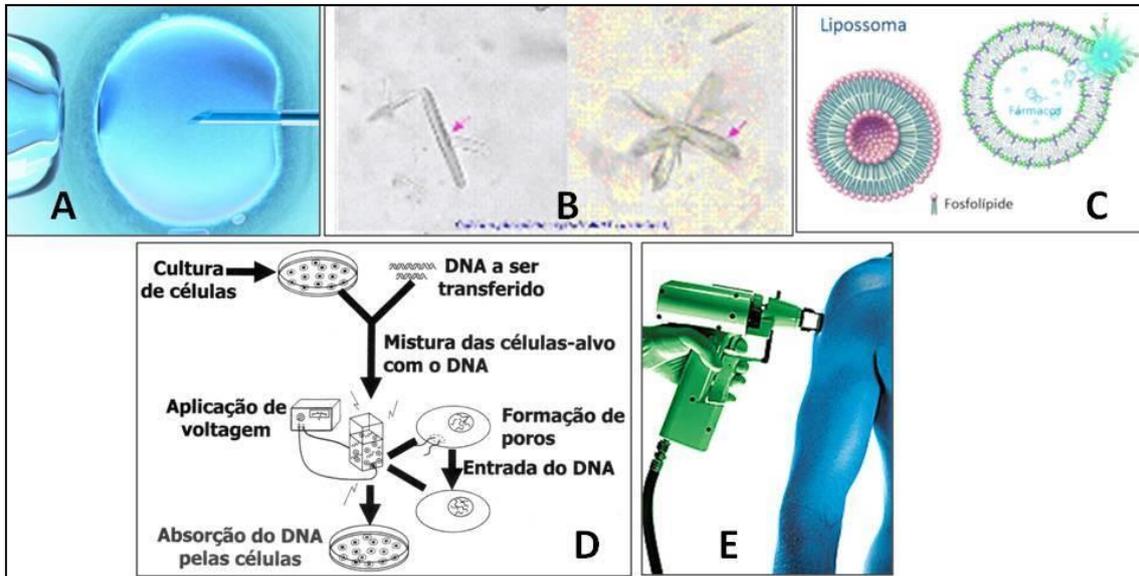
atravessar as membranas biológicas e entregar o gene no local correto. As membranas recuperam-se e a célula passa a sintetizar os produtos dos genes novos.

**Eletroporação:** consiste na injeção de DNA na célula-alvo por corrente elétrica. As células-alvo do paciente são removidas, por biópsia ou outra técnica. Essas células são levadas ao laboratório e lá o gene de interesse é inserido nelas por uma corrente elétrica, que permeabiliza as membranas celulares. Tal processo é chamado eletroporação. Estas células, ainda em laboratório, são propagadas para aumentar a quantidade. Após estes processos, as células são reinseridas no paciente.

**Biobalística:** consiste na injeção de DNA por meio de micro esferas utilizando-se uma pistola de alta pressão. As partículas de DNA de interesse são conjugadas com ouro ou tungstênio com a utilização de uma pistola de alta pressão, são inseridas no interior celular. Uma vez na célula, o gene é inserido e os produtos sintetizados.

**Transfecção com fosfato de cálcio:** consiste na internalização de um precipitado de DNA com fosfato de cálcio. Prepara-se um conjugado DNA-fosfato de cálcio que precipita-se. Este precipitado, como não atravessa a membrana celular, é endocitado pela célula. No citoplasma o DNA desassocia-se e chegando ao núcleo irá associar-se ao genoma.

**Lipossomas:** consiste em moléculas de dupla camada lipídica que irão internalizar o DNA. Prepara-se uma fração aquosa de DNA e lipídios e estes são envoltos pela molécula de lipossoma. Essas moléculas são levadas aos sistemas de lisossomos e dessa forma o DNA pode ser internalizado.



**Figura 3.2:** Sistemas não virais de injeção de DNA. A microinjeção. B precipitação com fosfato de cálcio. C Lipossomas. D eletroporação. E *gene gun*.

### 3.2 Técnicas que utilizam vetores biológicos

Os vetores biológicos para a internalização de fragmentos de DNA têm sido utilizados com grande sucesso desde o início de sua utilização. Maior sucesso é obtido ao utilizar vírus como vetores e seu sucesso deve-se a uma razão muito simples, são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, sempre parasitam células e injetam seu material genético nelas. Alguns vírus conseguem, além de infectar as células de mamíferos, integrar seu genoma no genoma

hospedeiro, sendo desta forma um vetor quase perfeito. Por essa razão, ainda hoje, os vírus são os mais utilizados.

Os vetores biológicos utilizados são:

- Retrovírus (RNA)
- Adenovírus (DNA)
- Adenovírus associado-AAV (parvovírus)
- Lentivírus (retrovírus → cels. não dividem)
- Herpes vírus (invadir neurônios)
- Cromossomo artificial

**Retrovírus:** são vírus que apresentam RNA como material genético e por essa razão precisam carregar consigo uma enzima que seja capaz de sintetizar DNA a partir de uma molécula de RNA, o que as células de mamíferos são incapazes de fazer. Esta enzima é chamada de transcriptase reversa e é ela que dá nome a estes vírus.

Os retrovírus são os vetores ideais para a transferência de genes em células humanas pois são capazes de infectar quase 100% das células-alvo em divisão além de integrar seu genoma no genoma hospedeiro. Além disso são capazes de carregar fragmentos relativamente grandes de DNA (8000 bases). Porém apresentam a

desvantagem de infectar somente células em divisão constante, pois precisam de sua maquinaria replicativa.

Alguns problemas ao longo do tempo foram associados à utilização de retrovírus como vetores. A inserção casual do DNA no genoma das células hospedeiras pode inativar um gene importante, o que levará à morte celular. Também pode ativar um oncogene, o que pode alterar o padrão normal de controle e divisão celular culminando no desenvolvimento de algum tipo de câncer. Pode também causar algum tipo de mutação nova levando às mais diversas patologias.

**Adenovírus:** grupo de vírus muito frequentes de genoma de DNA dupla hélice que sobrevivem por longos períodos fora do hospedeiro, sendo vírus extremamente resistentes ao ambiente, por não possuírem envelope lipídico, que apesar de conferir proteção em determinadas situações, no ambiente em geral confere resistência.

Este vetor tem sido muito utilizado em pesquisas contra o câncer, pelas características virais e o padrão de duplicação de uma célula cancerígena.

Os adenovírus infectam grande variedade de tecidos, conferindo a eles grande versatilidade na sua utilização. Não apresentam a propriedade de se integrarem no DNA das células hospedeiras, diminuindo as chances de desregulação do ciclo celular, principalmente por não ativarem proto-oncogenes. Além disso, aceitam inserções de grande fragmento de DNA, de até 30.000 bases. Outra vantagem importante é o fato de penetrarem em células que não se multiplicam, tornando-os versáteis em relação aos tipos de tecidos que podem ser utilizados.

Por outro lado, apresentam desvantagens quando comparados aos retrovírus, pois por não integrarem ao genoma da célula hospedeira, têm sua eficiência reduzida. Além disso, apresentam altas taxas de resposta imunológica, diminuindo a eficiência do tratamento. Outro fator importante é o fato de que quando esses vírus são utilizados *in vivo*, tem baixa taxa de entrega dos genes, pois eles apresentam uma expressão transitória, que diminui ao longo do tempo.

**Outros vírus:** outros tipos virais têm sido utilizados na terapia gênica, como os lentivírus e os herpesvírus. Tanto um como o outro

têm maiores desafios a serem vencidos e não são tão eficientes como os outros descritos acima. Os herpesvírus apresentam a vantagem de infectarem neurônios e representam grande potencial futuro para tratamento de doenças neurológicas. Já os lentivírus apresentam longos períodos de incubação, podendo representar vantagens quando se quer que os produtos sejam sintetizados mais tardiamente.

**Cromossomo artificial:** pesquisas inovadoras têm desenvolvido cromossomos artificiais, que podem substituir ou complementar genes defeituosos ou que apresentam genes alterados. Como trata-se de um componente artificial, aprimoramentos são necessários para aumentar sua eficiência e funcionalidade.

### 3.3 Células Tronco

O termo célula tronco é derivado do inglês, *stem cell*, e refere-se a células indiferenciadas, sem função específica nos tecidos, capazes de se multiplicar mantendo-se indiferenciadas por longos períodos (tanto *in vitro* como *in vivo*), mas que diante de estímulos

específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais dos tecidos.

Este tipo celular tem ganhado repercussão importante, principalmente a partir dos anos 2000 devido sua grande capacidade de dar origem a vários tecidos e surgiram como promessas para o tratamento de inúmeras doenças. Características recentemente descobertas em relação ao potencial destas células para regenerarem tecidos que, até pouco tempo, eram considerados sem nenhuma capacidade regenerativa, trouxeram novas perspectivas para a melhora de sintomas e até mesmo cura de doenças e condições antes tratadas como sem tratamento.

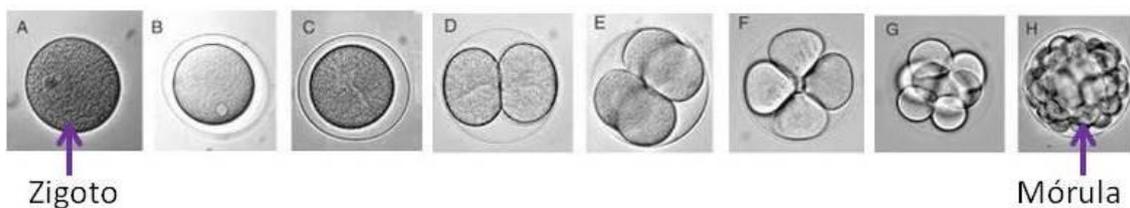
Hoje é grande a quantidade de pesquisas e tratamentos disponíveis utilizando-se as células tronco, sendo que estas podem ser obtidas, basicamente, de duas fontes, levando-as a serem classificadas em **células tronco adultas**, que são obtidas a partir de tecidos que se encontram em uma fase pós embrionária, ou seja, fase adulta. São as células do feto, de crianças e de adultos. Podem ser classificadas em **células tronco embrionárias**, pluripotentes (capazes de originar todos os tecidos de um indivíduo adulto)

presentes apenas nos embriões. Tal célula pode ser cultivada *in vitro* para propagação.

Em relação à sua plasticidade, ou seja, capacidade de originar vários tecidos de um adulto, as células tronco podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes ou multipotentes.

### Células tronco totipotentes

Também conhecido como célula-ovo ou óvulo fecundado, é o tipo de célula tronco capaz de originar todos os tecidos fetais, incluindo extra-embriônicas (zigoto até a mórula). Pode também ser obtida de forma híbrida por transferência de núcleo somático. Estas células não perduram por muito tempo, desaparecendo pouco tempo após a fecundação (fig 3.3)



**Figura 3.3:** evolução embriológica desde o zigoto até a mórula. Células tronco totipotentes.

## **Células tronco pluripotentes**

É o tipo de célula tronco capaz de originar todos os tecidos de um indivíduo adulto (excluindo as membranas embrionárias – Placenta e anexos).

Estão células tem sido muito estudadas desde a descoberta de seu potencial, incluindo a utilização de animais transgênicos, possuindo grande variedade de aplicações clínicas e comerciais. Estas células também estão presentes nos adultos e tem capacidade de originar células do tecido onde estão e algumas podem originar até mesmo células de outros tecidos.

## **Células tronco multipotentes**

São células tronco que podem produzir células de várias linhagens (células tronco adultas), conseguindo diferenciar-se apenas em alguns tecidos. Isso ocorre porque estas células, em termos de células tronco, são as mais diferenciadas.

Em relação à capacidade de originarem as células adultas, ainda podem ser classificadas em **oligopotentes**, podendo produzir células dentro de uma única linhagem (células tronco adultas) e

**unipotentes**, que produzem somente um único tipo celular maduro (célula tronco adulta).

As vantagens de utilização de células tronco bem como seu potencial regenerativo tem se tornado de grande importância para a medicina e algumas linhagens em especial tem tido destaque como as células tronco hematopoiéticas, células tronco neuronais, células tronco do tecido muscular e as células tronco epiteliais.

## **4. Aplicações Biotecnológicas**

### **4.1 Biofármacos**

Não é de hoje que os seres humanos utilizam produtos naturais encontrados em plantas e produzidos por animais para a cura ou alívio de doenças. Os biofármacos ou medicamentos biológicos tratam-se de fármacos obtidos por via biológica.

Sabe-se que desde a antiguidade os humanos eram capazes de utilizar compostos produzidos por micro-organismos para curar doenças, mas esses eram compostos naturalmente produzidos por eles, seja como metabólitos, seja para sua defesa. Os biofármacos atuais somente foram possíveis de se obter com o advento da

biotecnologia e suas técnicas de engenharia genética, pois tratam-se de moléculas produzidas biologicamente após algum tipo de transformação gênica.

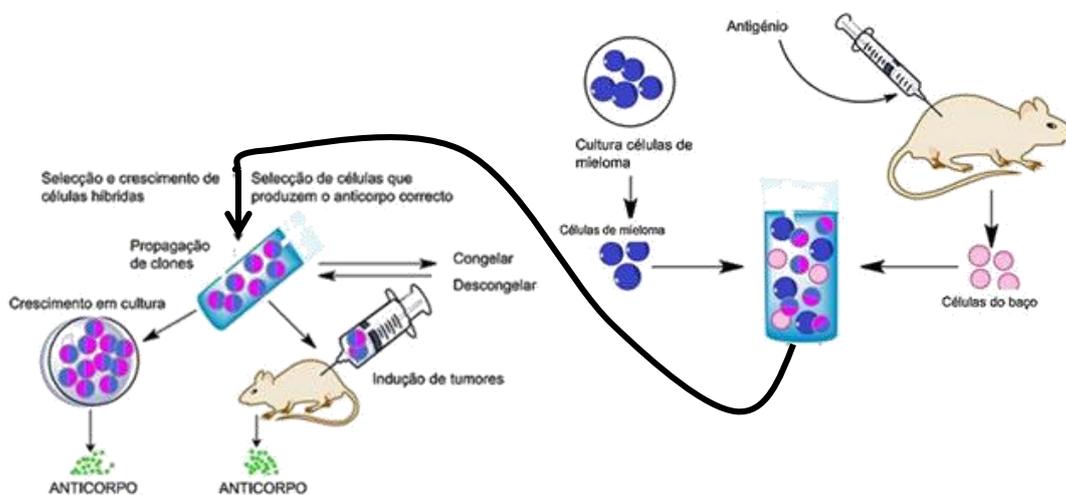
Esses compostos são, em geral, proteínas ou ácidos nucleicos baseados em substâncias farmacêuticas usado em terapia ou diagnóstico *in vivo*, os quais são produzidos de uma fonte biológica natural.

Atualmente cerca de 80% dos fármacos produzidos no mundo ainda são de origem sintética, porém em torno de 50% dos que estão em desenvolvimento são biofármacos.

Um dos precursores da era dos biofármacos é a insulina humana produzida por biotecnologia, a *Humulin N* (NPH), há cerca de 30 anos, tem sido de suma importância para os milhões de pacientes acometidos pela diabetes. Produzida em bactérias, esta molécula tem sido empregada com grande sucesso em vários países do mundo. Outra classe de biofármacos são as enzimas, importantes para o tratamento de doenças hematológicas ou de origem digestória. Podemos citar também os fatores sanguíneos de coagulação, como os fatores envolvidos nas hemofilias, doença hemorrágica de grande importância clínica. Hoje em dia existe um

número de pesquisas relacionadas aos anticorpos, principalmente aquelas que envolvem o câncer.

A produção em larga escala dos biofármacos envolve, basicamente, dois processos. Um deles é a clonagem molecular, já abordado anteriormente. O outro processo são os chamados hibridomas (fig 4.1), comuns na produção de anticorpos monoclonais. Esta técnica baseia-se na obtenção das células produtoras de anticorpos monoclonais anti-hemácias de carneiro, por meio da fusão de células mielômicas e linfócitos B de camundongos imunizados com hemácias de carneiro, utilizado o vírus Sendai inativado como agente indutor da fusão. Este é o modelo clássico, sendo que novas técnicas estão sendo utilizadas em conjunto com esta.



**Figura 4.1:** Esquema mostrando a técnica de hibridoma, utilizada na produção de anticorpos monoclonais.

#### 4.1.1 Proteínas e Polipeptídeos

Inicialmente, o processo de produção de medicamentos biológicos era restrito. Tratava-se de polipeptídeos ou proteínas com a sequência de aminoácidos idêntica à proteína humana nativa, sendo conhecidos como **biofármacos de primeira geração**. A preparação destas substâncias consiste na transfecção do gene humano para sistemas adequados. Após a síntese em microorganismos, tais biofármacos são isolados e purificados, podendo agora ser utilizados por humanos como medicamentos.

Biofármacos sintetizados com propriedades terapêuticas previamente planejadas são classificados como **biofármacos de segunda geração**, ou seja, o gene de interesse foi modificado conforme necessidade específica, antes da transfecção, polipeptídeos ou proteínas com a sequência de aminoácidos idêntica à proteína humana nativa. Com este modelo, pode-se alterar alguma característica ou melhorar uma proteína ou polipeptídeo, como:

- acelerar ou retardar o pico de atividade biológica do produto;
- alterar o tempo de meia-vida;



- alterar a imunogenicidade;
- desenvolver proteínas terapêuticas híbridas.

Quase sempre há uma preferência e torna-se vantajoso realizar modificações nas propriedades farmacocinéticas das proteínas recombinantes. Um bom exemplo são as alterações na estrutura da insulina humana, que forneceram aos diabéticos uma forma de hormônio que não se autoassocia durante o armazenamento, sendo também de ação mais rápida e mais fácil de manipular.

Os **biofármacos de terceira geração** utilizam os mesmos princípios dos de segunda geração, a grande diferença está no seus alvos. As modificações decorrentes desta geração têm como alvo doenças que, classicamente, têm maiores dificuldades clínicas, como as crônico-degenerativas; a inflamação, principalmente quando ela se apresenta de forma crônica; o câncer e as doenças genéticas raras, sendo que muitas delas só foram identificadas recentemente.

## 4.2 Vacinas

Desde os primórdios da medicina que o homem procura métodos que o previnam de contrair infecções. Mesmo no Antigo Egito ou na Grécia Antiga, por exemplo, já se especulavam propriedades protetoras contra infecções vindas de agentes externos.

A vacinação teve seu início no final do século XVIII, quando Edward Jenner, em 1796, observou que pessoas que contraíram a varíola bovina estariam protegidas da infecção pela varíola humana. Desde então, as propriedades imunológicas foram cada vez mais sendo desvendadas e utilizadas em benefícios imunizantes.

As vacinas são substâncias que tem como princípio ensinar o sistema imunológico a reconhecer agentes agressores e, assim, estimular a produção de anticorpos específicos para combatê-los, sem permitir que a doença se desenvolva. Apesar do princípio básico, elas podem ser classificadas em atenuadas, inativadas, conjugadas, combinadas e vacinas de DNA.



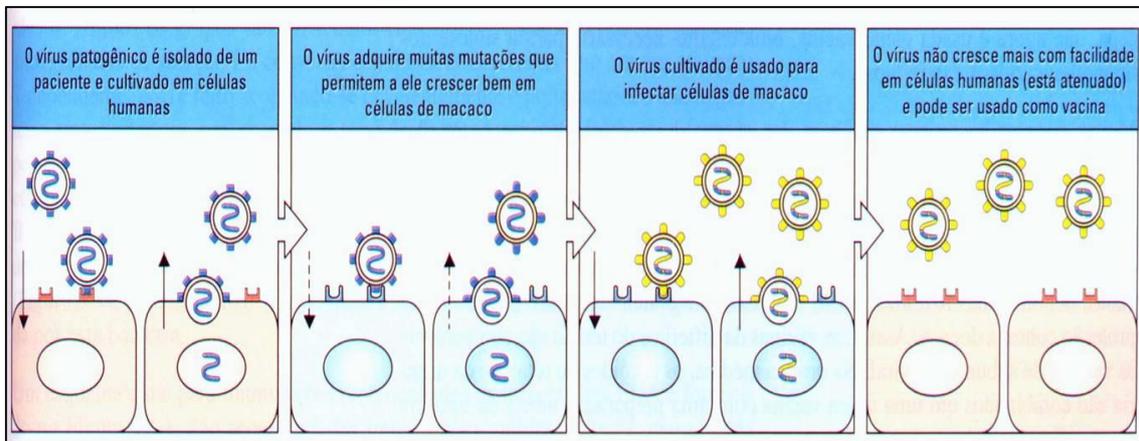
#### 4.2.1 Vacinas atenuadas

As vacinas atenuadas são produzidas com bactérias ou vírus vivos, porém cultivados em condições adversas, dessa forma perdem a capacidade de provocar a doença. Apesar da atenuação, este tipo de vacina não é 100%, pois como os micro-organismos ainda estão vivos, pode ocorrer que uma pequena porção ainda possa ter capacidade de causar doenças.

O mecanismo de atenuação provoca um enfraquecimento nos micro-organismos e pode ser obtido, por exemplo, provocando mutações que interfiram em processos essenciais para o desenvolvimento do micro-organismo (fig 4.2).

Como os agentes infecciosos continuam vivos e suas estruturas íntegras, este tipo de vacina apresenta melhores propriedades de imunogenicidade, ou seja, tem melhor resposta imunológica se comparada à vacina inativada.

Podemos citar como exemplos as vacinas contra sarampo, caxumba, rubéola, varicela, febre amarela, rotavírus e poliomielite (oral) são exemplos de atenuadas virais. Já as vacinas BCG (contra tuberculose) e contra a febre tifoide (oral) são atenuadas bacterianas.



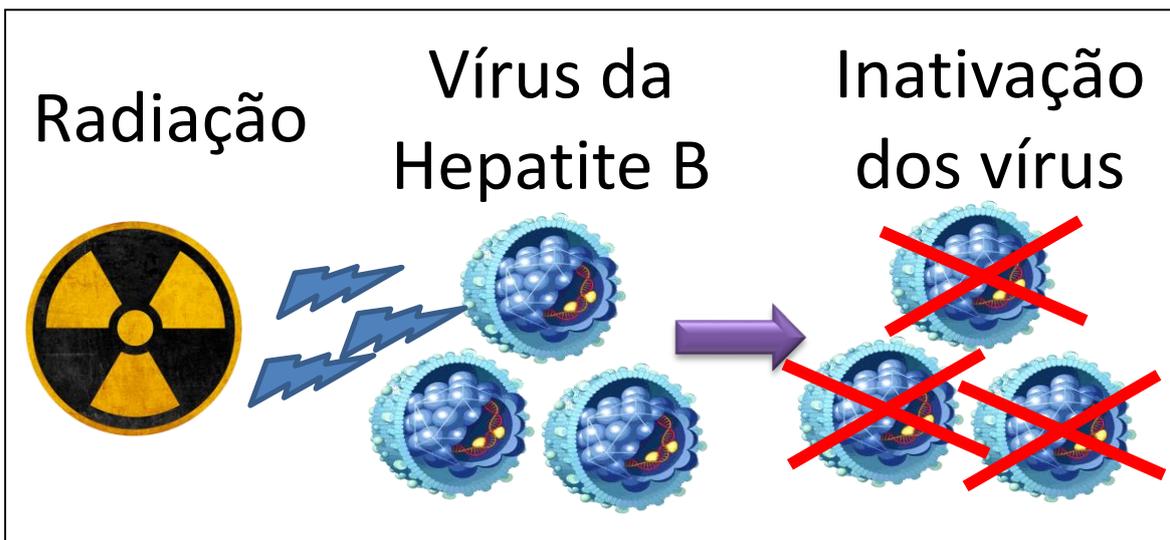
**Figura 4.2:** Mecanismo de atenuação das vacinas. Modificações no micro-organismo dificultam sua patogenicidade.

#### 4.2.2 Vacinas inativadas

São vacinas compostas de micro-organismos inativados, o que significa que estes não mais se encontram vivos, dessa forma são incapazes de multiplicarem-se. Os processos de inativação tratam-se, em geral, de processos químicos ou físicos. Ex: radiação, calor ou tratamento com formaldeído (fig 4.3).

A resposta imune à vacina inativada é principalmente humoral, com pouca ou nenhuma imunidade celular. Como os agentes patogênicos estão mortos, não existe a preocupação com potenciais doenças envolvendo as vacinas, porém apresentam menor eficácia de imunização, quando comparadas às atenuadas, dessa forma

requerem múltiplas doses para produzir imunidade e, eventualmente, necessitam de uma dose de reforço para a manutenção da imunidade.



**Figura 4.3:** Ilustração do mecanismo de inativação das vacinas. No exemplo vemos a inativação do vírus da hepatite B por radiação.

Como exemplos de vacinas inativadas temos: virais - são as vacinas da poliomielite (parenteral), hepatite A, hepatite B, raiva, influenza e HPV. Bacterianas - são a DTP (contra difteria, tétano e coqueluche) e a vacina contra febre tifoide.

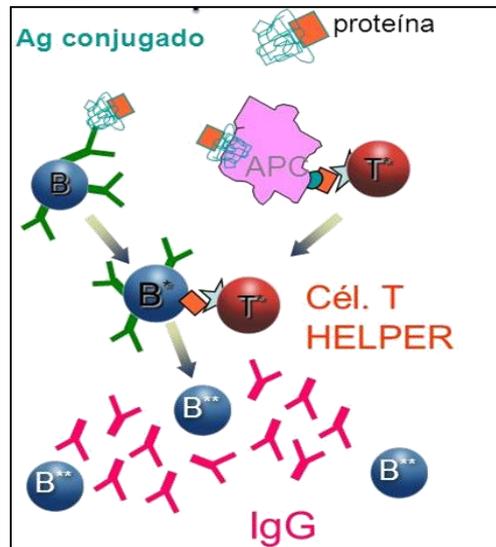


### 4.2.3 Vacinas conjugadas

Vacinas conjugadas são produzidas utilizando componentes específicos do agente patogênico, como uma proteína ou carboidrato, capazes de produzir uma resposta imunológica. Geralmente são utilizadas contra diferentes tipos de doenças causadas por bactérias chamadas encapsuladas (que possuem capa protetora composta por polissacarídeos, substâncias parecidas com açúcares).

Para que este tipo de vacina possa provocar resposta imune é preciso utilizar um carboidrato associado (conjugado) à uma proteína (fig. 4.4). Uma característica importante deste tipo de imunização é a longa duração delas, aumentando o intervalo entre as doses.

Podemos citar como exemplos deste tipo vacinal a Pneumocócica infantil e a Hemófilos Tipo B.



**Figura 4.4:** Esquema mostrando o processo de conjugação das vacinas com proteínas.

#### 4.2.4 Vacinas combinadas

As vacinas combinadas apresentam antígenos de mais de um agente infeccioso, protegendo contra diferentes doenças com apenas uma aplicação. A grande vantagem deste tipo vacinal é a única aplicação necessária, substituindo a aplicação das vacinas em separado, diminuindo os efeitos colaterais, como febre, mal-estar e dor.

Como exemplos desta vacina temos a hexa que é a combinação de difteria, tétano, coqueluche, pólio inativada, HIB e

hepatite B e a vacina tríplice viral, que protege contra Sarampo, Caxumba e Rubéola.

#### **4.2.5 Vacinas de DNA**

74

As vacinas de DNA tratam-se de um fragmento de DNA codificador de proteína imunogênica ou imunomoduladora. Estas vacinas são produzidas com a utilização de vetores de clonagem bacterianos, amplificando o fragmento de DNA de interesse.

Esse tipo de vacina tem despertado grande interesse e promete grandes avanços na medicina pela sua especificidade, por não utilizar os micro-organismos em questão, por ativarem memória imunológica e pelo fato de poderem ser utilizados, além da proteção clássica contra agentes patogênicos e contra células tumorais.

Estas vacinas ainda estão em desenvolvimento e não existem nos quadros de vacinação, porém pesquisas extensivas têm sido realizadas em várias áreas e já se tem boas perspectivas de sua utilização contra HIV, Malária, Raiva e Esclerose Múltipla. Algumas licenças já foram concedidas para utilização em animais como contra

o Vírus da Febre do Nilo Ocidental em equinos e o Vírus da Necrose Hematopoiética Infecciosa em salmão.

### **4.3 Diagnóstico e terapêutica de doenças**

75

Quando o foco é o tratamento e a terapia de doenças envolvendo a área biotecnológica, o mais utilizado são os processos que envolvem anticorpos. No sangue humano, aproximadamente 20% das proteínas encontradas no plasma sanguíneo são anticorpos, sendo que todos eles são produzidos quando há alguma substância estranha no organismo.

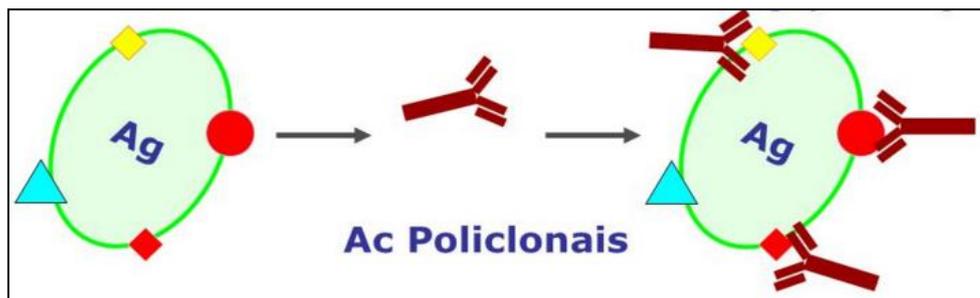
Essas substâncias, também chamadas de imunoglobulinas, são glicoproteínas com a função de reconhecer, neutralizar e opsonizar antígenos para que eles sejam eliminados ou fagocitados pelos macrófagos. Como os antígenos são inúmeros e extremamente específicos, os anticorpos também precisam seguir a mesma linha, sendo complementares a eles.

### 4.3.1 Anticorpos policlonais

São os anticorpos resultantes da ativação de vários linfócitos B, possuindo vários clones, ou seja, se originam de diferentes linfócitos B, o que significa que reagem com vários epítomos do antígeno (por exemplo, várias partes de uma proteína). São capazes de reconhecer múltiplos sítios de ligação do antígeno (fig 4.5).

76

Como possuem baixa especificidade não tem grandes usos na terapêutica, sendo mais utilizados em diagnóstico.



**Figura 4.5:** Esquema mostrando a atuação dos anticorpos policlonais.

### 4.3.2 Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais são resultantes da ativação de um só tipo de linfócito B, possuindo apenas clones únicos. Dessa forma apresentam a mesma especificidade, afinidade e estrutura, ligando-se ao mesmo epítopo no antígeno (fig. 4.6).

Dada a sua alta especificidade, tem sido utilizado cada vez mais nos tratamentos de diversas patologias, pois a resposta imune é mais precisa.



**Figura 4.6:** Esquema mostrando a atuação dos anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais de primeira geração são essencialmente monoclonais murinos (provenientes de camundongos), ou que contenham fragmentos deles, e apresentam vários inconvenientes. Como são proteínas derivadas do camundongo, normalmente provocam resposta imunológica adversa, clinicamente significativa, em 50% a 75% dos receptores. Eles também apresentam meia-vida curta na circulação e a incapacidade dos anticorpos do roedor em ativar o sistema do complemento humano. Para contornar esses problemas, foram desenvolvidos os

anticorpos monoclonais quiméricos ou humanizados (segunda geração).

Estes anticorpos estão presentes no corpo em resposta ao contato com um agente infeccioso, por exemplo, e por isso é de grande importância no diagnóstico clínico. A presença do anticorpo no soro de uma pessoa indica que houve contato com o agente patogênico e, na maioria das vezes que tem indicativo de sua pesquisa, os sinais clínicos do paciente estão relacionados com o agente em questão. Por essa razão que a pesquisa de anticorpos é de suma importância clínica, tratando-se de uma técnica simples e de fácil aplicação.

No diagnóstico, os testes são baseados na mudança de cor, fluorescência ou emissão de radioatividade, podendo-se diagnosticar interações antígeno-anticorpo (fig. 4.7).

Quando o parâmetro é a mudança de cor, podemos citar o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para diagnosticar a presença do vírus da hepatite C. Quanto maior a carga viral, maior a quantidade de anticorpos e, conseqüentemente, maior a formação de cor (reação imunocolorimétrica).

Um teste imune que utiliza fluorescência como parâmetro temos a pesquisa de herpesvírus por imunofluorescência. Como também se trata de reação antígeno-anticorpo, o princípio é o mesmo do anterior, alterando-se a forma de marcação, que se deve a um fluoróforo.

Um exemplo de reação antígeno-anticorpo que temos disponível e acesso fácil são os testes de gravidez. Nestes dispositivos temos uma membrana sensibilizada com anticorpos anti Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), que é um hormônio glicoproteico produzido pela placenta durante a gestação e encontrado na urina da gestante. Caso a mulher esteja grávida, a urina apresentará hCG que irá reagir com os anticorpos produzindo uma reação colorimétrica (fig. 4.7)



**Figura 4.7:** Dispositivo chamado de teste de gravidez. O positivo indica reação positiva da hCG com o anticorpo anti hCG.

Outra importante utilização de anticorpos, principalmente os monoclonais, é o tratamento de algumas enfermidades, como por exemplo os tumores. Já foram produzidos uma série de anticorpos contra células tumorais levando à resposta imune específica contra elas. A grande dificuldade de se tratar tumores é que são células pertencentes ao próprio corpo do paciente, sendo assim, o organismo não reconhece como estranha e elas passam a proliferar. O grande papel dos anticorpos monoclonais é induzir resposta imune específica contra estas células, fazendo com que o sistema imune possa atacá-las sem causar alterações em células normais.

Alvo importante também das terapias imunes com os anticorpos são as doenças autoimunes, também de difícil combate pois trata-se do sistema imune do paciente agredindo o próprio corpo, ou seja, em geral células normais. Neste tipo de tratamento temos o anticorpo monoclonal ligando-se às citocinas, que são proteínas que modulam a função de outras células regulando o sistema imune, inibindo-as.

Essas terapias com anticorpos, se não trazem cura para os pacientes, trazem alívio dos sintomas levando à melhora de sua

qualidade de vida e em muitos casos faz com que os pacientes que antes viviam bem debilitados, agora possam retomar muitas de suas atividades.

## **5. Perspectivas Futuras em Biotecnologia**

Ao longo da história da medicina, mesmo com o sucesso de várias terapias e tratamentos, as comunidades médica e científica viram-se impotentes diante de certos desafios como a impossibilidade do aumento da concentração do fármaco no sangue; o tempo de permanência do agente terapêutico na circulação, que em alguns casos apresenta-se abaixo do necessário e em outros acima; a baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais indesejáveis inerentes às terapias com doses elevadas.

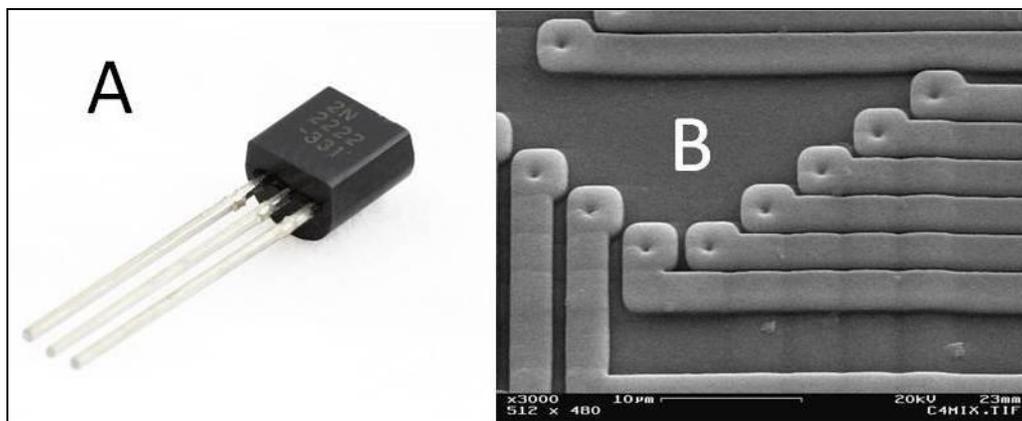
Essas questões relacionadas à efetividade dos fármacos tem boas perspectivas futuras na biotecnologia, principalmente com o advento e o aprimoramento das nanopartículas. Outro problema que esses avanços podem solucionar, é em relação à baixa solubilidade e biodisponibilidade de uma grande quantidade de moléculas descobertas farmacologicamente ativas.

As nanopartículas juntamente com outros avanços biotecnológicos permitem que os fármacos possam apresentar algumas características que levam à alta eficácia, como por exemplo um sistema eficaz de liberação de medicamentos, ou a biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de encapsulação, proteção de drogas, especificidade para células-alvo, estabilidade em meios biológicos, mecanismos de transporte através das membranas celulares e controle na liberação dos princípios ativos.

### 5.1 Nanobiotecnologia

A nanotecnologia é a compreensão e controle da matéria na escala nanométrica, em dimensões entre cerca de 1 e 100 nanômetros (nm), onde fenômenos únicos permitem novas aplicações. Um nanômetro (1nm) equivale a  $10^{-9}$  (0,000000001) metro, dessa forma a escala nanométrica, também dita microscópica, envolve as tecnologias que começaram a trabalhar com componentes nesta escala de tamanho.

O início da nanotecnologia deu-se em novembro de 1947, quando os cientistas do laboratório da *Bell Telephone* descobriram o transistor (fig 5.1), apesar de suas pesquisas tentarem ir para outra direção. Eles verificaram que quando aplicada certa tensão a um dos terminais do componente, o sinal que saía no outro terminal era amplificado. Sendo assim, o transistor se tornou o responsável pela amplificação de sinal, além de servir como um controlador que interrompe ou libera a passagem de corrente elétrica.

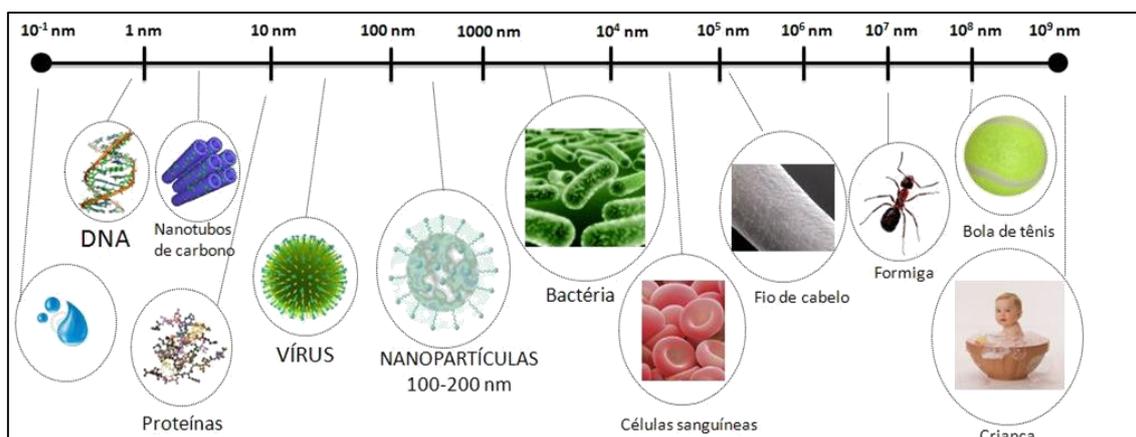


**Figura 5.1:** Em A vemos um transistor à olho nu e em B uma micrografia eletrônica de seus componentes.

Utilizando-se a escala nanométrica podemos fazer comparações entre o tamanho de estruturas e partículas que conhecemos e a partir daí entender qual a real dimensão das

nanopartículas. Por exemplo, a molécula de DNA tem aproximadamente 1 nm de comprimento (fig 5.2). Já uma bactéria tem em média 10.000 nm de comprimento e uma formiga tem  $10^7$  nm de comprimento.

Assim, a nanobiotecnologia apresenta biomoléculas e biofórmulas na escala nanométrica, com a finalidade de alterar ou aprimorar fármacos e outros tipos de tratamento em saúde.



**Figura 5.2:** A escala nanométrica.

As pesquisas e estudos em nanotecnologia/nanobiotecnologia devem obedecer alguns critérios, tanto para se enquadrar na categoria, como para normatizar todas as pesquisas e utilizações desta ciência. Estas características são:

1. Entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de fenômenos dependentes de tamanho permite novas aplicações.

2. Utilização das propriedades dos materiais em nanoescala que são diferentes das propriedades dos átomos individuais, moléculas, ou dos materiais macroscópicos, criando materiais, dispositivos e sistemas melhores que exploram essas novas propriedades.

### **5.1.1 Nanopartículas**

As nanopartículas são aquelas produzidas na escala nanométrica respeitando as características citadas acima.

Estas partículas são particularmente interessantes como formas farmacêuticas de sistemas de liberação de medicamentos, devido à sua composição variada, estrutura e características de superfície. As nanopartículas mais utilizadas em nanobiotecnologia são os lipossomas, as micelas, os dendrímeros, as nanoesferas e as nanocápsulas.

Anualmente são gastos cerca de 11 milhões de Euros com nanomateriais diversos sendo que as partículas hoje utilizadas em nanobiotecnologia são derivadas das partículas inicialmente desenvolvidas e hoje mais utilizadas, que são o Negro de Fumo e Sílica amorfa.

Segundo o centro de estudos e pesquisas clínicas dos Estados Unidos (clinicaltrials.gov), até dezembro de 2015 existem 204.330 estudos clínicos neste tema e 19.242 estudos publicados, sendo que a principal doença estudada é o câncer e a nanopartícula é a albumina.

O fármaco mais recorrente em biotecnologia é o Paclitaxel®, indicado como primeira e segunda linha de tratamento do carcinoma avançado de ovário. Este fármaco atua basicamente em duas vias. Uma delas tem como ação o bloqueio mitótico, estratégia utilizada pela célula tumoral para continuar sua proliferação. A outra ação está relacionada a formação do autofagossomo, levando à degradação celular.

## 5.2 Farmacogenômica

Como já vimos, pacientes diferentes com o mesmo diagnóstico clínico, submetidos ao mesmo tratamento, podem apresentar respostas diferentes, ou até mesmo, pode ocorrer de um paciente em específico não responder ao tratamento.

As variações na resposta ao tratamento podem ser decorrentes de vários fatores tais como doenças, diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, fatores ambientais e fatores genéticos, de grande importância e que vem recebendo cada vez mais estudos.

A farmacogenômica estuda as influências genéticas sobre as respostas a medicamentos, tendo como alvo os efeitos de genes e suas interações. Esse papel da associação dos genes com questões farmacológicas tem relação com a ação geral dos fármacos, uma vez que a maioria deles interagem com proteínas carreadoras, transportadoras ou enzimas de metabolização. São essas proteínas que determinam a absorção, distribuição, excreção, alcance no sítio de ação e a determinada resposta farmacológica.

De um indivíduo para outro existe uma variação da resposta dos fármacos. Na maioria das pessoas essa variação é inexpressiva, fazendo com que o fármaco tenha a resposta esperada. Porém uma parcela importante da população tem diversidades, seja na sua eficácia, seja nas reações adversas, nas interações medicamentosas ou na toxicidade do fármaco.

As respostas indesejadas ou inadequadas do fármaco ocorrem, pois a prescrição médica clássica envolve apenas os diagnósticos clínico e laboratorial, os efeitos adversos prescritos para os medicamentos e o histórico ou informações importante informadas pelos pacientes. Mas como já vimos, as reais interações serão mediadas pelo genoma do paciente, o que não é considerado no momento das prescrições.

O papel da farmacogenômica é a pesquisa de genes que predisponham o paciente a alguma doença ou condição de interferência no fármaco, genes que modulem a resposta a esses fármacos, genes que afetem a farmacocinética e farmacodinâmica e/ou que estejam associados a reações adversas.

### 5.2.1 Polimorfismos genéticos

Polimorfismos genéticos são variações nas sequências gênicas que ocorrem na população em geral de forma estável, sendo encontradas com frequência de 1% ou superior, sem apresentarem significado clínico. São esses polimorfismos, por exemplo, que são utilizados na realização de teste de paternidade, comparando os polimorfismos maternos e do indivíduo testado com os do suposto pai.

Dentre os polimorfismos estão as deleções, mutações, substituições de base única (em inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*, ou SNP), ou variações no número de sequências repetidas (VNTR), micro e minissatélites (fig. 5.3). Essas alterações são comuns no genoma humano, mas apenas poucas estão associadas a algum tipo de alteração, porém alguns deles já identificados podem alterar a expressão e/ou a atividade de sítios de ligação de medicamentos.

Exemplos de seqüências de microssatélites:

- Repetição de 1 base:  
**GTAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAT**
- Repetição de 2 bases:  
**GTCACACACACACACAGGAT** (dinucleotídeo)
- •Repetição de 3 bases:  
**GTCACCACCACCACCACGGAT** (trinucleotídeo)
- •Repetição de 4 bases:  
**GTCAGACAGACAGACAGAGGAT** (tetranucleotídeo)

**Figura 5.3:** Exemplos de polimorfismos. Vemos as repetições sequenciais de bases.

Segundo as pesquisas atuais na área de farmacogenômica, alguns polimorfismos em especial foram identificados e estão listados abaixo:

### **Polimorfismos genéticos que afetam o metabolismo de medicamentos.**

Nos organismos os fármacos precisam ser metabolizados, processo este que normalmente envolve sua transformação em metabólitos mais solúveis que serão mais facilmente excretados.

Os polimorfismos que podem ser encontrados nos genes de metabolização podem alterar a excreção por interferirem em alguma etapa de Fase I (oxidação, redução e hidrólise) ou de Fase II (reações

de conjugação, acetilação, glucuronidação, sulfatação e metilação). Um sítio importante de metabolização é o citocromo P450, onde já foram descritos vários polimorfismos.

### **Polimorfismos genéticos que afetam o transporte de medicamentos.**

Os transportes ativos pela membrana celular têm importante papel na distribuição dos fármacos pelo organismo. Os transportadores estão localizados principalmente nas células intestinais, nas células hepáticas e no epitélio renal, sendo responsáveis pela absorção, biodisponibilidade e eliminação de vários medicamentos. Os polimorfismos estão associados com alterações nestes receptores, interferindo de forma geral nos processos descritos e assim interferindo no tratamento.

Um importante transportador de vários medicamentos abundantemente estudado é a glicoproteína P, associada a polimorfismos importantes que alteram a ação de vários fármacos.

## **Polimorfismos genéticos que afetam receptores.**

Para que um fármaco tenha ação no seu sítio alvo é necessário que este ligue-se a um receptor celular. Os polimorfismos podem alterar os receptores modificando sensivelmente a ação dos fármacos. Os canais de sódio e os receptores adrenérgicos  $\beta_2$  tem sido extensamente estudados e associados a alterações que interferem na associação com fármacos.

Os polimorfismos genéticos podem ser identificados utilizando-se técnicas de biologia molecular. A PCR ou a PCR em tempo real podem detectar estas alterações por meio da amplificação da região do polimorfismo, porém trata-se de uma técnica de baixa sensibilidade de uma forma geral, pois tais alterações, normalmente, são de pequeno tamanho, difíceis de serem detectadas desta forma.

Já o sequenciamento de DNA é uma boa alternativa diagnóstica, pois por esta técnica pode-se obter a sequência do gene alvo e este é comparado a um gene "normal" ou de referência e assim, o polimorfismo é detectado. Com o sequenciamento pode-se inclusive formar um "banco" de polimorfismos, para realizar comparações futuras.

A pesquisa direta de regiões micro ou minissatélites é uma forma mais rápida e barata de pesquisar polimorfismos, mas é necessário que se conheça as regiões e a quantidade de repetições envolvidas na alteração.

### **5.3 Empresas biotecnológicas**

O histórico de empresas biotecnológicas confunde-se com as empresas de agricultura, tecnologia e inovação, pois as tecnologias utilizadas são correlacionadas.

Ao longo da história várias inovações foram surgindo e delas empresas foram se desenvolvendo buscando a melhoria de processos e serviços (fig 5.4).

Período	Acontecimento
6.000 a. C.	bebidas alcoólicas (cerveja e vinho) são produzidas por sumérios e babilônios
2.000 a.C.	panificação e bebidas fermentadas são utilizadas por egípcios e gregos
1875 d. C.	Pasteur mostra que a fermentação é causada por microrganismos
1880-1910	surgimento da fermentação industrial (ácido láctico, etanol, vinagre)
1910-1940	síntese de glicerol, acetona e ácido cítrico
1940-1950	antibióticos são produzidos em larga escala por processos fermentativos
1953	estabelecida a estrutura do DNA
1973	início da engenharia genética
1982	insulina humana é produzida

**Figura 5.4:** Quadro ilustrativo dos acontecimentos biotecnológicos e a época que ocorreram.

Inicialmente as empresas de biotecnologia propriamente ditas restringiam-se àquelas de grande capital, pois os recursos necessários ao desenvolvimento eram muitos. Com o passar dos anos e a facilidade de compra e desenvolvimento de novos recursos, bem como o acesso facilitado às novas tecnologias, mais empresas puderam se aperfeiçoar no ramo biotecnológico, bem como tornou-se possível que empresas de menor porte conseguissem se aventurar por esse caminho.

Uma das empresas de maior destaque e pioneirismo nesta área é a Monsanto, criada em 1901 por John F. Queeny, que desenvolveu a empresa em homenagem à sua esposa, Olga Monsanto Queeny. Inicialmente tratava da produção de sacarina, comercialmente importante na época, acompanhou todo o desenvolvimento da biotecnologia de uma forma geral e hoje é uma das principais no que se refere a melhoramento vegetal.

A Monsanto tem hoje seu foco principal em sementes convencionais e transgênicas com alta produtividade, biotecnologias que permitem culturas mais duráveis e nutritivas e soluções seguras e eficazes para proteção de cultivos.

Por meio de suas pesquisas, esta empresa está na ponta do desenvolvimento de produtos transgênicos, tendo destaque o milho e a soja, utilizados em grande parte das culturas.

No Brasil, a EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, criada em 1974, com o nome de Centro Nacional de Recursos Genéticos (Cenargen), teve seu início com biotecnologia agropecuária e em controle biológico de pragas. Hoje dedica-se a uma variedade de produtos e inovações, desde bebidas e

bioprodutos, até máquinas e equipamentos e produtos biotecnológicos.

Centros de pesquisa no mundo inteiro estão voltados para os avanços da biotecnologia e o Brasil não fica fora desta área. Inicialmente as pesquisas no País ficavam restritas aos centros localizados em universidades públicas, contando com fomento de linhas regulares de pesquisa apenas. Isso deixava de fora pesquisadores com ideias inovativas que não possuíam vínculo com estas empresas, fazendo com que projetos importantes ficassem parados por vários anos ou até mesmo fossem perdidos.

No cenário atual, existem linhas de fomento para empreendedores particulares, ou seja, pessoas interessadas no empreendimento biotecnológico. Ainda há um vínculo com instituições de ensino e pesquisa públicas, porém o acesso tem se tornado muito mais fácil.

O CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, possui algumas linhas de pesquisa e linhas de financiamentos e fomentos que atendem às expectativas desde microempreendedores até grandes conglomerados. Nas suas linhas de incentivo, a biotecnologia tem tomado cada vez mais espaço e

pequenas empresas tem se aventurado nesta área com relativo sucesso.

Uma das linhas de incentivo é o programa RHAE, que tem como proposta a inovação através da concessão de bolsas para mestres e doutores nas empresas. Esta linha de bolsas permite que empresas consigam recursos humanos iniciais para suas atividades por meio do desenvolvimento de produtos e serviços, incentivando que elas aproveitem futuramente tais profissionais em suas instalações.

Outro importante órgão de fomento é a FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, também focada em pesquisa e desenvolvimento, apresenta linhas de crédito e fomento, por meio de projetos, para empresas iniciantes em áreas biotecnológicas.

Dentre seus projetos de fomento à pesquisa e inovação, destacam-se o CEPID, que é uma integração entre centros de pesquisa, inovação e difusão de conhecimentos e o projeto PIPE, pesquisa inovativa em pequenas empresas. Este último, como tem seu foco nas pequenas empresas, tem sido de grande ajuda para

aqueles que precisam de um empurrão inicial para fazer com que empresas biotecnológicas possam sair do papel.

Também não podemos deixar de citar o SEBRAE, Centro Brasileiro de Apoio à Pequena e Média Empresa (Cebrae), que era a proposta inicial, de 1972 e hoje autônomo, denominado Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas (SEBRAE).

Com sua diversidade de modalidades de apoio às empresas, o SEBRAE conta com diversos tipos de apoio, incluindo espaço físico inicial, pois muitos inovadores não contam inicialmente com isso. Nessa linha o Órgão conta com as incubadoras tecnológicas, que se tratam de um conglomerado de pequenas empresas que utilizam salas e serviços de espaços definidos e com orientações de profissionais qualificados.

As incubadoras de empresas têm sido muito importantes pois tornam realidade a ideia de muitos pesquisadores de colocar em prática ideias inovativas de uma forma geral.

Cada vez mais a biotecnologia faz parte de nossas vidas e mais e mais empresas vêm se desenvolvendo nesta área. Suas inovações têm saído do papel e transformado de forma importante o modo como vemos a ciência, a pesquisa e o diagnóstico.



## 6. Referências Bibliográficas

ADA, G. Advances in immunology: **Vaccines and vaccination**. N Engl J Med. 2001; 345:14.

Alberts, B, Dennis, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., **Molecular Biology of the Cell**, 3rd Ed. Garland Publ. New York. (1995).

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

AZEVEDO, V.; LEVITUS, G.; MIYOSHI, A.; CÂNDIDO, A. L.; GÓES, A. M.; OLIVEIRA, S. C. **Main features of DNAbased immunization vectores**. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, Ribeirão Preto, v.32, n.2, p.147-153, 1999.

Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. **Candidate gene polymorphisms in solid cancers**. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(6):593-601.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bionformação. **Bioecnologia, ciência e desenvolvimento**. Uberlândia, v. 1, n. 32, p. 28-37, 2004.

BINS, A. D.; JORRITSMA, A.; WOLKERS, M. C.; HUNG, C. F.; WU, T. C.; SCHUMACHER, T. N.; HAANEN, J. B. **Rapid and potent DNA vaccination strategy defined by in vivo monitoring of antigen expression**. *Nature Medicine*, New York, v.11, n.8, p.899-904, 2005.

BRIANE, D., LESAGE, D., CAO, A., COUDERT, R., LIEVRE, N., SALZMANN, J. L., TAILLANDIER, E. Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-

based cationic liposomes. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Washington, v.50, n.7, 983-991, 2002.

Bristow, A.F. **Recombinant-DNA-derived insulin analogues as potentially useful therapeutic agents.** *Trends in Biotechnology* 11: 301-305, 1993.

Chowbay B, Zhou S, Lee EJ. **An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore.** *Drug Metab Rev* 2005;37(2):327-78.

**Clinical Trials:** <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em dezembro de 2015.

**CNPQ:** <<http://www.cnpq.br/>>. Acesso em dezembro de 2015.

DlnZ, M. O. et al. **Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DnA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D.** *Clin. Vac. Immunol.*, v.17, p.1576-83, 2010.

**EMBRAPA:** <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em dezembro de 2015.

Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. **The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2.** International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996;276(19):1575-9.

**FAPESP:** <<http://www.fapesp.br/>>. Acesso em dezembro de 2015.

Haas SK, Freund M, Heigener D, Heilmann L, Kemkes-Matthes B, von Tempelhoff GF, et al. **Low--molecular-weight heparin versus placebo for the**

prevention of venous thromboembolism in metastatic breast cancer or stage III/IV lung cancer. Clin Appl Thromb Hemost 2012;18:159-65.

Herman D, Locatelli I, Grabnar I, Peternel P, Stegnar M, Mrhar A, et al. **Influence of CYP2C9 polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintenance dose.** pharmacogenomics J2005;5(3):193-202.

Ingelman-Sundberg M. **Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future.** Trends Pharmacol Sci 2004;25(4):193-200.

Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. **Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary?** Control Clin Trials 1996;17:1-12.

JANEWAY, Charles et al. **Imunobiologia: O Sistema Imunológico na saúde e na doença.** Porto Alegre: Artmed, 4<sup>a</sup> ed.

Jiang CX, Armstrong DW. **Use of CE for the determination of binding constants.**

*Electrophoresis* 2010; 31(1):17-27. PMID:20039286.  
<http://dx.doi.org/10.1002/elps.200900528>

Kaprio J, Ferrell RE, Kottke BA, Kamboh MI, Sing CF. **Effects of polymorphisms in apolipoproteins E, A-IV, and H on quantitative traits related to risk for cardiovascular disease.** Arterioscler Thromb 1991;11(5):1330-48.

Larocca A, Cavallo F, Bringham S, Di Raimondo F, Falanga A, Evangelista A, et al. **Aspirin or enoxaparin thromboprophylaxis for patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with lenalidomide.** *Blood* 2012;119:933-9.

LASARO, M. O. et al. Anti-tumor DnA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 e6/e7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. *Microb. Infection*, v.7, p.1541-50, 2005.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D. L; COX, M.M. **Princípios de bioquímica.** 4. ed. S.I. Sarvier, 2007.

MATASCI, M.; HACKER, D.L.; BALDI, L.; WURM, F.M. **Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects.** *Drug Discovery Today: Technologies* 5, 16, 2008.

MHASHILKAR, A. M.; ATALA, A. **Advent and Maturation of Regenerative Medicine.** *Current Stem Cell Research & Therapy*, v. 7, n. 6, p 43045, 2012.

MIR, Luis (org.). **Genômica: Ciências da Vida.** São Paulo, Atheneu, 2004.

**MONSANTO:** <<http://www.monsanto.com/global/br/pages/default.aspx>>.

Acesso em dezembro de 2015.

MORALES, Marcelo M. (ed.). **Terapias Avançadas: Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde.** São Paulo, Atheneu, 2007.

**Níveis de Evidência e Grau de recomendação** - Oxford Centre for Evidence-Based Medicine.

<URL:[http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/texto\\_introdutorio.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/texto_introdutorio.pdf)>

OTTEN, G. R.; SCHAEFER, M.; DOE, B.; LIU, H.; MEGEDE, J. Z.; DONNELLY, J.; TABUSSAY, D.; BARNETT, S.; ULMER, J. B. **Potent immunogenicity of ana HIV-1 gagpol fusion DNA vaccine delivered by in viv eletroporation.** *Vaccine*, Kidlington, v.24, n.21, p.4503-4509, 2006.

Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrián A, Ruíz S, Azañedo M, et al. **Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A.** *Cancer Res* 2003;63(8):1814-7.

ROITT, Ivan et al. **Imunologia.** São Paulo: Editora Manole LTDA, 1999. 5ª ed.

**SEBRASP:** < <http://www.sebraesp.com.br/>>. Acesso em dezembro de 2015.

Shastry BS. **Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine.** *Pharmacogenomics J* 2006;6(1):16-21

STITES, Daniel P. et al. **Imunologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Syvanen AC. **Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms.** *Nat Rev Genet* 2001;2(12):930-42.

Tavares MFM. **Eletroforese Capilar: conceitos básicos.** *Química Nova* 1996; 19(2):173.

VENTURA, A. M. “Terapia Gênica Utilizando Vetores Virais”, in Luiz Rachid Trabulsi e Flávio Alterthum (eds.). **Microbiologia**. 4a ed. São Paulo, Atheneu, pp. 573-9.

WALSH, G. **Biopharmaceutical benchmarks 2010**. *Nature Biotechnology*, v. 28, p. 917924, 2010.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. **Posttranslational modifications in the context of therapeutic proteins**. *Nature Biotechnology*, v. 24, p. 12411252, 2006.

WESTBROOK, J. et al. The protein data bank: unifying the archive. **Nucleic acid res.** v. 30, n. 1, p. 245-248, 2002.

ZHOU, H.; **DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.102, n.31, p.10846–10851, 2005.