

Biotecnologia FARMACÊUTICA

Aspectos sobre aplicação industrial

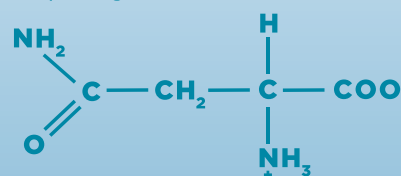
Michele Vitolo
Coordenador



Colaboradores

Adalberto Pessoa Jr.
Gisele Monteiro de Souza
João Carlos Monteiro de Carvalho
Marco Antonio Stephano
Sunao Sato

Asparagina



Blucher

BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Aspectos sobre aplicação industrial



BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Aspectos sobre aplicação industrial

COORDENADOR

Michele Vitolo

COLABORADORES

Adalberto Pessoa Jr.

Gisele Monteiro de Souza

João Carlos Monteiro de Carvalho

Marco Antonio Stephano

Sunao Sato

Biotecnologia farmacêutica

© 2015 Michele Vitolo, Adalberto Pessoa Jr., Gisele Monteiro de Souza,
João Carlos Monteiro de Carvalho, Marco Antonio Stephano e Sunao Sato
Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel.: 55 11 3078 5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme
5a ed. do *Vocabulário Ortográfico da Língua
Portuguesa*. Academia Brasileira de Letras,
março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por
quaisquer meios, sem autorização escrita da
Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora Edgard
Blücher Ltda.

Ficha Catalográfica

Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre
aplicação industrial/coordenado por Michele Vitolo;
colaboradores Adalberto Pessoa Jr. [et al.]. – São
Paulo: Blucher, 2015.

Bibliografia
ISBN 978-85-212-0809-9

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Biologia
molecular 3. Microbiologia industrial 4. Enzimas
5. Biomoléculas 6. Biossegurança I. Vitolo,
Michele II Pessoa Jr., Adalberto III. Souza,
Gisele Monteiro de IV. Carvalho, João Carlos
Monteiro de V. Stephano, Marco Antonio
VI. Sato, Sunao

13-1012

CDD 615.19

Índices para catálogo sistemático:

1. Biotecnologia farmacêutica

SOBRE OS AUTORES

- 1** Prof. Dr. Michele Vitolo
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 2** Prof^ª. Dr^ª. Francislene Andréia Hasmann
Diretora Acadêmica Adjunta Cooperativo
Grupo SER Educacional S.A.
Rua Fernando Lopes, 778 - Graças
52011-220, Recife, PE, Brasil.
- 3** Prof^ª. Dr^ª. Beatriz Vahan Kilikian
Professora Associada
Universidade de São Paulo
Escola Politécnica da USP
Departamento de Engenharia Química
Caixa postal 61548
05424-970, São Paulo, SP, Brasil.
- 4** Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 5** Prof. Dr. Sunao Sato
Professor Titular
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 6** Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Professor Associado
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 7** Prof^ª. Dr^ª. Gisele Monteiro de Souza
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 8** Prof^ª. Dr^ª. Pérola de Oliveira Magalhães
Professora Adjunta III
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia,
Faculdade de Ciências da Saúde,
Campus Darcy Ribeiro,
70910-900, Asa Norte, Brasília, DF, Brasil.
- 9** Prof. Dr. Marcelo Chuei Matsudo
Professor Adjunto
Universidade Federal de Itajubá
Av. Benedito Pereira dos Santos, 1303
37500-903, Itajubá, MG, Brasil.
- 10** Prof^ª. Dr^ª. Raquel Pedrosa Bezerra
Professora Adjunta
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
R. Dom Manoel de Medeiros, s/n^º
52171-900, Recife, PE, Brasil.

- 11** Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 12** MSc. Patrícia Barros dos Santos
Especialista em Biotecnologia na Área da Saúde
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
-Farmacêutica
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.
- 13** Dr. Celso Pereira Caricati
Pesquisador Científico do Instituto Butantã
Diretor do Lab. Especial Piloto de P&D de
Imunobiológicos Veterinários
Av. Dr. Vital Brasil, 1500
05508-030, São Paulo, SP, Brasil.
- 14** Prof^a. Dr^a. Laura de Oliveira Nascimento
Professora de Tecnologia Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Unicamp
Rua Sérgio Buarque de Holanda, 250
CB-II Sala E06, 2º piso
13083-859, Campinas, SP, Brasil.

APRESENTAÇÃO

A biotecnologia, em termos amplos, pode ser enunciada como o conjunto de tecnologias que utilizam células, organelas celulares e biomoléculas, visando solucionar problemas, bem como desenvolver e/ou melhorar produtos de interesse econômico.

Reconhecidamente a biotecnologia vem impactando áreas de grande interesse econômico e social como a agropecuária, a saúde humana e animal e o meio ambiente.

A biotecnologia moderna – termo adotado após a invenção das técnicas do DNA recombinante e da fusão celular, que permitiram introduzir modificações pontuais no genoma de células procarióticas e eucarióticas indistintamente; contrapõe-se, por conseguinte, à biotecnologia clássica, que vem sendo desenvolvida pelo homem há milênios – ensejou a consolidação de duas áreas, a saber, **biotecnologia industrial** (focada no uso de técnicas e processos intermediados por agentes biológicos em geral) e **biotecnologia farmacêutica**.

A biotecnologia farmacêutica emprega técnicas laboratoriais e processos industriais para produzir biofármacos (hormônios, vacinas, anticorpos monoclonais), desenvolver ferramentas para o prognóstico e diagnóstico de enfermidades (biossensores, optogenética, chips associados a macromoléculas, plasmônica), administração de biofármacos, terapêutica personalizada e no desenvolvimento de biomoléculas sintéticas (por exemplo, ácidos peptídeo-nucleicos).

Inegavelmente, a biotecnologia farmacêutica é o ponto de confluência de ampla gama de conhecimentos (Figura I). O caráter multidisciplinar dessa área torna-a extremamente difícil de ser ensinada para alunos de

graduação – inclusive a pós-graduandos - dos cursos da área da saúde. No entanto, para enfrentar esse desafio decidiu-se propor a obra seminal intitulada “**Biotechnologia Farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial**”.

Este trabalho resultou do esforço coletivo dos docentes da disciplina de Biotecnologia Farmacêutica, ministrada desde 2004 aos graduandos do Curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Contou, também, com a participação de vários colegas de outras Instituições de ensino e pesquisa, os quais na qualidade de coautores de vários capítulos auxiliaram significativamente na seleção e consolidação dos temas abordados.

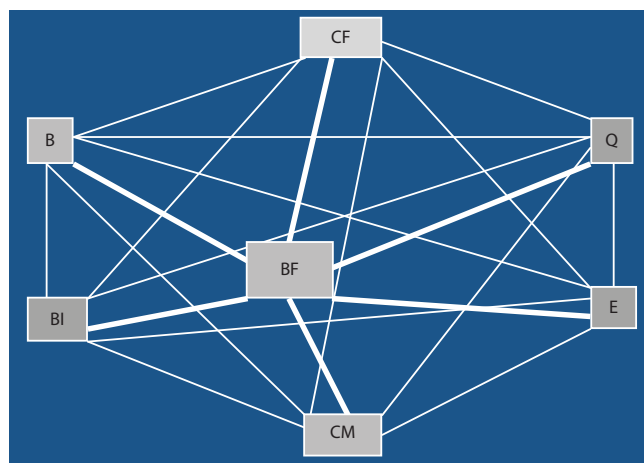


Figura I. Esquema simplificado da rede multidisciplinar que configura a biotecnologia farmacêutica (BF).

Legenda: B (Biologia), E (Engenharias), Q (Química), BI (Biotecnologia Industrial), CF (Ciências Farmacêuticas) e CM (Ciências Médicas).

PREFÁCIO

Com muito orgulho aceitei o convite para prefaciar a obra *Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial*, mas assim que tive acesso ao conteúdo desta obra, fiquei preocupado com tamanha responsabilidade.

O livro está muito bem organizado e, em seus 13 capítulos, abrange os principais assuntos importantes para o conhecimento de todos que pretendem atuar ou atuam nessa área: biologia molecular, fermentação, cultivo celular, purificação, validação de metodologias analíticas, entre outros. Além disso, a sociedade e a questão ambiental também estão contempladas no texto. A gestão da qualidade, assim como a biossegurança, não foram esquecidas, e em função de suas importâncias, fazem parte de dois capítulos individuais.

Como era de se esperar, o último capítulo trata de algumas importantes perspectivas da biotecnologia farmacêutica e os autores não só incluem temas como câncer, AIDS, células-tronco, como também doenças negligenciadas e neurodegenerativas. A biotecnologia e as suas interações com outras áreas de conhecimento, tão importante para o desenvolvimento da ciência, também está no conteúdo dos textos.

O presente livro se torna uma importante contribuição para as metodologias e os desafios que esboçam a

biotecnologia farmacêutica; esta, aliás, com um novo marco regulatório a partir de 2010, será a grande beneficiada por esta publicação. Vale a pena lembrar que essa nova regulamentação traz a possibilidade de registro de medicamento biológico pela via da comparabilidade - em qualidade, segurança e eficácia -, para a qual o propósito do livro se aplica infinitamente.

Não tenho dúvida que esta obra ocupará posição de destaque no acervo das importantes bibliotecas das universidades e instituições deste país, e será leitura obrigatória a todos que se dedicam ao desenvolvimento tecnológico e à formação e capacitação de profissionais para a indústria farmacêutica, além de estudantes de graduação e pós-graduação.

Por fim, parablenizo o coordenador e os colaboradores pelo trabalho de elaboração deste livro, com a certeza de que o compromisso não se encerra nesta edição, mas continuará nas próximas atualizações.

Eduardo Chaves Leal

Diretor do Instituto Nacional de Controle
de Qualidade em Saúde – INCQS/Fiocruz
Acadêmico titular da Academia Nacional de Farmácia

CONTEÚDO

Capítulo 1

Aspectos básicos da biotecnologia

Michele Vitolo

- 1.1 Introdução, 21
- 1.2 Moléculas biológicas, 22
 - 1.2.1 Introdução, 22
 - 1.2.2 Proteínas, 23
 - 1.2.3 Ácidos nucleicos, 24
 - 1.2.4 Vírus, 32
- 1.3 Tecnologias integrantes dos processos biotecnológicos, 41
 - 1.3.1 Tecnologia de anticorpos monoclonais, 41
 - 1.3.2 Tecnologia de bioprocessamento, 42
 - 1.3.3 Tecnologia da cultura de células, 43
 - 1.3.4 Tecnologia de engenharia de tecidos, 45
 - 1.3.5 Tecnologia de biossensores, 46
 - 1.3.6 Tecnologia de engenharia genética, 47
 - 1.3.7 Tecnologia de engenharia de proteínas, 49
 - 1.3.8 Tecnologia do RNA antissenso, 49
 - 1.3.9 Tecnologia do chip de DNA, 50
 - 1.3.10 Tecnologia da bioinformática, 53
- 1.4 Biotecnologia e aplicações, 54
 - 1.4.1 Na medicina, 54
 - 1.4.1.1 Diagnóstico, 54
 - 1.4.1.2 Terapêutica, 54
 - 1.4.2 No meio ambiente, 54
 - 1.4.3 Na agropecuária, 56
- 1.5 O bionegócio, 57
 - 1.5.1 Estruturação da empresa biotecnológica, 58
 - 1.5.2 Indústria biofarmacêutica, 59
 - 1.5.2.1 Baseada na biotecnologia moderna, 59
 - 1.5.2.2 Baseada na biotecnologia tradicional, 59

- 1.5.2.2.1 Metabólitos primários, 60
- 1.5.2.2.2 Metabólitos secundários, 62
- 1.6 Aspectos sociais da biotecnologia, 64
 - 1.6.1 Sobre o uso dos bioprodutos, 65
 - 1.6.2 Sobre a privacidade genética e do prognóstico laboratorial, 66
 - 1.6.3 Sobre células-tronco e clonagem, 69
 - 1.6.4 Sobre o uso de cobaias, 71
 - 1.6.5 Agricultura, 72

Referências bibliográficas, 73

Capítulo 2

Biologia molecular – ferramentas na biotecnologia farmacêutica industrial

Gisele Monteiro de Souza

- 2.1 Introdução, 77
- 2.2 Alvos terapêuticos, 79
- 2.3 Comunicação celular, 81
- 2.4 Regulação da expressão gênica, 83
 - 2.4.1 Sistema transcricional em procaríotos, 85
 - 2.4.1.1 Estrutura promotora e operon, 85
 - 2.4.1.2 Operon *lac*, 86
 - 2.4.1.3 Operon do triptofano, 87
 - 2.4.1.4 Terminação da transcrição, 88
 - 2.4.2 Regulação da transcrição em eucariotos, 88
 - 2.4.2.1 Estrutura promotora, 90
 - 2.4.2.2 Complexo de pré-iniciação da transcrição, 91
 - 2.4.2.3 Regulação de uma enzima antioxidante mitocondrial em levedura, 94
 - 2.4.2.4 Regulação do mRNA – Processamento, 98
- 2.5 Resumo, 100

Referências bibliográficas, 100

Capítulo 3

Tecnologia de fermentações

João C. M. de Carvalho,

Marcelo C. Matsudo,

Raquel P. Bezerra e

Sunao Sato

- 3.1 Tecnologia das fermentações no contexto da biotecnologia, 103
- 3.2 Fermentação como processo unitário, 106
 - 3.2.1 Micro-organismo, 106
 - 3.2.1.1 Manutenção de micro-organismos, 107
 - 3.2.1.1.1 Método de transferência periódica (repique), 107
 - 3.2.1.1.2 Repiques mantidos sob óleo mineral, 107
 - 3.2.1.1.3 Repiques mantidos em água esterilizada, 107
 - 3.2.1.1.4 Repiques mantidos por meio de secagem em terra, areia ou sílica, 107
 - 3.2.1.1.5 Técnicas de congelamento, 108
 - 3.2.1.1.6 Liofilização, 108
 - 3.2.1.2 Preparo do inóculo, 109
 - 3.2.2 Meio de cultivo (mosto), 109
 - 3.2.2.1 Fonte de energia, 111
 - 3.2.2.2 Fonte de carbono, 111
 - 3.2.2.3 Fonte de nitrogênio, 112
 - 3.2.2.4 Íons inorgânicos essenciais, 112
 - 3.2.2.5 Fonte de oxigênio, 113
 - 3.2.3 Esterilização e desinfecção, 113
 - 3.2.4 Aparelhagem, 114
 - 3.2.5 Processo fermentativo, 114
 - 3.2.6 Separação de produto e subproduto, 115
 - 3.2.7 Tratamento de águas residuais, 115
- 3.3 Tipos de processos fermentativos, 116
- 3.4 Condução do processo fermentativo, 120
 - 3.4.1 Controle do micro-organismo, 120
 - 3.4.2 Controle do substrato, 120
 - 3.4.3 Controles ambientais em fermentação, 121
 - 3.4.3.1 Controle de temperatura, 121
 - 3.4.3.2 Controle de pH, 122
 - 3.4.3.3 Controle de pressão, 122
 - 3.4.3.4 Controle da espuma, 122
 - 3.4.3.5 Controle da agitação e aeração, 123
- 3.5 Esterilização e desinfecção em processos fermentativos, 123
 - 3.5.1 Esterilização do meio de cultura, 124
 - 3.5.1.1 Processo de esterilização descontínuo, 125
 - 3.5.1.2 Processo de esterilização contínuo, 126
 - 3.5.1.3 Problemas de contaminação, 128
 - 3.5.2 Esterilização de ar, 129
 - 3.5.2.1 Esterilização por radiações, 129
 - 3.5.2.2 Esterilização por aquecimento, 129
 - 3.5.2.3 Esterilização do ar por filtração, 129
 - 3.5.2.3.1 Filtros de materiais fibrosos para esterilização de ar, 130
 - 3.5.2.3.2 Filtros de membranas para esterilização de ar, 130
 - 3.5.3 Esterilização de equipamento, 131
 - 3.5.3.1 Uso de calor úmido, 131
 - 3.5.3.2 Uso de calor seco, 131
 - 3.5.3.3 Uso de agentes químicos (germicidas químicos), 131
- 3.6 Cinética de processos fermentativos, 132
 - 3.6.1 Medida da concentração de componentes do meio de fermentação, 132
 - 3.6.1.1 Concentração celular, 132
 - 3.6.1.1.1 Concentração expressa em massa seca, 132
 - 3.6.1.1.2 Centrifugação para determinação do volume celular, 133
 - 3.6.1.1.3 Densidade óptica, 133
 - 3.6.1.1.4 Contagem microscópica, 133
 - 3.6.1.1.5 Contagem em placas, 133
 - 3.6.1.1.6 Medida de componentes celulares, 133
 - 3.6.1.2 Concentração de compostos específicos no meio de fermentação, 133
 - 3.6.2 Medida das velocidades, 134
 - 3.6.3 Definições, 135
 - 3.6.4 Processo contínuo, 136
 - 3.6.5 Processo descontínuo ou batelada clássica, 142
 - 3.6.5.1 Produção de produto associada e não associada ao crescimento celular, 144
 - 3.6.6 Processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada, 144

- 3.6.6.1 Modelos para células, 144
 - 3.6.6.2 Modelo para substrato, 146
 - 3.6.6.3 Modelo para produto, 147
 - 3.7 Agitação e aeração, 147
 - 3.7.1 Cálculo da concentração de saturação, 149
 - 3.7.2 Sistemas de aeração, 149
 - 3.7.2.1 Aeração superficial, 149
 - 3.7.2.2 Aeração em profundidade, 150
 - 3.7.3 Sistemas de agitação mecânica em biorreatores, 151
 - 3.7.4 Fatores que interferem na concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, 151
 - 3.7.4.1 Integração de fornecimento e demanda de oxigênio, 153
 - 3.7.5 Determinação de $k_L \cdot a$, 154
 - 3.7.5.1 Método do sulfito para determinação de $k_L \cdot a$, 154
 - 3.7.5.2 Método dinâmico de determinação de $k_L \cdot a$, 154
- Referências bibliográficas, 155
- Capítulo 4**
Tecnologia de cultivo de células de mamíferos
-
- Marco Antonio Stephano e**
Patrícia Barros dos Santos
- 4.1 Introdução, 157
 - 4.2 Breve histórico, 158
 - 4.3 O mercado de biofármacos, 160
 - 4.4 Categorias de produtos biofarmacêuticos, 160
 - 4.4.1 Vacinas, 160
 - 4.4.2 Anticorpos monoclonais, 160
 - 4.4.3 Glicoproteínas, 161
 - 4.4.4 Células e tecidos para transplante, 161
 - 4.4.5 Material para terapia gênica, 161
 - 4.5 Células animais, 161
 - 4.5.1 Características básicas, 161
 - 4.5.2 Processos pós-traducionais, 162
 - 4.5.3 Imunogenicidade de proteínas recombinantes, 164
 - 4.5.4 Tipos de células, 165
 - 4.5.5 Células de hibridomas, 167
 - 4.5.6 Estrutura básica dos anticorpos ou imunoglobulinas, 168
 - 4.5.7 Anticorpos monoclonais, 168
 - 4.5.7.1 Tipos de anticorpos monoclonais, 169
 - 4.5.7.1.1 Anticorpos monoclonais murinos, 169
 - 4.5.7.1.2 Anticorpos monoclonais quiméricos, 169
 - 4.5.7.1.3 Anticorpos monoclonais humanizados, 169
 - 4.5.7.1.4 Anticorpos monoclonais humanos, 169
 - 4.5.8 Tecnologia de *phage display*, 169
 - 4.5.9 Fragmentos de anticorpos, 170
 - 4.6 Meios de cultura, 171
 - 4.6.1 Suplementos de meios de cultura, 172
 - 4.6.2 Otimização de meio de cultura, 174
 - 4.7 Laboratório básico de cultura celular, 175
 - 4.8 Meio de cultura e suplementos, 176
 - 4.9 Etapas do bioprocessamento com células animais, 177
 - 4.10 Principais orientações para a obtenção de bancos de células, 177
 - 4.10.1 Obtenção e controle da célula “original”, 177
 - 4.10.2 Preparação do banco de células, 178
 - 4.10.3 Testes de qualificação do banco de células, 178
 - 4.11 Cariotipagem (análise citogenética), 178
 - 4.12 Análise de isoenzimas, 179
 - 4.13 DNA *fingerprinting*, 179
 - 4.14 Estabilidade, 179
 - 4.15 Boas práticas em cultura celular, 180
 - 4.16 Desenvolvimento de uma linhagem celular, 182
 - 4.16.1 Expressão transiente, 182
 - 4.16.2 Expressão estável, 182
 - 4.16.3 Construção do vetor de expressão, 182
 - 4.16.4 Promotores, 183
 - 4.16.5 *Enhancer*, 183
 - 4.16.5.1 Elementos que estabilizam e aumentam a tradução do transcrito primário, 183
 - 4.16.6 Seleção, 183
 - 4.16.7 Seleção de clones, 184
 - 4.16.8 Transfecção, 185

- 4.16.8.1 Método do fosfato de cálcio, 185
- 4.16.8.2 Eletroporação, 185
- 4.16.8.3 Lipofecção e polifecção, 185
- 4.16.8.4 Escalonamento da produção de células – produção em larga escala, 186
 - 4.17 Definição de biorreator, 186
 - 4.17.1 Cultura em pequena escala, 186
 - 4.17.2 Problemas no escalonamento (*scale-up*), 187
 - 4.18 Sistemas de células ancoragem-dependentes, 188
 - 4.18.1 Garrafas *roller*, 188
 - 4.18.2 Sistema *stacked-plate* ou *multitray*, 188
 - 4.18.3 Microcarregadores, 188
 - 4.19 Biorreatores de leito, 189
 - 4.19.1 Sistemas para células em suspensão (ou células aderidas em microcarregadores), 190
 - 4.19.1.1 Frascos *spinner*, 190
 - 4.19.1.2 Frascos *shaker*, 190
 - 4.19.1.3 Bolsas para cultura, 190
 - 4.20 Biorreatores ou fermentadores, 190
 - 4.20.1 Reatores de fibras ocas (*Hollow fiber*), 193
 - 4.21 Tipos de processos fermentativos, 193
 - 4.22 Metabolismo celular, 193
 - 4.22.1 Glicose, glutamina e aminoácidos como fonte de energia e carbono, 195
 - 4.22.2 Efeitos do lactato e da amônia, 196
 - 4.22.3 Papel do oxigênio e do gás carbônico no metabolismo celular, 196
 - 4.23 Monitoramento e controle da cultura de células animais, 197
 - 4.23.1 Temperatura, 197
 - 4.23.2 pH, 197
 - 4.23.3 Pressão parcial do oxigênio (pO_2), 197
 - 4.23.4 Pressão parcial de dióxido de carbono, 198
 - 4.23.5 Metabólitos e produtos, 198
 - 4.23.6 Densidade e viabilidade celular, 198
 - 4.23.7 Agitação, 199
 - 4.24 Biossimilares, 199
 - 4.25 Vacinas virais, 199

- 4.25.1 Vetores virais, 200
- 4.25.2 Expressão em sistema de baculovírus, 200
- 4.26 Parâmetros cinéticos e modelagem matemática, 200

Referências bibliográficas, 201

Capítulo 5

Enzimas: as proteínas catalisadoras

Michele Vitolo

- 5.1 Fundamentos da cinética enzimática, 203
 - 5.1.1 Especificidade enzimática, 204
 - 5.1.2 Atividade enzimática, 204
 - 5.1.2.1 Quantificação da atividade enzimática, 205
 - 5.1.2.2 Expressão da atividade enzimática, 208
 - 5.1.2.3 Fatores que afetam a atividade enzimática, 208
 - 5.1.2.3.1 Fatores físico-químicos, 209
 - 5.1.2.3.1.1 pH, 209
 - 5.1.2.3.1.2 Temperatura, 209
 - 5.1.2.3.1.3 Outros, 209
 - 5.1.2.3.2 Fatores químicos, 209
 - 5.1.2.3.2.1 Ativadores/desativadores, 209
 - 5.1.2.3.2.2 Estabilizadores, 209
 - 5.1.2.3.2.3 Inibidores, 210
 - 5.1.2.3.3 Fatores físicos, 210
 - 5.1.2.4 Termodinâmica da catálise enzimática, 210
 - 5.2 Aspectos da técnica de imobilização, 210
 - 5.2.1 Tipos de imobilização, 211
 - 5.2.1.1 Aprisionamento, 211
 - 5.2.1.1.1 Enredamento, 211
 - 5.2.1.1.2 Encapsulamento, 211
 - 5.2.1.1.3 Microencapsulamento, 212
 - 5.2.1.2 Formação de ligações, 212
 - 5.2.1.2.1 Adsorção, 212
 - 5.2.1.2.2 Ligações covalentes, 214
 - 5.2.1.2.3 Ligações cruzadas, 214
 - 5.2.2 Suportes, 215
 - 5.2.3 Efeitos causados pela imobilização, 216
 - 5.2.3.1 Efeitos estéricos e conformacionais, 216

- 5.2.3.2 Efeitos de difusão e transferência de massa, 216
- 5.2.3.3 Efeitos da circunvizinhança, 216
- 5.2.3.3.1 Partição, 217
- 5.2.4 Vantagens e desvantagens da técnica de imobilização, 218
- 5.2.5 Aplicações, 218
- 5.2.5.1 Eletrodos enzimáticos, 218
- 5.2.5.2 Enzimaimunoensaio, 219
- 5.3 Fundamentos sobre reatores enzimáticos, 220
- 5.3.1 Tipos de reatores enzimáticos, 221
- 5.3.2 Cinética de reatores enzimáticos, 224
- 5.3.3 Operação com reatores enzimáticos, 225

Referências bibliográficas, 227

Capítulo 6

Purificação de biomoléculas

Adalberto Pessoa Jr. e

Beatriz Vahan Kilikian

- 6.1 Introdução, 229
- 6.2 Separação células-líquido, 230
- 6.2.1 Filtração, 230
- 6.2.2 Centrifugação, 231
- 6.2.3 Rompimento celular, 232
- 6.2.4 Concentração, 234
- 6.2.4.1 Precipitação, 235
- 6.2.4.2 Filtração tangencial, 237
- 6.2.5 Extração líquido-líquido, 237
- 6.2.6 Processos cromatográficos, 238
- 6.2.6.1 Exclusão molecular, 239
- 6.2.6.2 Troca iônica, 239
- 6.2.6.3 Interação hidrofóbica, 240
- 6.2.6.4 Afinidade, 241
- 6.2.6.5 Ampliação de escala, 242
- 6.2.7 Adsorção em leito expandido, 242
- 6.2.8 Acabamento da purificação, 243
- 6.2.9 Rendimento e pureza, 244

Referências bibliográficas, 245

Capítulo 7

Enzimas e aplicações

Michele Vitolo

- 7.1 Introdução, 247
- 7.2 Enzimas em alimentos, 250
- 7.2.1 Panificação, 250
- 7.2.1.1 Enzimas, 250
- 7.2.1.1.1 Amilases, 251
- 7.2.1.1.1.1 α -amilase, 251
- 7.2.1.1.1.2 β -amilase, 251
- 7.2.1.1.2 Proteases, 251
- 7.2.1.1.3 Lipoxidase, 251
- 7.2.1.1.4 Pentosanase, 251
- 7.2.1.2 Efeitos da suplementação enzimática, 252
- 7.2.1.2.1 α -amilase, 252
- 7.2.1.2.2 Proteases, 252
- 7.2.1.3 Perspectivas, 252
- 7.2.2 Conversão do amido para a produção de xaropes, 252
- 7.2.3 Sucos de frutas, 254
- 7.2.3.1 Parede celular e substâncias pécticas, 254
- 7.2.3.2 Enzimas, 254
- 7.2.3.2.1 Pectinases, 254
- 7.2.3.2.2 Hemicelulases, 256
- 7.2.3.2.3 Celulases, 256
- 7.2.3.2.4 Amilases, 256
- 7.2.3.3 Processamento, 256
- 7.2.4 Modificação enzimática de proteínas, 257
- 7.2.4.1 Cervejaria, 258
- 7.2.4.2 Laticínios, 261
- 7.2.4.2.1 Catalase, 261
- 7.2.4.2.2 Enzimas coagulantes, 261
- 7.2.4.2.3 Proteases, 262
- 7.2.4.2.4 Lípases e esterases, 262
- 7.2.4.2.5 Lactase, 262
- 7.2.4.3 Outros usos das proteases, 263
- 7.2.4.3.1 Descoloração de sangue residual de abatedouros, 263
- 7.2.4.3.2 Recuperação da carne residual presa nos ossos dos animais abatidos, 263

- 7.2.4.3.3 Hidrolisado proteico de peixe, 263
- 7.2.4.3.4 Amaciamento da carne, 264
- 7.2.5 Outros usos, 264
- 7.2.5.1 Óleos comestíveis, 264
- 7.2.5.2 Enzimas na alimentação animal, 266
- 7.2.5.3 Tratamento de resíduos e efluentes, 267
- 7.2.5.4 Enzimas na produção de aromas, 269
- 7.2.5.5 Glicose oxidase, 270
- 7.3 Enzimas em medicamentos, 271
- 7.3.1 Biodisponibilidade de enzimas *in vivo*, 272
- 7.3.1.1 Transporte através do endotélio, 274
- 7.3.1.2 Transporte intermediado por receptores das células endoteliais, 275
- 7.3.1.3 Direcionamento de fármacos a alvos específicos, 275
- 7.3.1.3.1 Conjugado carreador-enzima, 277
- 7.3.1.3.2 Acilação de enzimas, 279
- 7.3.1.3.3 Modelagem molecular de proteínas, 279
- 7.3.2 Aspectos sobre a padronização de enzimas terapêuticas, 280
- 7.3.3 Enzimas terapêuticas, 282
- 7.3.4 Outras aplicações de enzimas na área da saúde, 284
- 7.3.4.1 Análises clínicas, 284
- 7.3.4.2 Cosméticos, 285

Referências bibliográficas, 286

Capítulo 8

Ferramentas de biologia molecular – técnicas e enzimas

Gisele Monteiro de Souza

- 8.1 Introdução, 289
- 8.2 Isolando o produto gênico – DNA polimerase, 289
- 8.2.1 Sequenciamento, 294
- 8.2.2 Clonagem de produtos amplificados por PCR, 296
- 8.3 Enzimas de restrição e vetores, 300
- 8.4 Plasmídeos, cosmídeos e cromossomos artificiais, 309
- 8.5 Resumo, 310

Referências bibliográficas, 312

Capítulo 9

Biomoléculas em métodos analíticos

Adalberto Pessoa Jr. e

Francislene Andréia Hasmann

- 9.1 Enzimas em diagnóstico, 313
- 9.1.1 Introdução, 313
- 9.1.2 Tecnologias, 314
- 9.1.2.1 Autoanalísadores, 314
- 9.1.2.2 Imunoensaios (ELISA), 315
- 9.1.2.3 Fitas para teste, 315
- 9.1.3 Novas tecnologias em diagnósticos enzimáticos, 315
- 9.1.3.1 Diagnósticos de distúrbios gástricos, 315
- 9.1.3.2 Triagem neonatal, 316
- 9.1.3.3 Outras tecnologias, 316
- 9.2 Biossensores, 317
- 9.2.1 Características gerais, 318
- 9.2.2 Aplicações, 319
- 9.2.3 Detectores eletroquímicos, 319
- 9.2.3.1 Biossensores amperométricos, 319
- 9.2.3.2 Biossensores potenciométricos, 320
- 9.2.3.3 Detectores óticos, 320
- 9.2.3.4 Detectores térmicos, 321
- 9.2.3.5 Detectores piezoelétricos, 321
- 9.2.3.6 Biossensores de imunodeteção, 321

Referências bibliográficas, 322

Capítulo 10

Pirogênios: técnicas de detecção e de remoção

Adalberto Pessoa Jr.,

Marco Antonio Stephano e

Pérola de Oliveira Magalhães

- 10.1 Introdução, 325
- 10.2 Origem dos pirogênios, 326
- 10.3 Propriedades físico-químicas da molécula de LPS, 327
- 10.4 Mecanismo de ação, 329
- 10.5 Principais técnicas para a determinação de níveis de endotoxina (pirogênios) em produtos de uso farmacêutico, 329
- 10.5.1 Teste de pirogênios em coelhos, 329

- 10.5.2 Teste de endotoxina bacteriana, 331
- 10.5.3 Teste de endotoxina bacteriana – *Gel clot*, 331
- 10.5.4 Teste de endotoxina bacteriana – cromogênico e turbidimétrico cinéticos, 332
- 10.5.5 Outros métodos, 333
- 10.6 Técnicas aplicadas na remoção de endotoxinas de produtos farmacêuticos, 333
- 10.6.1 Técnicas cromatográficas, 334
- 10.6.2 Ultrafiltração, 335
- 10.6.3 Sistemas micelares de duas fases aquosas, 335
- 10.7 Remoção de endotoxinas de sistemas biotecnológicos, 336
- 10.8 Considerações finais, 338

Referências bibliográficas, 339

Capítulo 11

Biossegurança aplicada ao processo biotecnológico farmacêutico

Celso Pereira Caricati e

Marco Antonio Stephano

- 11.1 Introdução, 343
- 11.2 Definições de biossegurança, 345
- 11.3 Classificação de risco dos micro-organismos e de áreas de contenção, 346
- 11.4 Nível de biossegurança, 347
- 11.4.1 Nível de biossegurança 1 (NB-1), 348
- 11.4.1.1 Procedimentos padrão de laboratório para o NB-1, 348
- 11.4.1.1.1 Equipamentos de contenção para o NB-1, 348
- 11.4.1.1.2 Instalações laboratoriais NB-1, 349
- 11.4.2 Nível de biossegurança 2 (NB-2), 350
- 11.4.2.1 Procedimentos padrão de laboratório para o NB-2, 350
- 11.4.2.1.1 Práticas adicionais para o NB-2, 350
- 11.4.2.1.2 Equipamentos de contenção para o NB-2, 351
- 11.4.2.1.3 Instalações laboratoriais NB-2, 351
- 11.4.3 Nível de biossegurança 3 (NB-3), 351

- 11.4.3.1 Procedimentos padrão de laboratório para o NB-3, 352
- 11.4.3.1.1 Práticas adicionais para o NB-3, 352
- 11.4.3.1.2 Equipamentos de contenção para o NB-3, 352
- 11.4.3.1.3 Instalações laboratoriais NB-3, 353
- 11.4.4 Nível de biossegurança 4 (NB-4), 354
- 11.4.4.1 Procedimentos padrão de laboratório para o NB-4, 354
- 11.4.4.1.1 Práticas adicionais para o NB-4, 354
- 11.4.4.1.2 Equipamentos de contenção para o NB-4, 356
- 11.4.4.1.3 Instalações laboratoriais NB-4, 356
- 11.4.4.1.4 Laboratório NB-4 com CSB de Classe III, 357
- 11.5 Acidentes de laboratório, 357
- 11.5.1 Os maiores acidentes, 360
- 11.5.2 Prevenção de acidentes, 360
- 11.5.2.1 Boa supervisão do laboratório, 360
- 11.5.2.2 Treinamento e conscientização, 360
- 11.5.2.3 Educação continuada, 360
- 11.5.2.4 Metodologia adequada, 360
- 11.5.2.5 Equipamento correto, 360
- 11.5.2.6 Organização correta do laboratório, 361
- 11.5.2.7 Vacinação, 361
- 11.6 Planejamento das atividades, 361
- 11.7 Equipamentos de proteção coletiva, 362
- 11.8 Equipamentos de proteção individual, 362

Referências bibliográficas, 362

Capítulo 12

Sistemas de qualidade aplicados aos produtos biotecnológicos

Marco Antonio Stephano e

Laura de Oliveira Nascimento

- 12.1 Sistemas de qualidade, 365
- 12.1.1 As eras da qualidade, 366
- 12.1.2 Exigências da qualidade, 366
- 12.2 Registro de produtos biotecnológicos, 367
- 12.2.1 A legislação nacional para registro, 367
- 12.2.2 FDA e EMA – exigências internacionais, 368

- 12.3 Pesquisa com produtos biotecnológicos, 369
 - 12.3.1 Escalonamento industrial de processos biotecnológicos, 370
 - 12.3.1.1 Sistemas de expressão, 370
 - 12.3.1.2 Por onde começa o escalonamento para biofármacos?, 370
 - 12.3.2 Exigências legais para produção, fabricação e comercialização, 371
- 12.4 Ensaio pré-clínicos, 371
 - 12.4.1 Toxicidade aguda, 372
 - 12.4.2 Toxicidade subaguda ou doses repetitivas, 372
 - 12.4.3 Toxicidade crônica e subcrônica, 372
 - 12.4.4 Teratogenicidade e distúrbios reprodutivos, 372
 - 12.4.5 Imunotoxicidade, 372
 - 12.4.6 Farmacocinética, 372
 - 12.4.7 Carcinogenicidade ou oncogenicidade, 373
 - 12.4.8 Ensaio para estudos pré-clínicos *in vitro* – mutagenicidade, 373
 - 12.4.9 Ética na experimentação animal, 374
- 12.5 Aspectos legais para ensaio clínico, 374
 - 12.5.1 Fases do ensaio clínico, 374
 - 12.5.2 Aspectos éticos dos ensaios em seres humanos, 375
- 12.6 Controle de qualidade, 376
 - 12.6.1 Ensaio físico-químicos, 376
 - 12.6.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (Clae), 376
 - 12.6.1.2 Eletroforese em SDS-PAGE, 378
 - 12.6.1.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, 379
 - 12.6.1.2.2 Condições redutoras, 379
 - 12.6.1.2.3 Condições não redutoras, 379
 - 12.6.1.2.4 Características da eletroforese de gel em sistema tampão descontínuo, 380
 - 12.6.1.2.5 Detecção das proteínas nos géis, 380
 - 12.6.1.2.6 Determinação da massa molecular, 380
 - 12.6.1.2.7 Validação do ensaio, 381
 - 12.6.1.2.8 Determinação quantitativa das impurezas, 381
 - 12.6.1.3 RMN – Ressonância Magnética Nuclear, 381
 - 12.6.1.4 Eletroforese Capilar, 383
 - 12.6.1.4.1 Equipamento, 384
 - 12.6.1.4.2 Parâmetros instrumentais, 385
 - 12.6.1.4.3 Parâmetros da solução eletrolítica, 385
 - 12.6.1.5 Espectrofotometria, 386
 - 12.6.1.5.1 Absorção atômica, 386
 - 12.6.1.5.1.1 Espectrometria de absorção atômica com chama, 386
 - 12.6.1.5.1.2 Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, 386
 - 12.6.1.5.1.3 Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, 387
 - 12.6.1.5.1.4 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, 387
 - 12.6.1.5.2 Massa, 387
 - 12.6.1.5.3 Ultravioleta (UV), Visível (VIS) e Infravermelho (IR), 388
 - 12.6.1.5.3.1 Instrumentação utilizada no ultravioleta (UV) e visível (VIS), 389
 - 12.6.1.5.3.2 Instrumentação utilizada no infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR), 390
 - 12.6.1.6 Outros (pH, sólidos totais, conservantes, isotonicidade), 390
 - 12.6.2 Ensaio biológicos, 392
 - 12.6.2.1 *In vivo*, 392
 - 12.6.2.1.1 Animais transgênicos, 392
 - 12.6.2.1.2 Animais *knockout*, 392
 - 12.6.2.1.3 Animais isogênicos (*inbreed*), 392
 - 12.6.2.1.4 Animais convencionais *outbreed*, 393
 - 12.6.2.2 *In vitro*, 393
 - 12.6.2.2.1 Citotoxicidade, 393
 - 12.6.2.2.2 Isoenzimas, 393
 - 12.6.3 Ensaio microbiológicos, 393
 - 12.6.3.1 Fungos e bactérias, 393
 - 12.6.3.2 Micoplasmas, 394
 - 12.6.3.3 Vírus adventícios, 394
- 12.7 Validação de Processo, 394
 - 12.7.1 Tipos de qualificação, 395
 - 12.7.2 Tipos de validação, 395

- 12.7.3 Validação de processo em biorreatores (*upstream*), 396
- 12.7.4 Validação de processos de extração e purificação (*downstream*), 396
- 12.7.5 Validação de remoção de vírus adventícios, 397
 - 12.7.5.1 Métodos físicos, 397
 - 12.7.5.2 Métodos químicos, 398
- 12.7.6 Validação da remoção/inativação viral, 398
- 12.8 Validação de metodologia analítica, 399
 - 12.8.1 Controle de mudanças, 399
 - 12.8.2 Padrão de referência, 399
 - 12.8.3 Desenvolvimento do método, 399
 - 12.8.4 Ensaios biológicos, 401

Referências bibliográficas, 402

Capítulo 13

Perspectivas da biotecnologia farmacêutica

Michele Vitolo

- 13.1 Introdução, 405
- 13.2 Algumas doenças neurodegenerativas, 405
- 13.3 Esquistossomose, 406
- 13.4 AIDS, 406
- 13.5 Câncer, 407
- 13.6 Células-tronco, 411
- 13.7 Interfaces da biotecnologia, 412
- 13.8 Administração de biofármacos, 414
- 13.9 Terapêutica personalizada, 415
- 13.10 Biomoléculas sintéticas, 417
- 13.11 A eletrônica na biotecnologia farmacêutica, 418
- 13.12 Conclusão, 419

Referências bibliográficas, 419

Aspectos básicos da biotecnologia

Michele Vitolo

1.1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um conjunto de tecnologias que utilizam células, organelas celulares e moléculas biológicas, visando solucionar problemas, bem como desenvolver e/ou melhorar produtos de interesse econômico.

A biotecnologia, tão decantada nos últimos 20 anos, vem sendo usada pelo homem há milênios, na fabricação de cerveja (produzida pelos Sumérios e Babilônios desde 6000 a.C.), pão (produzido pelos egípcios desde 4000 a.C.), vinho e queijo – há registro sobre a fabricação desses produtos desde 4000 a.C. –, entre outros.

Sucedem que esses produtos biotecnológicos eram produzidos por meio de técnicas artesanais, desenvolvidas de modo completamente empírico, desconhecendo-se, por conseguinte, os mecanismos envolvidos nos processos de fabricação. Porém, no século XVII, Antonie van Leeuwenhoek inventou o microscópio óptico, com o qual foi possível reconhecer formas de vida invisíveis ao olho humano. Os conhecimentos acumulados sobre os micro-organismos levaram Pasteur (1857-1876) à conclusão de que eles eram os agentes responsáveis pela ocorrência dos processos fermentativos.

Uma vez elucidado o mecanismo da fermentação, foi possível desenvolver novos processos fermentativos para a fabricação de outros produtos de interesse comercial, tais como etanol, ácido acético, butanol e acetona. Todos esses processos eram executados em condições não assépticas. O tratamento anaeróbico do lixo urbano, amplamente usado na atualidade, pode ser enquadrado dentro desse contexto.

A partir de 1940, foram desenvolvidos processos fermentativos realizados em condições assépticas, nos quais eram empregadas culturas de cepas microbianas puras. Em decorrência, foi possível produzir antibióticos, esteroides, aminoácidos, vacinas, enzimas, entre inúmeros outros produtos.

O grande avanço na tecnologia de fermentação deveu-se à obtenção de cepas microbianas puras, altamente produtivas, nos produtos específicos desejados. Isso foi conseguido por meio do melhoramento genético das cepas selvagens. A técnica amplamente empregada para esse fim – sobretudo a partir de 1940 – foi o isolamento de mutantes com as características desejadas. As mutações eram provocadas com agentes físicos (por exemplo, luz UV) ou químicos, os quais causavam modificações aleatórias no DNA da célula, sendo

os mutantes selecionados a partir de meios de cultura desprovidos de nutrientes específicos. O cruzamento seletivo entre cepas aparentadas, sobretudo da mesma espécie, também foi muito usado para o melhoramento celular. No entanto, a grande reviravolta – ocorrida em 1972 – no melhoramento da capacidade produtiva das

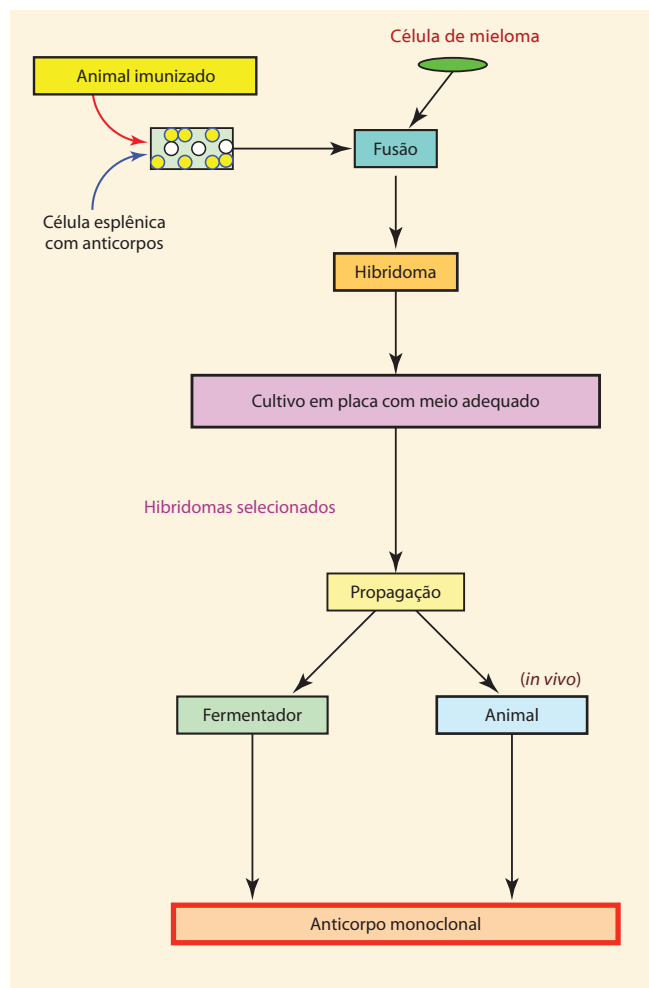


Figura 1.1 Esquema simplificado da técnica de fusão celular.

1.2 MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

1.2.1 Introdução

Os organismos vivos são constituídos por uma variedade muito grande de macromoléculas – denominadas genericamente de biomoléculas – a saber, carboidratos (polímeros de açúcares de baixa massa molar), proteínas (polímeros de aminoácidos), ácidos nucleicos (polímeros de nucleotídeos) – compreendendo os chamados ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) – e lipídeos (grupo heterogêneo de compostos,

células (microbianas ou não), foi o desenvolvimento das tecnologias da fusão de células (hibridoma) (Figura 1.1) e do DNA recombinante (Figura 1.2) – as quais constituem a chamada engenharia genética –, que possibilitaram a introdução de mudanças específicas e planejadas diretamente no DNA celular.

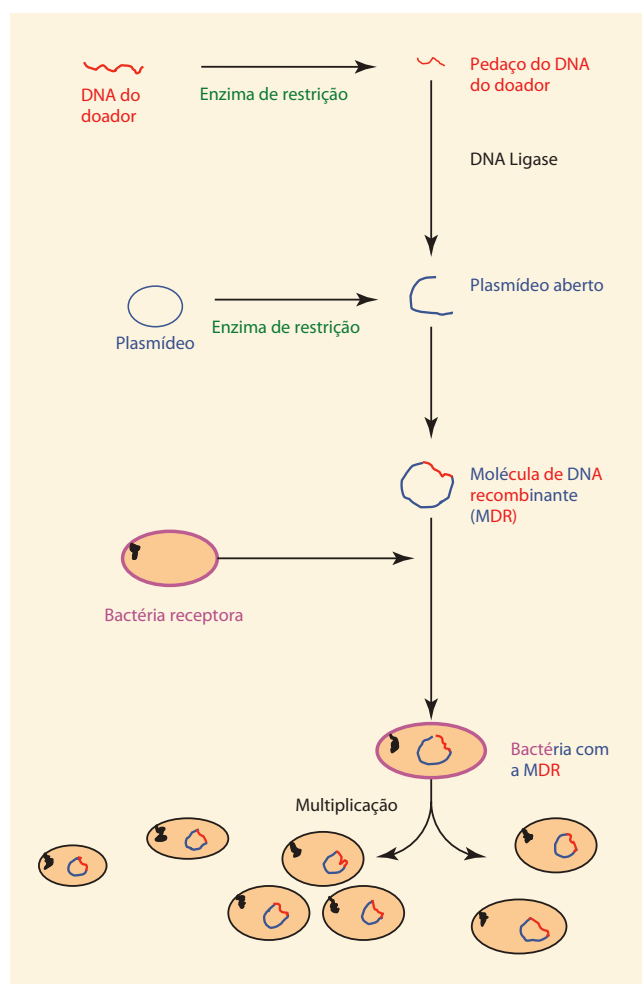


Figura 1.2 Esquema simplificado da técnica do DNA-recombinante.

agrupados pela característica comum de serem solúveis em solventes orgânicos).

Apesar dos carboidratos e dos lipídeos constituírem uma classe de biomoléculas fundamentais para a manutenção da vida celular e, por extensão, dos organismos completos, não são os alvos principais da biotecnologia como no caso das proteínas e dos ácidos nucleicos. Os carboidratos, no entanto, são macromoléculas envolvidas em diversas funções dentro da célula, a saber, armazenamento de energia, manutenção da estrutura celular, estimulantes da resposta imune (aumentam o número e a atividade dos leucócitos), sinalizadores para células e substâncias

envolvidas na resposta anti-inflamatória, na interação antígeno-anticorpo, entre outras. Os lipídeos, por sua vez, desempenham funções de fundamental importância para a vida, a saber, estocar energia no tecido adiposo, formar as membranas celulares (na forma de bicamada lipídica), manter a fluidez das membranas biológicas (papel desempenhado pelo colesterol nos seres eucarióticos) e participar de processos bioquímicos variados. Como exemplo para este último caso, lembra-se do Fator de Ativação Plaquetário (PAF, na sigla em inglês), que é responsável pela agregação das plaquetas (no processo de coagulação sanguínea), dilatação de vasos sanguíneos, mediação de processos inflamatórios, choque e respostas alérgicas, fixação do zigoto (o óvulo fertilizado) na parede uterina e pela estimulação da formação de uma lipoproteína, que protege os pulmões de recém-nascidos.

1.2.2 Proteínas

A proteína, do grego “Proteios” (ou seja, “da primeira classe”), é um polímero de aminoácidos – sendo estes, em todas as proteínas dos seres da biosfera, isômeros estereoespecíficos da forma L, haja vista todos eles, com exceção da glicina, possuírem átomo de carbono assimétrico (aquele ligado ao amino grupo e à carboxila) – ligados entre si por uma ligação amida, comumente designada por “ligação péptica”.

A ligação péptica é rígida e plana, podendo as cadeias polipeptídicas dobrar-se em estruturas regulares na forma de α -hélice e/ou folha pregueada- β . No entanto, os polipeptídeos naturais, frequentemente, apresentam trechos em α -hélice, seguidos ou alternados com trechos em folha pregueada- β ou, ainda, trechos desprovidos de qualquer tipo de padrão estrutural.

A α -hélice, em linhas gerais, tem a forma de um bastão. É estabilizada por ligações de hidrogênio (ligações de H), estabelecidas entre o C=O de um aminoácido com o grupo NH do 4º aminoácido à frente na sequência linear da cadeia peptídica. Assim, todos os grupos NH e C=O da cadeia principal estão ligados por ligações de H. O sentido de rotação da α -hélice pode ser horário (para a direita, sendo o padrão mais comum) ou anti-horário (para a esquerda, sendo um padrão mais raro). Normalmente, em proteínas estruturais, as α -hélices se entrelaçam (queratina, miosina, tropomiosina, fibrina, epidermina, entre outras).

A folha pregueada- β tem a forma de uma folha quase distendida. É estabilizada por ligações de H entre grupos NH e C=O pertencentes a cadeias polipeptídicas diferentes. Cadeias adjacentes na folha pregueada podem correr na

mesma direção (folha β paralela) ou em direções opostas (folha β antiparalela).

As proteínas são ricas em potencialidade de formação de ligações de H. As que se formam entre C=O e NH de aminoácidos na **mesma** cadeia dão origem aos padrões estruturais α -hélice, ou, se em cadeias diferentes, à folha pregueada- β . Porém, os resíduos dos aminoácidos (as cadeias laterais), também, formam, entre outras, as ligações de H, provocando o enovelamento da estrutura macromolecular (nesse caso ocorrem, também, outras ligações fracas, a saber, ligações de sulfeto, forças hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações eletrostáticas). Em particular, as proteínas hidrossolúveis enovelam-se em estruturas compactas com o interior apolar e a superfície polar. Esse enovelamento é espontâneo, pois a água empurra os grupos apolares para dentro da estrutura. Isto é observado tanto em proteínas ricas em α -hélice (por exemplo, mioglobina) quanto para as ricas em folhas pregueadas- β (por exemplo, ribonuclease).

Na arquitetura das proteínas são distinguíveis quatro padrões estruturais; a saber, **estrutura primária** (é a sequência de aminoácidos e a localização das ligações de sulfeto, caso existam), **estrutura secundária** (é o arranjo espacial dos radicais de aminoácidos, que estão próximos uns aos outros na sequência linear, fornecendo os padrões em α -hélice e folha pregueada- β), **estrutura terciária** (consiste do arranjo espacial de aminoácidos, que estão localizados em posições distantes na sequência linear, e que interagem por meio de forças químicas fracas, como, força de Van der Waals, força hidrofóbica, força eletrostática e força induzida dipolo-dipolo) e **estrutura quaternária** (consiste do arranjo espacial e da natureza dos contatos das cadeias polipeptídicas, quando a proteína possui pelo menos duas dessas cadeias). Além desses níveis de organização, devem ser lembrados outros dois, a saber, a **estrutura supersecundária** – que consiste de aglomerados de estrutura secundária – e, os **domínios** (referem-se aos enovelamentos compactos, em geral, formados por 100 a 400 aminoácidos, localizados em alguns pontos da estrutura proteica).

Em um ser vivo, as proteínas desempenham várias funções: a) Catálise de reações químicas intracelulares (nesse caso recebem o nome de enzimas); b) Transporte de substâncias: hemoglobina (transporta o oxigênio no sangue), mioglobina (transporta o oxigênio nos músculos), transferrina (transporta o íon ferro no sangue); c) Armazenamento: ferritina (armazena íons ferro no fígado); d) Movimento coordenado: representado pelas proteínas contráteis (actina, miosina, as das caudas dos espermato-

zoides e às dos filamentos, que guiam os cromossomos nos processos de mitose e meiose); e) Sustentação mecânica: colágeno, que dá tensão à pele e aos ossos; f) Proteção imunológica (anticorpos); g) Geração e transmissão de impulsos nervosos: receptores da acetilcolina localizados na parede dos neurônios, por exemplo; h) Controle do crescimento e da diferenciação (hormônios).

Sinteticamente, pode-se afirmar que a essência da ação das proteínas repousa em dois aspectos; a saber, na ligação específica com um efetor químico e na transmissão intramolecular de mudanças conformacionais (aquelas que não envolvem a ruptura de ligações covalentes presentes na macromolécula) (Figura 1.3).

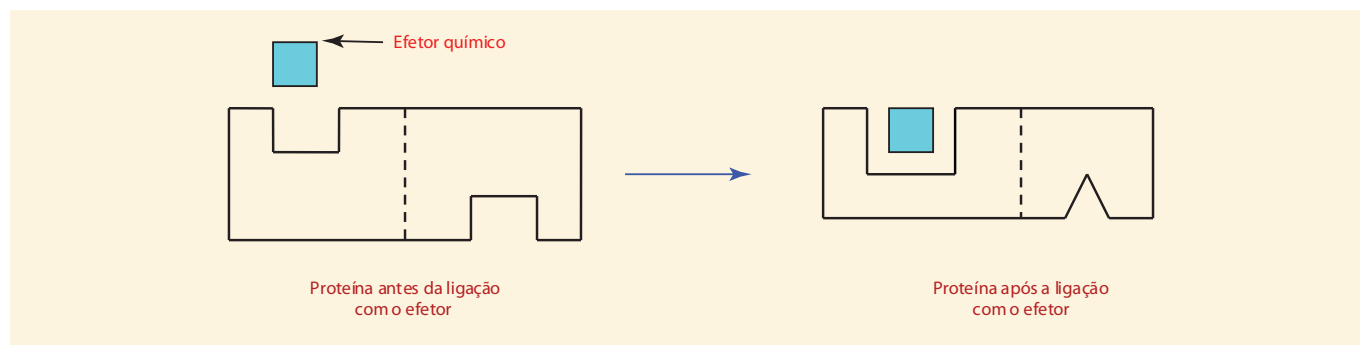


Figura 1.3 Esquema da mudança conformacional sofrida por uma proteína, após a interação com um efetor químico específico.

1.2.3 Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos, constituídos pelo DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), basicamente estão envolvidos no fluxo da informação genética, no autocontrole da expressão dos genes e no controle do metabolismo celular.

O DNA é uma macromolécula formada por dois filamentos longos emparelhados, formando uma estrutura helicoidal (mais especificamente uma α -hélice). Cada filamento é formado pelo encadeamento de nucleotídeos. Os nucleotídeos, por sua vez, são formados por desoxirribose, três grupos fosfatos e uma base nitrogenada (guanina [G], timina [T], citosina [C] ou adenina [A]). Ao se associarem, os nucleotídeos o fazem intercalando um grupo fosfato entre duas desoxirriboses, cada qual ligada a uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas de um dos filamentos pareiam com as complementares do outro (citosina com guanina e adenina com timina), mantendo os filamentos unidos na forma helicoidal por intermédio das ligações de hidrogênio, um tipo de ligação não covalente muito disseminada no mundo biológico. Ao longo da estrutura do DNA, as bases nitrogenadas estão dispostas do lado de dentro da hélice (formando os “degraus” da escada helicoidal), enquanto os grupos fosfato e as desoxirriboses estão do lado de fora (formando o “corrimão” da escada). A estrutura do DNA é essencialmente a mesma em qualquer ser vivo, diferindo, apenas, no número de bases nitrogenadas

e em sua sequência (ou seja, adenina-citosina-guanina \neq guanina-citosina-adenina). Um aspecto importante a ser destacado é o fato da molécula de DNA possuir a capacidade de se **replicar** (uma molécula de DNA é capaz de originar outra idêntica) por meio da ação de uma enzima específica chamada DNA-polimerase. O DNA humano possui cerca de três bilhões de bases A, C, T e G (GIBBS, 2004).

Dá-se o nome de genoma à soma de informações hereditárias no interior dos cromossomos, que governam o desenvolvimento e a vida de um organismo. Um cromossomo não é um entrelaçamento casual de DNA – como normalmente apresentado nas figuras dos livros – e nem um objeto único, mas um complexo de ácido desoxirribonucleico, proteínas (as histonas) e outras moléculas ou radicais químicos (por exemplo, metila, acila etc.). A essa mistura complexa dá-se o nome cromatina. A molécula de DNA constituinte de um cromossomo que se encontra enrolada em grumos de histonas, tal como uma linha em um carretel, e o conjunto como um todo é empacotado. Esse tipo de arranjo permite que longos filamentos de DNA, sejam compactados no interior de organelas diminutas, como os núcleos das células eucarióticas. Salienta-se que seções de cromatina podem se condensar (ocultando áreas inteiras de DNA) e se expandir (expor segmento de DNA à transcrição pela RNA polimerase) independentemente. O genoma é uma máquina bioquímica complexa, com atuação ininterrupta e passível de

sofrer modificações constantemente. As modificações são tão intensas e frequentes que até mesmo gêmeos monozigóticos apresentam variações em uma série de cópias de genes, a ponto de um gêmeo, por exemplo, poder sofrer de diabetes e o outro não (CHOI, 2008).

O ácido ribonucleico (RNA) é uma macromolécula filiforme, que difere do DNA por possuir a ribose no lugar da desoxirribose e a base nitrogenada **uracila** no lugar da **timina**. O RNA é um polímero longo, podendo ser unifilar ou bifilar, linear ou circular. Existem basicamente três tipos de RNA; a saber, RNA_m (mensageiro), RNA_r (ribossômico) e RNA_t

(transporte), cada qual com um papel específico no fluxo da informação genética (Figura 1.4). Esta se dá em duas etapas, a **transcrição** (caracterizada pela formação do RNA_m pela ação da enzima RNA-polimerase, que toma um trecho de uma das fitas do DNA, como molde) e a **tradução** (ocorre em uma organela do citoplasma celular chamada ribossomo – formado por um emaranhado de proteína e de ácido ribonucleico (o RNA_r) – para onde moléculas de aminoácidos são direcionadas, pelo RNA-transportador (RNA_t), e dispostas em cadeia, originando uma proteína, o produto final do fluxo da informação genética (AST, 2005).

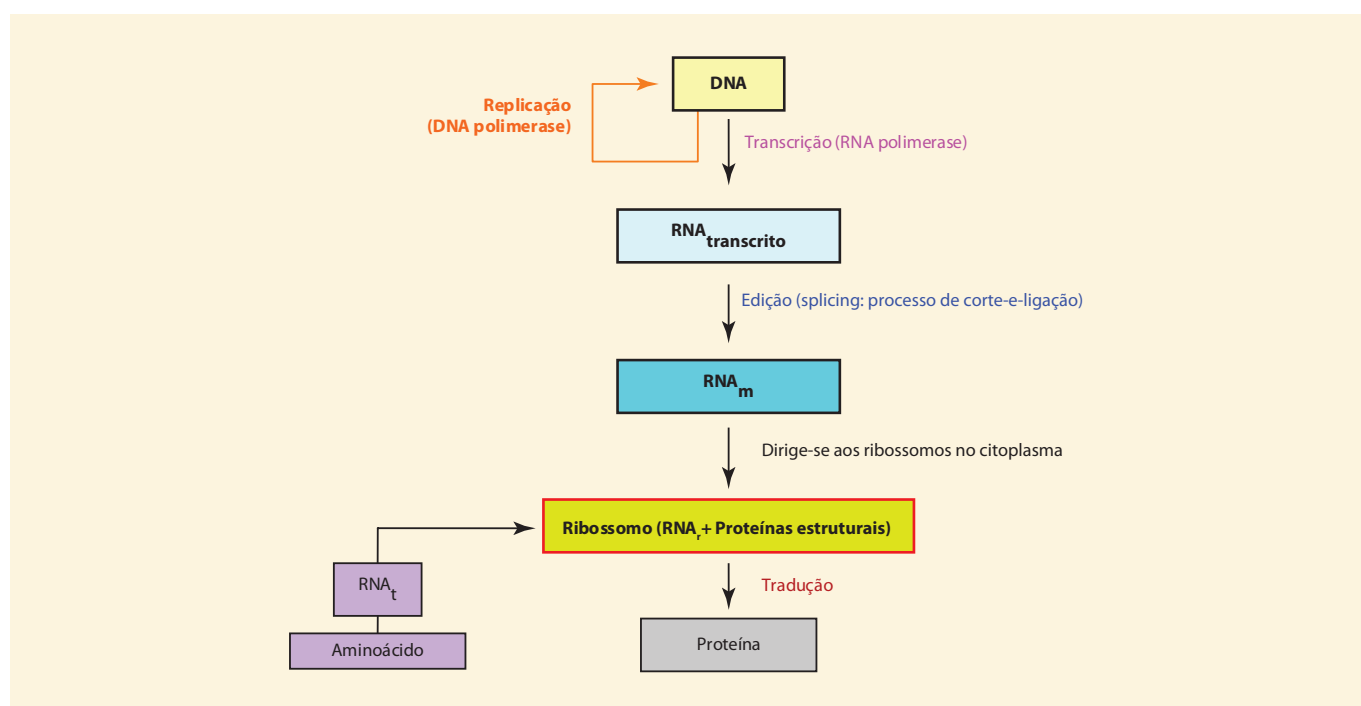


Figura 1.4 Esquema básico do fluxo da informação genética em eucariotos. O transcrito de RNA é editado por meio do *splicing* (do inglês, emendar), de modo que as partes do RNA resultantes da transcrição dos íntrons do gene são removidas e as partes correspondentes aos éxons são emendadas, dando origem ao RNA_m, que será traduzido em proteína.

Trechos de DNA cromossômico, que se expressam em proteínas completas, são chamados **éxons**, e os trechos que não se expressam em proteínas são chamados **íntrons**. Assim sendo, os genes – trechos discretos do DNA cromossômico envolvidos no fluxo da informação genética – são constituídos ou só por éxons (procariotos) ou por éxons e íntrons intercalados (eucariotos, em geral). Lembra-se, ainda, que o espaço do DNA intergênico não codifica proteínas, mas tão somente RNA. Segundo Gibbs (2003), o termo “gene” deveria ser trocado pelo termo “unidade de transcrição”, haja vista a maior parte do DNA codificar RNA e não proteínas. Além disso, a quantidade

de DNA não codificador de proteínas parece aumentar com a complexidade do organismo.

O esquema apresentado na Figura 1.4 reflete o panorama amplamente aceito até 20 anos atrás. Porém, descobriu-se que o esquema era muito mais complicado, à medida que os mapas do genoma de organismos complexos, inclusive o do *Homo sapiens*, tornaram-se conhecidos. No caso do genoma humano, estima-se que seja constituído por 25 mil genes, que governam a biossíntese de cerca de 90 mil tipos diferentes de proteínas. Logo, há algo de incorreto na ideia “um gene, uma proteína” (AST, 2005). O *splicing* convencional, tem por objetivo remover os

transcritos de íntrons e originar o RNA_m (formado só por éxons). O processo se dá pela interação de certas proteínas nucleares, chamadas proteínas reguladoras do *splicing* (PRS), com os éxons do RNA transcrito – o ponto de contato éxon-PRS é chamado Ativador Exônico de Splicing (AES) – as quais atraem moléculas de RNA nuclear de pequena massa molar (snRNA). Até o momento, foram identificados seis tipos diferentes de snRNA (AST, 2005). Os snRNA se ligam a pontos específicos do RNA transcrito, delimitando os trechos dos íntrons a serem descartados. Nesses pontos, ocorrem diversas outras proteínas nucleares, resultando uma estrutura funcional chamada *spliceossomo*, que executa o corte das extremidades dos íntrons com a concomitante ligação dos éxons entre si. Contudo, uma PRS pode se ligar a um sítio do éxon diferente do AES, chamado Supressor Exônico de Splicing (SES), que acaba inibindo a ligação dos snRNA nos pontos que identificam, apenas, os íntrons no transcrito de RNA, levando à deleção do éxon, também. Esse processo distinto de edição do RNA_{transcrito} foi chamado **splicing alternativo**. Segundo Ast (2005), a deleção de éxons é o tipo mais comum de *splicing* alternativo entre os mamíferos, respondendo por, cerca de, 38% desse tipo de processamento genético em humanos. Em média, um gene humano dos que codificam proteínas tem 28 mil nucleotídeos, com 8,8 éxons separados por 7,8 íntrons. Os éxons são relativamente curtos, em geral, têm cerca de 120 nucleotídeos, enquanto os íntrons variam de 100 a 100 mil nucleotídeos de comprimento. Lembre-se, como curiosidade, que os humanos – entre todos os organismos da biosfera – possuem o maior número de íntrons por gene.

Do exposto, depreende-se que a capacidade dos humanos em produzir mais de 90 mil proteínas diferentes sem ter de dispor de igual número de genes, repousa no mecanismo do *splicing* alternativo. Em média, cada um dos genes humanos dá origem a três RNA_m por meio do *splicing* alternativo (AST, 2005). Porém, esse fato não explica a existência de tantos íntrons no DNA humano, a ponto das sequências exônicas não ocuparem mais do que 3% de todo o genoma. Além disso, a complexidade do mecanismo de *splicing* quer alternativo quer não, exige um alto consumo energético e pode propiciar a ocorrência de erros durante o corte e a emenda do RNA_{transcrito}. Como exemplo dessa última situação, lembra-se uma doença hereditária denominada síndrome de Riley-Day – doença que afeta o desempenho e o funcionamento dos nervos de todo o corpo –, que resulta de uma modificação em um único nucleotídeo do gene IKBKAP (localizado no cromossomo 9), que faz com que ele sofra *splicing* alternativo em tecidos do sistema nervoso, no qual tal

reação não deveria ocorrer. A redução da disponibilidade da proteína padrão IKBKAP decorrente disso, causa desenvolvimento anômalo do sistema nervoso. Pelo menos 15% das mutações, que provocam doenças genéticas e provavelmente determinados tipos de câncer, fazem isso ao afetar o *splicing* do RNA_{transcrito} (AST, 2005). A existência de tamanha quantidade de íntrons no genoma humano pode ser compreendida, ao menos em parte, se for considerado que os íntrons servem de locais para a inserção de fragmentos pequenos de DNA – constituídos por 300 a 500 nucleotídeos e caracterizados por possuírem uma sequência repetida de um dado tipo de nucleotídeo, por exemplo, **poliadenina** em uma de suas extremidades – denominados retrotranspósons.

Parece que a função dos retrotranspósons, seria a geração de autocópias e depois reinseri-las, aleatoriamente, entre os íntrons do genoma. Sucede que – se o sistema retrotranspóson-íntron sofrer uma mutação, por exemplo, durante a mitose ou meiose, da qual resulta o aparecimento de um ponto favorável à ligação de um snRNA, e, em consequência a formação de *spliceossomo* – o íntron pode passar a ser expresso, ou seja, se tornar um éxon. Nessa situação, o organismo adquiriu a capacidade de sintetizar uma nova proteína, a qual se trouxer vantagens metabólicas, passa a ser parte integrante do corpo. Segundo Ast (2004), se o novo éxon só for incluído no *splicing* alternativo, o organismo passa a ter suas células aptas a produzir uma nova proteína. Mas a nova habilidade não interfere na função original do gene, porque os tipos antigos de RNA_m ainda continuam a ser sintetizados, quando o novo éxon é deixado de fora no *splicing*. Porém, quando o éxon se torna constitutivo – ou seja, o éxon passa a ser incluído em todos os RNA_m – podem surgir doenças, como por exemplo, a síndrome de Alport (transtorno hereditário ligado ao cromossomo X, que causa danos renais sérios, perda da audição e problemas visuais), a síndrome de Sly (doença metabólica hereditária relacionada à alteração da biossíntese dos mucopolissacarídeos; esses compostos estão amplamente distribuídos pelo corpo, participando da formação dos ossos, das cartilagens, dos tendões, da córnea, da pele e do tecido conectivo) e a atrofia girata de coróide e retina (desordem genética de herança autossômica recessiva localizada no cromossomo 10; a sua ocorrência é muito rara e surge por causa da deficiência da enzima ornitina aminotransferase). Acrescenta-se que, recentemente, surgiram evidências claras sobre a frequente movimentação de retrotranspósons no genoma das células-tronco tecido específicas do hipocampo (região do cérebro relacionada à memória e à atenção),

as quais explicariam as diferenças de comportamento, cognição e risco a certas doenças mentais (esquizofrenia, por exemplo) na espécie humana, até mesmo, entre gêmeos univitelinos (GAGE; MUOTRI, 2012).

Os genes, segundo o paradigma-padrão discutido, são aquelas seções do DNA – perfazendo no máximo 3% de todo o ácido desoxirribonucleico celular – que codificam proteínas funcionais. No entanto, o restante do DNA, dito “não codificador”, pode dar origem a moléculas de RNA muito ativas, incluindo variedades que podem silenciar ou regular genes convencionais. Até o momento, foram identificados quatro diferentes tipos de RNA, a saber, RNA-antissenso, RNA de interferência (RNA_i), micro-RNA e RNA-comutador (*riboswitch*, em inglês). Por conta dos vários tipos de RNA o esquema do fluxo da informação genética se torna bem mais complexo (Figura 1.5).

O **RNA antissenso**, aparentemente, pode ser formado por um gene codificador, apenas, de ácido ribonucleico – chamado pseudogene – ou resultar da transcrição da fita de DNA complementar àquela transcrita em RNA_m.

Segundo Gibbs (2003), foram descobertos, até agora em humanos, 1.600 genes, cujas fitas complementares do DNA são transcritas em RNA antissenso. O pseudogene, por sua vez, produz um RNA que controla a expressão do gene “verdadeiro”, cuja sequência imita, apesar dos dois se situarem, na maioria das vezes, em cromossomos diferentes. Essa situação foi bem evidenciada em um caracol lacustre, no qual se descobriu que em seus neurônios, tanto o gene para a enzima sintase de óxido nítrico (NOS) quanto seu pseudogene correspondente eram transcritos em RNA, mas a transcrição deste inibia a produção de proteína pelo gene normal de NOS (GERSTEIN; ZHENG, 2006). De qualquer forma, o RNA antissenso, quando atinge determinada concentração no núcleo da célula, se liga normalmente ao RNA_m complementar, formando uma dupla-fita de RNA, a qual perde a característica de ser traduzida em proteína. Contudo, o RNA antissenso transcrito do pseudogene pode se ligar não só a um dado RNA_m, mas também a um dado trecho de DNA, a proteínas e a compostos de baixa massa molar (os efetores celulares).

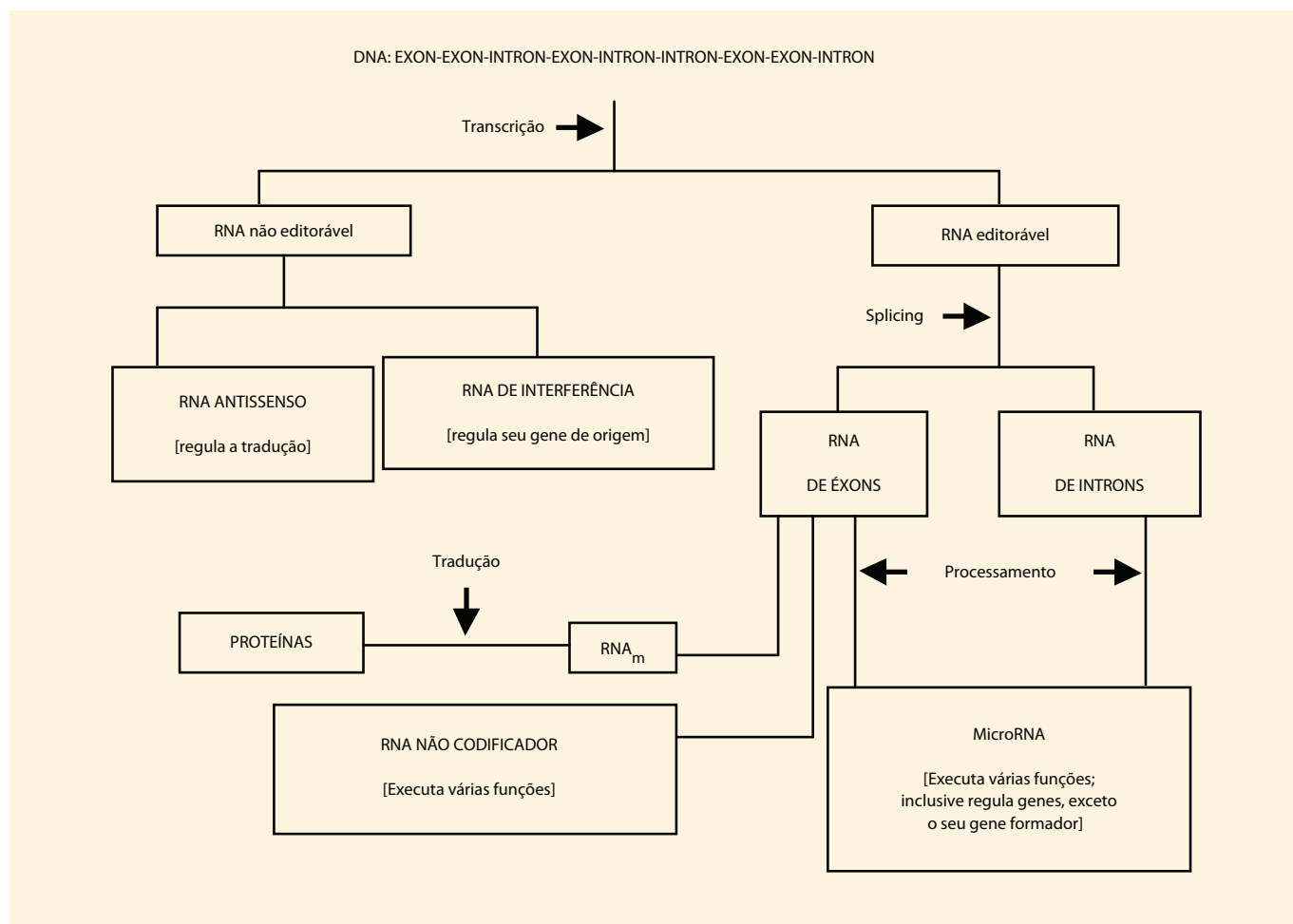


Figura 1.5 Fluxo da informação genética em eucariotos.

Os micro-RNAs originam-se, basicamente, de íntrons removidos do RNA_{transcrito} por meio do *splicing* – constituindo, neste caso, o micro-RNA precursor, já que sua massa molar é bem maior daquela do micro-RNA, que efetivamente dispara o silenciamento de um dado gene – e/ou como intermediários do “mecanismo RNA Interferência (RNA_i)”. Neste último caso, são produzidos pela transcrição de elementos genéticos móveis (transpósons), de genes anômalos e/ou de retrovírus invasores em replicação. Os micro-RNAs são RNAs de dupla-fita, curtos, não codificadores e que se dobram sobre si mesmos, formando uma estrutura em forma de “grampo de cabelo”. Normalmente, são encontrados flutuando no meio citoplasmático, e que, por meio de um mecanismo, ainda, não explicado, se desenrolam, liberando ambas as fitas, as quais se ligam aos RNA_m complementares, evitando que estes sejam traduzidos em proteínas. Até o momento, foram encontrados cerca de 150 micro-RNAs em humanos (GIBBS, 2003).

O mecanismo RNA Interferência (RNA_i) – existente em todas as células animais e vegetais – atua, basicamente, como um censor da atividade gênica das células. Toda vez que um gene anormal é expresso – podendo comprometer a vida da célula e, por tabela, a existência do organismo como um todo – o mecanismo RNA_i é ativado. Lembra-se, também, que, se não houvesse um mecanismo controlador da transcrição gênica normal, a produção de proteínas e, por extensão, a de biomoléculas em geral, seria incessante, causando, no final, uma espécie de “intoxicação por biomoléculas” da célula. Por outro lado, deve-se considerar a possibilidade do mecanismo RNA_i desempenhar um papel de destaque durante o desenvolvimento do organismo, desde a fase embrionária até a adulta. Ao longo desse período, a partir de uma célula embrionária formam-se miríades de diferentes tipos de células, das quais resultam todos os tecidos do corpo. Para tanto, muitos genes, que se expressam na fase embrionária, deverão permanecer silenciados nas células diferenciadas, assim como aqueles silenciados nas células indiferenciadas, deverão se tornar ativos nas diferenciadas. Frente ao exposto, pode-se considerar que o mecanismo RNA_i, quando não está envolvido na defesa do organismo contra ataques de agentes externos, coopera – por meio da inibição da expressão gênica normal – durante as transições do desenvolvimento, para a formação dos diferentes tipos de células (neurônios, hepatócitos etc.) ou dos diferentes órgãos (cérebro, fígado, rins etc.). Nunca é demais lembrar que cada célula de um organismo possui o mesmo conjunto de genes, mas que a diferença entre elas repousa em quais genes estariam ativados e quais não.

Segundo Lau e Bartel (2003, p. 53), o mecanismo RNA_i funcionaria assim:

Dentro de uma célula, o RNA de duplo filamento encontra uma enzima conhecida como **dicer**. Utilizando o processo químico de hidrólise, o **dicer** quebra o longo RNA em pedaços, conhecidos como RNA curto interferente (siRNA). Cada siRNA contém cerca de 22 nucleotídeos. O **dicer** corta, em posições ligeiramente irregulares, ambos filamentos do longo RNA de duplo filamento, de forma que cada siRNA resultante contenha dois nucleotídeos que se projetam em cada lado de cada filamento. O siRNA duplo é, então, desenrolado e um dos filamentos é transportado ao complexo de proteínas para formar o complexo de silenciamento ou de não expressão induzido pelo RNA (Risc – RNA inducer silencing complex – na sigla em inglês). Dentro desse complexo indutor de silenciamento, a molécula de siRNA é posicionada de forma que o RNA mensageiro possa coincidir com ela. O Risc encontrará milhares de tipos de RNAs mensageiros presentes a qualquer momento em uma célula típica. O siRNA do Risc, porém, ficará bem trancado somente em um RNA mensageiro que lhe seja perfeitamente complementar, ou quase, à sua própria sequência de nucleotídeos. Então, diferentemente do interferon, o complexo indutor de silenciamento é altamente seletivo ao escolher suas mensagens alvo. Quando um RNA mensageiro pareado, finalmente, ancora no siRNA, uma enzima conhecida como **Slicer** corta em dois o filamento do RNA mensageiro capturado. O Risc, então, libera os dois pedaços do RNA mensageiro (agora incapaz de direcionar as sínteses proteicas). O Risc propriamente dito permanece intacto, livre para localizar e fragmentar outro RNA mensageiro. Dessa forma, o censor RNA_i utiliza segmentos do RNA de duplo filamento como uma lista negra para identificar e calar os RNAs mensageiros correspondentes.

A importância de se compreender o funcionamento do mecanismo RNA_i, é seu uso como ferramenta de pesquisa. Usando siRNAs, virtualmente qualquer gene de interesse pode ser desativado em células de mamíferos em cultura, inclusive as humanas, em questão de horas, sendo que o efeito perdura por tempo suficiente para executar um experimento completo. Além da exploração do papel dos genes no crescimento e desenvolvimento do organismo, aqueles de um dado tipo específico poderiam ser submetidos à triagem, visando identificar alvos promissores para novos fármacos. Estimuladas por essas possibilidades, já existem algumas empresas de

biotecnologia, voltadas especificamente para explorar as vantagens oferecidas pelo RNA_i na cura de cânceres, no controle de desordens genéticas de caráter dominante e no combate às infecções virais. Segundo Lau e Bartel (2003), entre as empresas existentes, a alemã Ribopharma está desenvolvendo uma droga – a partir de siRNAs modificados quimicamente – para o tratamento do glioblastoma e que se encontra na fase inicial de testes clínicos. O maior entrave ao uso de siRNAs como fármacos, reside no desenvolvimento de formas farmacêuticas eficientes para administração – que deve evitar a passagem pelo sistema digestivo, onde seriam destruídas em vez de absorvidas – e endereçamento em concentração terapêutica eficaz à região do corpo afetada. Acrescenta-se, também, a alta massa molar da molécula, que dificulta seu trânsito através das várias barreiras corpóreas. Provavelmente, sua administração será feita por meio de lipossomos.

Neste ponto, é importante atentar para a distinção entre o micro-RNA e o siRNA, já que ambos são pequenos fragmentos de ácido ribonucleico e estão envolvidos no silenciamento de genes, regulando, em última instância, a expressão gênica global das células. Essencialmente, ambos diferem quanto à origem. Enquanto os siRNAs provêm dos mesmos tipos de genes ou regiões genômicas que se tornam, mais tarde, silenciadas, os micro-RNAs provêm de genes, cuja única missão é produzi-los. Ou seja, o micro-RNA não bloqueia gene semelhante àquele que o formou, mas outro qualquer.

Ressalta-se que a inibição/controle da expressão gênica da célula pode ser intermediada pelos interferons, proteínas de baixa massa molar (15-35 kDa). No entanto, a “resposta Interferon” só ocorre, quando a célula é atacada por vírus. Os interferons secretados – classificados como α (interferon de leucócitos), β (interferon de fibroblastos) e γ (interferon imune) – ligam-se à membrana citoplasmática de outras células no organismo e induzem nelas um “estado viral”. Essas células adquirem resistência a um amplo espectro de vírus, contrastando com a imunidade conferida por um anticorpo, que é altamente específica. O “estado antiviral” estimula a produção de três enzimas intracelulares – a proteína cinase (PKR), a oligoadenilato sintetase e a endorribonuclease (RNase-L) – que passam a atuar sequencialmente. A PKR inativa o fator de iniciação da síntese proteica – chamado eIF2, cuja função é a de trazer o RNA_i na subunidade 40S do ribossomo – pela introdução de um grupo fosfato na sua estrutura, redundando na inibição da tradução do RNA_m em proteína. A oligoadenilato sintetase catalisa a síntese

de oligoadenilatos, cujo comprimento varia de 2 a 15 nucleotídeos, que por sua vez ativam a RNase-L, que passa a hidrolisar tanto o RNA_m (viral ou não) quanto o RNA_r, componentes fundamentais da maquinaria de síntese de proteínas. Lembre-se que o interferon é uma biomolécula, que “alerta” as células vizinhas às infectadas sobre a invasão virótica. Atualmente, não há dúvidas de que a resposta do interferon é distinta da resposta propiciada pelo mecanismo RNA_i, sendo, inclusive, esta última muito mais eficiente.

Recentemente, foi descoberto em bactérias um tipo particular de ácido ribonucleico, muito longo e de grande massa molar, batizado com o nome de “comutador ribossômico” (*riboswitch*, em inglês), que é codificado pelo DNA intergênico, atuando, basicamente, como um controlador da expressão gênica. O *riboswitch* (RNA_{sw}) tem como característica principal, a capacidade de ser traduzido ou não em uma proteína, dependendo da presença ou não no citoplasma de um efector específico (Figura 1.6). Na essência, o RNA_{sw} atua monitorando a necessidade celular da proteína que ele codifica, por meio de sua habilidade em detectar um metabólito-alvo e reagir alterando sua própria configuração estrutural (BARRICK; BREAKER, 2007).

Até o momento, foram identificadas 12 classes distintas de RNA_{sw} em bactérias, das quais somente uma parece existir em células eucarióticas. Genomas eucarióticos apresentam uma regulação genética mais complexa que as bactérias, e o caminho que vai dos códigos às proteínas é mais tortuoso. Em lugar de fotocópias certinhas do RNA_m, transcrições rascunhadas do gene apresentam, com frequência, enormes blocos de texto não codificador, conhecidos como íntrons, que têm de ser removidos antes da tradução das informações em proteínas (BARRICK; BREAKER, 2007).

O conhecimento de genes em bactérias patogênicas – entre elas *Brucella melitensis* (possui cinco classes de RNA_{sw}, que regulam 21 genes); *Escherichia coli* (possui quatro classes de RNA_{sw}, que regulam 15 genes); *Hemophilus influenzae* (possui cinco classes de RNA_{sw}, que regulam 15 genes); *Helicobacter pylori* (uma classe de RNA_{sw}, que regula dois genes); *Mycobacterium tuberculosis* (três classes de RNA_{sw}, que regulam 13 genes); *Vibrio cholerae* (cinco classes de RNA_{sw}, que regulam 13 genes); e, *Yersinia pestis* (três classes de RNA_{sw}, que regulam 11 genes) (BARRICK; BREAKER, 2007) – regulados por um ou mais RNA_{sw}, possibilita o planejamento de fármacos (antibióticos), análogos estruturais aos seus efetores naturais. Essas moléculas ao se ligarem no sítio de ligação do RNA_{sw}, fariam com que a porção traduzível em proteína fosse inibida.

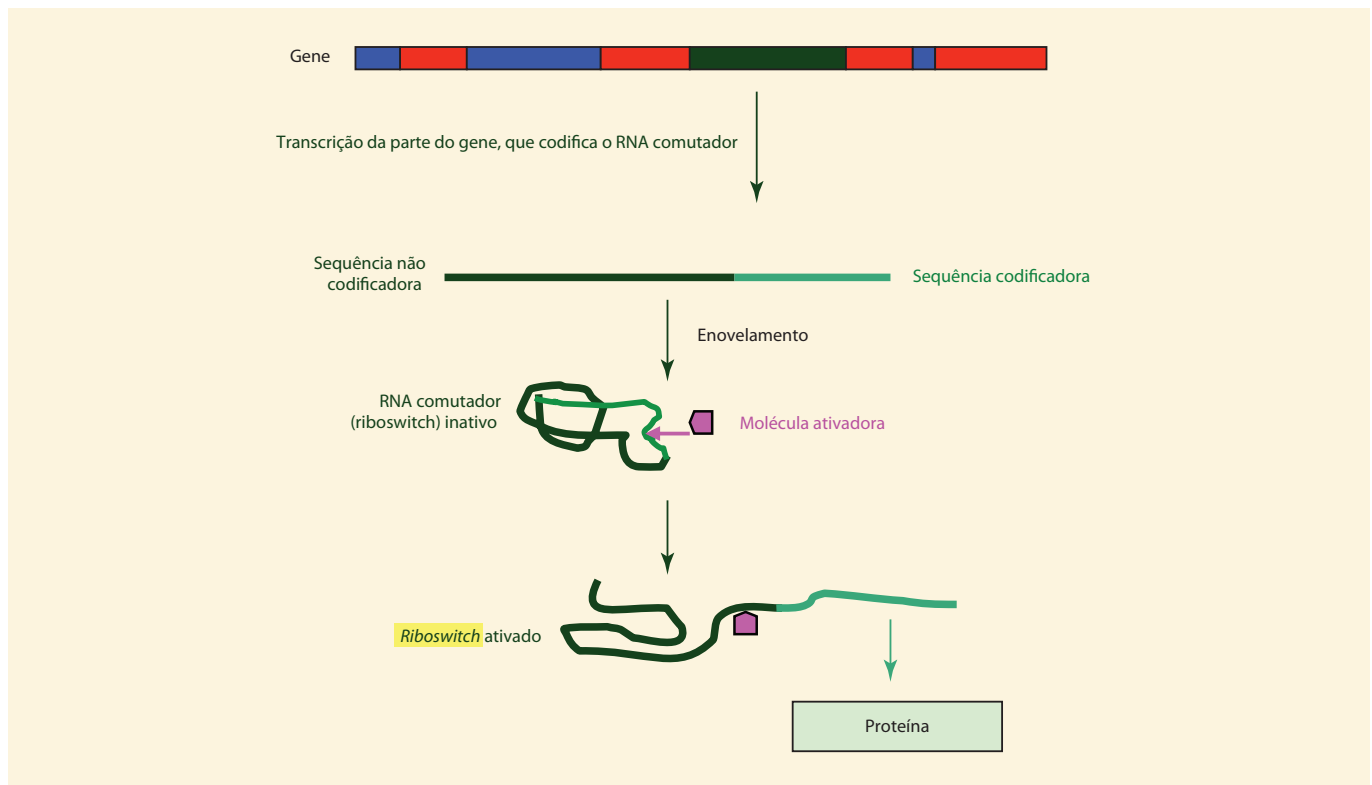


Figura 1.6 Esquema para a transcrição do Riboswitch a partir do DNA gênico. Na primeira fase, forma-se um *riboswitch* cíclico inativo, formado por um trecho traduzível em proteína e outro não traduzível. Na segunda fase, uma substância ativadora, presente no citoplasma em uma dada concentração, liga-se à estrutura cíclica, abrindo-a. Na forma aberta, a parte traduzível fica exposta, encaixa-se no ribossomo, sendo, em seguida, traduzida na proteína correspondente.

Cada vez mais, novos tipos de genes RNA ativos dos longamente negligenciados íntrons e das extensões de DNA intergênico – ou seja, das regiões bem menos visíveis do DNA – estão sendo descobertos. Percebeu-se que, mesmo após a decifração do genoma de várias espécies de seres vivos (inclusive o homem), a tarefa, ainda, está longe de ser concluída. Diferentemente dos genes promotores de proteínas, que apresentam códigos padrões de “começar” e “parar”, os genes que codificam, somente, os diferentes tipos de RNA variam tanto que os programas de computador não conseguem, com segurança, distingui-los da sequência do DNA. O RNA ativo, que está sendo descoberto e descrito, ajuda a controlar, em larga escala, a estrutura dos cromossomos e as modificações químicas a que estão sujeitos. Falhas, porventura existentes na parte “invisível” do DNA, podem ser as causas de eventos, como doenças familiares que surgem de forma súbita e imprevisível – diferindo até entre gêmeos homozigóticos –; de genes ativados e desativados em cânceres e que, no entanto, não apresentam mutações; e embriões que não vingam. Por conseguinte, fica claro que o genoma não codificador de proteínas, tem íntima relação com hereditariedade, desenvolvimento e saúde.

Atualmente, sabe-se que a informação, a qual controla todos os eventos metabólicos característicos de cada célula de um organismo eucariótico, não está totalmente concentrada na sequência dos bilhões de pares de bases constituintes do DNA. Mas, uma parte significativa dela, é governada por uma complexa mistura de proteínas especiais (histonas) e de efetores químicos, que se imiscuem intimamente com o DNA dentro do cromossomo. O conjunto de todos esses componentes é conhecido pelo nome de cromatina, estrutura de aparência filamentososa, que, em última instância, controla o acesso ao DNA. Seções de cromatina podem se condensar e expandir independentemente, escondendo de vista, com eficácia, áreas inteiras de DNA, enquanto expõem outras seções para transcrição. Isto pode ocorrer, porque as histonas – proteínas que se adensam, formando uma estrutura em carretel – permitem que o DNA se enrole em torno delas, tal como um típico carretel de linha de costura. O enrolamento do DNA no carretel “histônico” explica por que as longas fitas duplas desse polímero, podem se acomodar dentro de uma diminuta organela, como é o caso do núcleo da célula eucariótica. Ligados às histonas do carretel, existem marcadores químicos

– acetil, metil, fosfato e ubiquitina (peptídeo de baixa massa molar) – distribuídos em diferentes posições e combinações quaternárias. Essa distribuição, provavelmente não aleatória dos citados grupos químicos, constitui um intrincado código, que atua em paralelo ao código genético. Pode-se, sem dúvida, batizá-lo de **código epigenético**, ou seja, conjunto de informações independentes das controladas pelo DNA. Portanto, a existência da cromatina, constitui um fato concreto de que o cromossomo, de longe, não é um entrelaçamento casual de DNA, mas uma montagem complexa e dinâmica.

Gibbs (2004, p. 89) ilustrou o papel positivo do efeito epigenético no silenciamento de um dos cromossomos X de fêmeas de mamíferos, como segue:

As fêmeas iniciam a vida com dois cromossomos X ativos; os machos herdaram só um. O embrião da fêmea deve amordaçar o X extra, para impedir que suas células recebam uma dose dupla dos genes X. Para tanto, duas partes da máquina genômica conspiram para desativar a terceira. Um gene não codificador denominado **Xist** produz um RNA ativo que reveste o cromossomo X desnecessário. Enquanto isso, o X necessário produz RNA-antissenso, que age como um antídoto para protegê-lo do **Xist**. Uma reação em cadeia se dissemina pelo cromossomo indesejado: metilas marcam grande parte do DNA, as histonas repelem o acetil químico de seus radicais e a cromatina se compacta em uma massa inacessível, revestida por RNA. O cromossomo X silenciado é, então, passado como herança, de forma inativa, a cada célula portadora de genoma, enquanto a fêmea se desenvolve.

Cerca de 45% do DNA humano correspondem a genes virais (ou fragmentos de gene) que se copiaram dentro do genoma durante o curso da evolução, mas que permanecem inativados, graças à metilação de um alto percentual de citosinas – sobretudo aquelas seguidas por uma guanina – participantes destas sequências (GIBBS, 2004). Os transpósons – trechos de DNA que migram de um cromossomo para outro – são silenciados, também, pela metilação. As metilas, utilizadas pela célula para silenciar os muitos trechos de DNA “espúrio”, provêm do ácido fólico e da vitamina B₁₂ (LODISH et al., 1995). Considera-se que a metilação é um dos principais mecanismos epigenéticos de regulação. É fato, sobejamente constatado, que o DNA de células tumorais possui baixo grau de metilação e que células anormais não se tornam malignas, justamente pelo fato de os oncogenes estarem travados pela metilação. É provável que o destravamento de genes indesejados, por

meio da perda da metilação, ocorra durante o processo de divisão celular (mitose e meiose). Talvez compostos estranhos ao organismo – ingeridos de modo involuntário (por meio da poluição ambiental) e/ou voluntariamente (drogas, fumo e automedicação) – provoquem uma desmetilação exagerada, levando ao colapso celular e, no limite, às mais variadas enfermidades.

Diferentemente do código genético estável do DNA, muitos marcadores epigenéticos estão em fluxo constante. Quando uma seção de cromatina se condensa, o efeito inibitório pode se alastrar ao longo do cromossomo até que atinja uma barreira. Essa barreira separaria as porções fortemente condensadas, altamente metiladas e silenciadas daquelas ativas, acessíveis e não metiladas. O aumento da incidência do câncer, à medida que o organismo envelhece, seria consequência da fragmentação dessa barreira, em decorrência do envelhecimento ou da divisão imperfeita das células (GIBBS, 2004).

Conjectura-se que a parte epigenética do genoma influencia os mecanismos de crescimento, envelhecimento e de iniciação do câncer. Há suspeitas, também, de que “epimutações” contribuam para a ocorrência de enfermidades complexas, como diabetes, transtorno bipolar e esquizofrenia, entre outras (GIBBS, 2004). A epigenética, no entanto, pode sugerir novos caminhos para o tratamento das referidas doenças. Enquanto as células obstinadamente protegem seu DNA contra mutações, elas têm como rotina adicionar ou apagar marcadores epigenéticos. Em princípio, as drogas poderiam reparar o código epigenético para ativar e desativar conjuntos inteiros de genes nocivos. Novos medicamentos podem ser capazes de reverter alguns dos danos genéticos que acompanham o envelhecimento ou precedem o câncer (GIBBS, 2004). A esse quadro poder-se-ia associar a questão da senescência celular – indutora do envelhecimento do organismo, de inflamação do tecido circundante e da formação de tumores por meio da secreção de compostos cancerígenos (STIPP, 2012a) –, na qual células são impedidas de se multiplicar devido ao acúmulo no citoplasma da proteína “p16”, que – segundo Stipp (2012b) – é codificada pelo gene p16^{INK4a}. Uma possibilidade a ser demonstrada, futuramente, relacionar-se-ia ao controle da biossíntese da proteína p16 por marcadores epigenéticos, a fim de, não só, retardar o envelhecimento, mas também o aparecimento de doenças. Há evidências de que o perfil de distribuição de marcadores epigenéticos (radicais acetil e metil, por exemplo) em certos cromossomos pode contribuir no aparecimento ou não de transtornos, por períodos mais ou menos longos, relacionados à de-

pendência de drogas (por exemplo, cocaína), depressão, mudanças comportamentais, entre outros (NESTLER, 2012). Nessa direção, deve-se lembrar que o controle da ação da mTOR (mammal target of rapamycin, na sigla em inglês) – uma proteína sensora da bonança nutricional intracelular, promovendo o crescimento e a divisão celular na abundância de nutrientes e o efeito inverso na falta – permitiria, também, interferir nos mecanismos de envelhecimento/longevidade das pessoas. Por conseguinte, inibir a mTOR com fármacos (por exemplo, a rapamicina) seria uma estratégia assaz promissora em geriatria (STIPP, 2012a).

Frente ao exposto, fica clara a necessidade de se mapear a fração epigenética do genoma humano. Segundo Gibbs (2004), foi implantado o “Human Epigenome Project” sob a direção do Wellcome Trust Sanger Institute, da Inglaterra, que pretende, em cinco anos, mapear todos os pontos de metilação do DNA.

Ao se considerar os três níveis da máquina genômica – expressão do DNA em proteínas; o controle da expressão gênica por diferentes RNA; e, a informação epigenética associada ao formato da cromatina, particularmente, à interação entre as histonas e os grupos químicos (fosfato, acetil, metil e ubiquitina) – e, estando todos sujeitos à manipulação, descortina-se, para o futuro, a sedimentação de um novo procedimento biotecnológico, a chamada engenharia genômica.

1.2.4 Vírus

Até o momento, discorreu-se, sucintamente, sobre grupos de biomoléculas que, ao participar da miríade de mecanismos bioquímicos intracelulares, garantem a sobrevivência na biosfera dos mais diferentes organismos.

No entanto, deve-se lembrar de que podem existir, na natureza, combinações particulares de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (DNA ou RNA), sem que suas propriedades funcionais (autorreprodução, geração de energia metabólica, entre outras) sejam percebidas. Tais combinações são encontradas em estruturas inanimadas – quando não se encontram interagindo com uma célula – denominadas genericamente de vírions. Em outros termos, os vírions são aglomerados moleculares organizados, dotados de um potencial de vida, mas que não atingem um estado autônomo de vida (VILLARREAL, 2008).

André Lwoff, citado por Raoult (2008), concluiu que os vírus – designação dos vírions após penetração na célula hospedeira – são bioelementos caracterizados

por tamanho pequeno (dimensões da ordem de até 250 nm), além de possuir um só tipo de ácido nucleico e, no máximo, uma dezena de proteínas, não possuir enzimas capazes de produzir energia, serem parasitas intracelulares obrigatórios e serem incapazes de se multiplicar por divisão. Porém, atualmente, há exceções – como o *Cytomegalovírus* e o MiMiVírus (**M**imiking **M**icrobe **V**írus, em inglês) – cujos tamanhos superam os 250 nm (por exemplo, o mimivírus possui dimensões da ordem de 400 nm), possuem DNA e RNA, além de mais de uma centena de proteínas (RAOULT, 2008). No entanto, todos os vírus conhecidos – desde o vírus Delta¹ (o menor deles) até o mimivírus (o maior deles) – não possuem ribossomos e nem capacidade de codificar as proteínas constituintes do ribossomo. Essas duas características separam o mundo virótico daquele dos organismos com capacidade de reprodução.

A descoberta do mimivírus (parasita de amebas), entretanto, reforça a ideia de que o mundo vivo deve ser dividido em quatro domínios, a saber, o das células eucarióticas (*Arabidopsis thaliana*, leveduras, *Homo sapiens*, por exemplo), o das células procarióticas – estas compreendendo os domínios (linhagens primordiais) das bactérias (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, por exemplo) e da archaea (*Aeropyrum pernix*, *Pyrococcus abyssi*, *Archeoglobus fulgidus*, por exemplo) – o dos vírus e o do mimivírus (RAOULT, 2008). Isso se deve ao fato de o mimivírus ser, de certa forma, um vírus “evoluído”, haja vista possuir 1,2 milhão de bases, cerca de 1.200 sequências que parecem codificantes e que seriam, portanto, genes. Alguns desses genes, por exemplo, codificam proteínas de reparação do DNA e enzimas do metabolismo (SUHRE et al., 2005).

O vírion – a forma extracelular completa de um vírus – tem o seu ácido nucleico (DNA ou RNA ou DNA-RNA) coberto por um capsídeo de proteínas, que o protege do ataque de enzimas do hospedeiro e da quebra mecânica causada por forças de cisalhamento, assim como o injeta no interior de um hospedeiro susceptível. Há vírus em que o próprio capsídeo é protegido por um invólucro formado por lipo e/ou glicoproteínas. O revestimento viral consiste em muitas cópias de um ou poucos tipos de proteínas. Por exemplo, o vírus do mosaico do tabaco – o primeiro vírus a ser identificado; façanha devida a Martinus Beijerinck em 1898 – possui RNA com 6.400

1 O vírus Delta vive no interior do vírus da hepatite B, o qual parasita uma célula eucariótica.

nucleotídeos e sua capa proteica consiste de 2.130 subunidades proteicas idênticas, com 158 aminoácidos cada (STRYER, 1995).

O ciclo de replicação de um vírus em célula eucariótica pode, grosso modo, ser dividido em sete fases:

1ª Fase: o vírus se fixa em um receptor específico localizado na face externa da membrana citoplasmática;

2ª Fase: penetração ativa do vírus na célula. Para essa penetração, são reconhecidos os mecanismos da **injeção** do material genético para o interior da célula hospedeira (mecanismo disseminado entre os bacteriófagos), a **endocitose** – mecanismo celular natural, com o qual a célula capta nutrientes do ambiente extracelular, e que o vírus aproveita como via de entrada – a qual é utilizada por vírus com invólucro (por exemplo, o vírus Epstein-Barr) e sem (por exemplo, papiloma-vírus humano), e a **fusão**, por meio da qual o vírus com invólucro se fixa à face externa da membrana citoplasmática, ocorrendo, em seguida, a fusão entre o invólucro viral e a membrana celular. O invólucro fica retido na superfície da membrana citoplasmática e o capsídeo viral penetra no citoplasma;

3ª Fase: o vírus perde total ou parcialmente o capsídeo, ficando o ácido nucleico livre no citoplasma;

4ª Fase: deslocamento do ácido nucleico para o núcleo (eucariotos) ou para a região de replicação (procarioto) ancorado nas proteínas do citoesqueleto (microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários);

5ª Fase: o genoma viral passa a ser transcrito em novas moléculas de ácido nucleico (DNA e/ou RNA) e traduzido em proteínas. Esses componentes se aglutinarão para formar novos vírions. Há casos, como no retrovírus, em que o vírus introduz, no hospedeiro, enzimas que não possui, como, por exemplo, a transcriptase reversa;

6ª Fase: os diversos componentes virais recém-sintetizados se aglutinam no citoplasma – em decorrência de afinidades físico-químicas e estruturais – originando vírions completos;

7ª Fase: escape dos vírions da célula hospedeira. Os vírions alcançam a face interna da membrana

citoplasmática, ancorando-se no citoesqueleto. A maneira como os vírions escapam da célula depende deles possuírem ou não invólucro (AGUT, 2008). Os vírions sem invólucro permanecem aglutinados no interior do citoplasma, saindo após a lise da célula. No caso dos vírions com invólucro, a saída se dá por exocitose ou, simplesmente, por meio da ligação do capsídeo com a face interna da membrana celular, a qual se evagina, liberando os vírions. Ressalta-se que, nesse caso, o invólucro do vírus é constituído pela membrana citoplasmática da célula hospedeira. Na exocitose o vírus com capsídeo é envolto por uma estrutura membranosa intracitoplasmática, formando um vacúolo, que, após fusão com a face interna da membrana citoplasmática, é expulso para o meio extracelular.

Entre os vírus conhecidos, há aqueles formados por DNA unifilar (Fago QX174, por exemplo), DNA bifilar (por exemplo, Fago T4 e Poxvírus de vacínia), RNA unifilar (por exemplo, Vírus da gripe e Vírus do mosaico do tabaco) ou RNA bifilar (por exemplo, Reovírus). Além disso, o número de genes nos diferentes vírus varia de quatro (por exemplo, o fago Q β) a 240 genes (por exemplo, poxvírus de vacínia) (STRYER, 1995).

De acordo com Raoult (2008), os vírus de DNA são agrupados em três famílias, a saber, a do Mimivírus, a do Asfarvírus e a dos Poxvírus, Baculovírus, Iridovírus e Phycodnavirus.

A título de exemplo, apresenta-se, a seguir, a descrição sucinta do Fago T4 (um vírus de DNA bifilar, constituído por cerca de 150 genes), baseada na caracterização detalhada feita por Stryer (1995): O vírion T4 consiste em uma cabeça, uma cauda e seis fibras da cauda. A molécula de DNA está compactada dentro de uma capa icosaédrica de proteína para formar a cabeça do vírus. A cauda é feita de dois tubos ocos coaxiais ligados à cabeça por um pescoço curto. Na cauda, uma bainha contrátil rodeia um cerne pelo qual o DNA é injetado na bactéria. A cauda termina em uma placa que tem seis pontas curtas e dá seis filamentos longos e finos. As pontas das fibras da cauda se ligam a um ponto específico da parede externa da bactéria (por exemplo, *E. coli*). Uma contração da bainha da cauda, movida a ATP, puxa a cabeça do fago contra a placa e fibras da cauda, o que causa a penetração do DNA na parede celular, seguindo-se de sua travessia pela membrana citoplasmática. Após alguns minutos da penetração, toda a maquinaria bioquímica natural

da bactéria é desativada e o DNA infectante passa a atuar na multiplicação do vírus, usando o arcabouço estrutural do hospedeiro. Uma parte dos genes desse DNA é transcrita e traduzida antes da sua replicação (por exemplo, a formação da desoxirribonuclease) e os demais genes durante e/ou após a replicação (por exemplo, as proteínas do capsídeo e a lisozima). Lembra-se que a desoxirribonuclease hidrolisa o DNA da bactéria, mas deixa intacto o DNA viral. Isso se deve ao fato de que o DNA viral possui a 5-hidroximetilcitosina (HMC), em vez da citosina, além de algumas HMC glicosiladas. Nesse ponto, um parêntesis faz-se necessário. A bactéria possui como sistema de defesa um grupo de enzimas chamadas **endonucleases de restrição**, que têm a incumbência de clivar DNA estranho, como o do fago T4, e assim proteger a célula da invasão. A célula hospedeira possui uma metilase, que introduz uma metila na base nitrogenada de sequências palindrômicas de seu DNA, fazendo com que as endonucleases de restrição não o degradem. Ou seja, a metilase e a endonuclease reconhecem a mesma sequência de bases nitrogenadas. Acontece que uma parcela das moléculas do DNA invasor replicado captura as metilas antes de serem atacadas pelas endonucleases do hospedeiro, fazendo com que sobreviva e possa gerar novas cópias do vírus. Isto se deve ao fato de que o fago, tão logo penetra na célula hospedeira, não replica seu DNA, mas, primeiro, alguns de seus genes são transcritos e traduzidos em um grupo de enzimas específicas (pirofosfatase, hidroximetilase e cinase), as quais atuam sequencialmente. Assim a pirofosfatase hidrolisa dCTP e dCDP a dCMP – evita a possível incorporação de dCTP no DNA viral – a hidroximetilase converte o dCMP em HMC, o qual é finalmente fosforilado pela cinase. Na montagem do fago T4 a cabeça, a cauda e as fibras da cauda são formadas de modo independente, sendo a cauda e a cabeça formadas em primeiro lugar. O DNA do fago se replica várias vezes, gerando vários genomas. Tão logo um genoma completo é inserido em uma cabeça pré-formada, ele é separado dos demais.

Os vírus com DNA recrutam muitas proteínas do hospedeiro na replicação e expressão de seus genomas. No caso dos vírus com RNA, surge um problema especial, porque as células hospedeiras não infectadas não têm as enzimas para a síntese de RNA de acordo com as instruções de um molde de RNA. Consequentemente, os vírus com RNA devem conter informação genética para a síntese de uma RNA polimerase dirigida por RNA – chamada RNA replicase ou RNA sintase – ou para uma DNA polimerase dirigida por RNA, a chamada transcriptase reversa.

Os vírus de RNA – em razão das etapas que levam à síntese dos RNA mensageiros – são classificados em quatro classes (STRYER, 1995):

Classe 1 – São os fagos que contém RNA fita simples de polaridade positiva – (+)RNA unifilar. Esse (+)RNA serve tanto como mensageiro para a síntese de proteínas quanto como molde para a síntese do (–)RNA, do qual se formarão várias moléculas de (+)RNA, as quais serão introduzidas nos novos vírions. Pertencem a essa classe vírus como o poliovírus, rinovírus (causador do resfriado comum), Q β , entre outros. Lembre-se que todos os vírus dessa classe têm alta taxa de mutação. Por exemplo, o poliovírus consiste de molécula de (+)RNA unifilar de 7,5 kb envolvida por um capsídeo icosaédrico. Ao entrar no hospedeiro, a molécula de RNA é traduzida nos ribossomos em proteínas do capsídeo e na RNA replicase. A RNA replicase toma o (+)RNA como molde, produzindo uma cópia de RNA complementar – o (–)RNA – do qual se formarão várias moléculas de (+)RNA, que poderão servir de mensageiras para a síntese de mais proteínas ou serem encapsuladas, originando novos vírions.

Classe 2 – São vírus formados por RNA fita simples de polaridade negativa – (–)RNA unifilar –, que não atua como mensageiro para a síntese de proteínas virais. Alguns exemplos de vírus pertencentes a essa classe são o vírus da raiva, o vírus da estomatite vesicular do gado (VSV) e o vírus da gripe. A primeira etapa em sua expressão é a síntese de (+)RNA_m. Como as células sãs não possuem uma RNA replicase, esses vírus devem portar essa enzima em seus vírions e liberá-la na célula infectada. É interessante destacar que o VSV é envolvido por uma dupla camada de lipídeos, que é obtida da membrana citoplasmática do hospedeiro, porque usa as vias endocíticas e exocíticas para entrar e sair das células epiteliais. Ressalta-se que as proteínas necessárias para o ciclo vital desse vírus são traduzidas a partir de (+)RNAs mensageiros diferentes. Ou seja, o vírus necessita de cinco tipos de proteínas, as quais são traduzidas a partir de cinco moléculas distintas de (+)RNA_m. Finalmente, o (+)RNA serve de molde para formar o (–)RNA, o qual, após ser recoberto pela proteína da capa, dá origem a novos vírus.

O vírus da gripe, por sua vez, é formado por (–)RNA envolvido por uma membrana. Seus dez genes estão situados em oito segmentos separados do RNA unifilamentar, variando em tamanho de 890 a 2.341 nucleotídeos. A membrana envoltória desse vírus, de 1.000 Å de diâmetro, contém muitas cópias de três proteínas: **HA** (hemaglutinina), **NA** (neuraminidase) e **M** (proteína da membrana). A molécula de hemaglutinina capacita o vírus a penetrar em células susceptíveis, como as que revestem as vias respiratórias. A hemaglutinina tem afinidade pelas moléculas de ácidos siálicos na superfície dessas células, possibilitando que o vírus se ligue às células e penetre por endocitose mediada por receptor. A neuraminidase cliva os ácidos siálicos terminais, o que pode ajudar a impedir que o vírus fique preso nas secreções mucosas, que são ricas em ácido siálico.

Quando o vírus recém-formado deixa a célula hospedeira é que a HA de 62 kD é clivada em duas cadeias (HA₁ e HA₂), que são mantidas juntas por uma ligação dissulfeto e numerosas interações não covalentes. Cada uma dessas partes tem uma função particular. A fração HA₁ serve de ponto de ligação do ácido siálico, enquanto a fração HA₂ é responsável pela fusão da membrana envoltória do vírus com a membrana. Os anticorpos formados contra a hemaglutinina efetivamente bloqueiam a infecção pelo vírus. Contudo, o caráter segmentado do genoma viral aumenta muito o repertório viral de membranas, diminuindo, por conseguinte, a eficácia da defesa imunológica corpórea.

Um aspecto a ser considerado, quando se trata do vírus da gripe, é a alta virulência apresentada por aqueles que transitam entre os humanos e os animais (aves domésticas e aquáticas – os patos servem de reserva natural do vírus da gripe – suínos, cavalos, entre outros). São esses tipos de vírus que, de tempos em tempos, causam grandes pandemias, sendo a mais letal aquela ocorrida na segunda década do século passado (1918/1919). Como descrito, a estrutura do genoma e o ciclo de vida desse vírus permitem-lhe evoluir e trocar de genes com facilidade, porque seu material genético está distribuído por oito segmentos separados de RNA. Para se reproduzir, o vírus entra em uma célula viva, em que comanda o maquinário celular e o induz a produzir novas proteínas virais e cópias adicionais de seu RNA. Esses pedaços, então, se reúnem em novos vírus que escapam da célula hospedeira, partindo para infectar novas

células. Nenhum mecanismo de prova assegura que as cópias de RNA sejam perfeitas, então as mutações são comuns. Além disso, se dois tipos diferentes de influenza infectam uma mesma célula, seus segmentos de RNA podem se misturar livremente, produzindo um vírus que contém uma combinação de genes dos dois vírus originais. Esse “reagrupamento” é um importante mecanismo de geração de novas ondas de gripe.

Diferentes vírus de influenza são identificados por dois tipos de assinatura das proteínas em sua superfície. Uma é a HA, que tem, pelo menos, 15 variantes conhecidas. A outra é a NA, que tem 9. A exposição a essas proteínas produz anticorpos distintos no hospedeiro. A onda de 1918/1919 foi a primeira a ser nomeada – **H₁N₁** – com base nos anticorpos encontrados no sangue dos sobreviventes da pandemia. Descendentes menos virulentos do **H₁N₁** foram as cepas predominantes em circulação até 1957, quando o **H₂N₂** emergiu, causando nova pandemia (a gripe asiática). Desde 1968, o subtipo **H₃N₂**, que provocou a pandemia daquele ano (gripe de Hong Kong), tem predominado (TAUBENBERGER et al., 2005).

Os subtipos HA e NA de proteínas são mais do que apenas identificadores; sendo essenciais para a reprodução viral, tornam-se alvos primários do sistema imunológico do hospedeiro. A molécula de HA inicia a infecção ao se ligar aos receptores na superfície de certas células hospedeiras, principalmente as de revestimento respiratório em mamíferos e de revestimento intestinal em aves. A proteína NA permite que novas cópias do vírus escapem da célula hospedeira para que possam infectar novas células. Depois da primeira exposição do hospedeiro a um subtipo HA, anticorpos bloqueiam a ligação com o receptor, no qual o vírus se liga à célula, evitando a reinfeção com a mesma cepa. No entanto, periodicamente surgem vírus da gripe com subtipos HA novos para humanos, principalmente em virtude de reagrupamentos com uma larga gama de vírus influenza que infectam aves selvagens.

Normalmente, HAs adaptados a aves se ligam de maneira precária aos receptores na superfície celular, que prevalecem no trato respiratório humano. Portanto, o sistema de penetração dos vírus HA de aves se modifica, de alguma maneira, para que o vírus possa se replicar e se espalhar eficientemente em humanos. Até pouco tempo atrás, imaginava-se que um vírus de gripe aviária não poderia afetar diretamente os humanos, mas

18 pessoas foram infectadas com o H_5N_1 de aves, em Hong Kong, em 1997 (“gripe avícola”) e seis morreram. Epidemias de uma versão ainda mais patológica dessa linhagem se espalharam pelas aves da Ásia em 2003 e 2004, e mais de 30 pessoas infectadas morreram no Vietnã e na Tailândia (TAUBENBERGER et al., 2005).

Essa última doença foi chamada Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, em inglês) e o agente etiológico foi identificado como **Sars-CoV cepa Urbani**, um coronavírus (diâmetro entre 60 e 130 Å). Ressalta-se que os coronavírus, em geral, só causam infecções nas vias aéreas superiores (resfriado comum), ao contrário do Sars-CoV, que afeta profundamente o sistema respiratório (LEMES, 2003).

A virulência da influenza, assim que infecta um hospedeiro, é determinada por uma série complexa de fatores, incluindo a facilidade com que o vírus penetra em diferentes tecidos, o quão rápido se replica e a violência da resposta imunológica ao intruso. A gripe foi descrita, pela primeira vez, por Hipócrates em 412 a.C., e os vírus passaram os séculos seguintes sofrendo mudanças, realizando permutas e provocando devastações (WEBSTER; WALKER, 2003).

A humanidade procura formas de eliminar essa ameaça desde a primeira pandemia de que se tem notícia, em 1580. Exatamente como e quando o vírus da gripe vai adquirir uma forma extremamente patogênica é algo que está além da atual capacidade de previsão. Conhece-se a estrutura do vírus, sabe-se como entra nas células do corpo humano e como escapa à vigilância do sistema imunológico do hospedeiro, mas isso não basta para impedir outra pandemia. As questões ultrapassam o campo da ciência, invadindo os domínios da política internacional e local, orçamentos nacionais e tradições culturais profundamente arraigadas (WEBSTER; WALKER, 2003). A gripe é transmitida de uma pessoa a outra por meio da tosse e de espirros, mas o vírus não começa sua viagem a partir de um hospedeiro humano. Ele se perpetua em aves aquáticas selvagens, as causadoras das pandemias entre os homens. Embora essas aves transportem os genes da gripe nos intestinos, em geral o vírus não as faz adoecer. E como conseguem migrar milhares de quilômetros, aves sadias podem disseminar o vírus por todo o globo, antes mesmo que o vírion entre em contato com a população humana.

A forma do vírus encontrada nas aves selvagens não se reproduz bem nos seres humanos e, por isso, primeiro tem de se mudar para um hospedeiro intermediário – em geral, aves domésticas ou suínos – que tomam água contaminada pelas fezes das aves aquáticas. Cavalos, baleias e focas, entre outros animais, são periodicamente infectados pelo vírus da gripe.

Embora os hospedeiros intermediários possam adoecer e morrer da infecção, os suínos podem viver durante tempo suficiente para servir de “misturadores” para os genes das formas avícola, suína e humana do vírus da gripe. Isso acontece porque os suínos têm receptores tanto para os vírus de aves quanto para os vírus humanos. Os suínos, provavelmente, desempenharam um papel importante na história das doenças humanas. Esses animais parecem servir de laboratório vivo nos lugares em que os vírus avícolas e mamíferos da gripe têm condições de se unir e trocar seus genes – uma recombinação de segmentos de RNA –, criando novas variedades do vírus da gripe (WEBSTER; WALKER, 2003).

Para finalizar, recorde-se que os vírus da gripe são membros da família *Orthomyxoviridae* e fazem parte de algum gênero entre quatro: A, B, C e *thogotovirus* (WEBSTER; WALKER, 2003). O vírus de gripe tipo C não parece causar uma doença grave. O tipo B costuma provocar epidemias regionais em humanos. O vírus do tipo A tem variedades avícolas e são esses os vírus causadores de pandemias em humanos.

Classe 3 – São vírus formados por (\pm)RNA bifilamentar e que parasitam células de mamíferos. O cerne do vírion contém dez moléculas de (\pm)RNA bifilamentar diferentes, que estão associados a proteínas. Ao penetrar no hospedeiro, o vírion perde sua concha icosaédrica externa, que é composta por três tipos de proteínas. A remoção dessa concha ativa uma RNA polimerase preexistente no interior do vírion. Uma vez concluída a tradução, os (+)RNA unifilamentares se associam a proteínas específicas e, a seguir, a RNA polimerase gera a correspondente fita (–)RNA, e, assim, o duplex é formado e o vírus pode sair do hospedeiro.

Classe 4 – São vírus de (+)RNA, mas que, durante seu ciclo vital, são capazes de induzir na célula hospedeira a formação de um DNA dupla-hélice intermediário. Por essa razão, são chamados

retrovírus. Um exemplo é o vírus do sarcoma de Rous, que afeta as aves. Os retrovírus são os únicos vírus com RNA que podem causar câncer. Por isso, são chamados vírus **oncogênicos**. Os retrovírus possuem uma transcriptase reversa, que sintetiza um DNA de dupla hélice a partir de um (+)RNA. Nem todos os retrovírus induzem ao câncer. O vírus da imunodeficiência humana, por exemplo, causa a AIDS. O ciclo vital de um retrovírus típico começa quando vírions infectantes se ligam a receptores específicos na superfície do hospedeiro e entram na célula. O (+)RNA viral é desenovelado no citossol. A transcriptase reversa trazida pela partícula viral sintetiza, então, os filamentos (-) e (+) do DNA e digere o RNA(+) viral. Portanto, a transcriptase reversa efetua três tipos de reações, a saber: síntese de DNA dirigida por RNA, hidrólise do RNA e síntese de DNA dirigida por DNA. A transcriptase reversa sintetiza o DNA no sentido 5' → 3', usando como primer um tRNA do hospedeiro. O duplex de DNA viral recém-formado torna-se circular e penetra no núcleo.

A transcrição do DNA retroviral ocorre apenas após ter se integrado ao DNA da célula hospedeira. Essa união é catalisada pela integrase, enzima inexistente na célula hospedeira, mas introduzida em seu interior pelo vírus infectante (RAOULT, 2008). Portanto, a integração é uma etapa obrigatória no ciclo vital do retrovírus.

Na maioria das vezes, os retrovírus não matam seus hospedeiros. Seu DNA fica no genoma da célula infectada e continua a se expressar. Além disso, o DNA viral se replica junto com o DNA do hospedeiro, e assim o genoma viral é herdado pelas células-filhas. Os genes produtores de câncer são chamados oncogenes – lembra-se que na terminologia oncológica usam-se os termos **Sarcoma** e **Carcinoma** para indicar, respectivamente, que o tumor maligno se origina do mesoderma e do ectoderma/endoderma.

Os oncogenes retrovirais são muito parecidos com os genes celulares normais. Eles podem ser classificados nas seguintes classes: a) tirosina cinases dependentes, os quais participam na transmissão dos sinais controladores do crescimento; b) os produtores de substâncias que funcionam como fatores de crescimento; c) os codificadores de receptores para fatores de crescimento; d) os codificadores de proteínas RAS; e) os produtores de proteínas nucleares.

Os retrovírus transformam células susceptíveis, produzindo quantidades excessivas de certas proteínas importantes no controle do crescimento, ou formando proteínas alteradas que não possam ser mais controladas. A análise dos oncogenes revelou que muitos deles codificam proteínas com papéis importantes no controle do crescimento e desenvolvimento normais. Mostrou, também, que mutação, duplicação ou translocação de genes celulares normais, envolvidos no controle do crescimento, podem levar ao câncer.

O vírus ao penetrar na célula hospedeira, se não for devidamente neutralizado pelo sistema de defesa do organismo, se apodera da maquinaria de reprodução e de biossíntese de proteínas, visando exclusivamente à manutenção de seu ciclo vital. Muitas vezes, componentes do capsídeo viral – por exemplo, algum constituinte proteico *per se* ou combinado com lipídeo (lipoproteína) ou com açúcares (glicoproteínas) – exercem efeitos tóxicos diretos sobre as células hospedeiras e, por extensão, ao organismo todo. Ao ser inserido dentro da célula, além de tomar o controle de suas vias metabólicas, o vírus passa a ter o poder de vida ou morte sobre ela, por meio da ativação de genes controladores da necrose e/ou de apoptose (morte celular programada), os quais, embora constituintes naturais do genoma celular devem permanecer silenciados durante toda a vida produtiva da célula.

Uma vez infectada por vírus, a célula hospedeira tem uma sobrevida, muito reduzida, exceto nos casos de expressão incompleta do genoma viral, da qual resultam funções metabólicas e estruturais anômalas. Em consequência, a célula infectada pode adquirir características típicas de célula cancerosa, por exemplo, imortalidade, angiogênese intensa e proliferação descontrolada. Contudo, há casos em que as modificações sofridas pela célula hospedeira são modestas, como a redução da capacidade de produzir um dado hormônio ou enzima. Dependendo da intensidade da redução, o organismo poderá ser mais ou menos intensamente afetado.

Em humanos, o vírus penetra no corpo através das mucosas (digestiva, respiratória, ocular e/ou genital) ou de cortes na pele. Os sintomas clínicos, muitas vezes, não são aparentes no início da infecção viral, passando a sê-lo, após um ou mais órgãos serem infectados pelos invasores. Por exemplo, o vírus da poliomielite se multiplica intensamente no sistema digestivo, alcançando, via circulação sanguínea, os neurônios da medula espinhal, que são destruídos e, em consequência, a paralisia se instala no organismo hospedeiro (MARÉCHAL, 2008).

Ressalta-se, também, que o dano sofrido pelo órgão, grosso modo, resulta da combinação dos ataques viral e do sistema imune da vítima. Esta última resposta reflete a tentativa do organismo em evitar a produção e a propagação do vírus.

A resposta imune consiste em um ataque inicial ao agente invasor – comandada por uma série de componentes químicos e celulares constantemente presentes no organismo; a chamada resposta inata – seguida da resposta adaptativa, que envolve a participação de vários tipos celulares, como os linfócitos B (produtores dos anticorpos), linfócitos T citotóxicos (eliminação completa das células doentes) e as células de memória (que só entram em ação, se o vírus voltar a invadir o organismo). A geração de células de memória, sem que o corpo tenha sido vítima de infecção viral, é a estratégia da vacinação, um procedimento preventivo para proteger a saúde de milhares (ou milhões) de pessoas.

De um modo geral, a infecção viral pode ser do tipo não persistente ou do tipo persistente. No caso de não ser persistente, de duas, uma: ou o organismo morre – órgãos vitais são irremediavelmente afetados, sendo alguns casos as encefalites, pneumonia e hepatite – ou a infecção é debelada, resultando em imunidade mais ou menos perene.

No tipo persistente, por sua vez, o organismo não consegue eliminar o vírus por completo, resultando em certo equilíbrio entre o corpo da vítima e o agente invasor. Nesse caso, a infecção persiste sob a forma latente ou crônica. Na forma crônica, os vírus continuam se multiplicando, muito além da fase aguda da infecção, sendo casos notórios as infecções provocadas pelo vírus HIV, vírus da hepatite C (observado em 80% dos pacientes infectados) e vírus da hepatite B (observado em 5% a 10% dos pacientes) (MARÉCHAL, 2008). Na forma latente, quando a disseminação do vírus é bloqueada pelo sistema imune ou ele se esconde em locais do corpo de difícil acesso aos agentes imunológicos (sistema nervoso central e/ou periférico), sua patogenicidade é muito reduzida. Mas pode ser reativada, quando o sistema imune da pessoa é reprimido (por exemplo, carência alimentar, infecções microbianas, quimioterapia, radioterapia etc.) ou no caso em que o organismo é submetido a estímulos nocivos diversos (poluição ambiental, fumo, drogas, estresse etc.).

O vírus pode escapar ao sistema imune e/ou resistir à ação dos fármacos antivirais, por meio da formação de formas mutantes, graças às falhas dos mecanismos catalíticos das enzimas replicadoras, sendo as relacionadas com a transcriptase reversa as mais notórias.

Alguns exemplos de vírus responsáveis por infecções persistentes, segundo Maréchal (2008) são:

Vírus do herpes – Há dois tipos: *Herpes simplex* de tipo 1 (HSV-1) e de tipo 2 (HSV-2), que apresentam tropismo orolabial e genital, respectivamente. Ambos se multiplicam inicialmente nas células epiteliais do hospedeiro e, depois, sobem ao longo dos axônios das células nervosas sensitivas, alcançando os gânglios trigêmeo (HSV-1) e sacro (HSV-2). O HSV-1, normalmente, não gera grandes problemas à vítima, a não ser o transtorno das vesículas em torno dos lábios. No entanto, há situações mais graves, como o herpes ocular, encefalite herpética, que requerem o uso de antiviral (por exemplo, o aciclovir, que age sobre a replicação do genoma viral). Quanto ao HSV-2, tirando o incômodo da sua recorrência, quando infecta recém-nascidos, esse vírus se torna muito perigoso. A reativação desses vírus decorre de efeitos do tipo: exposição ao sol, estresse mecânico (intervenção odontológica), fadiga e irritações cutâneas.

Vírus da varicela e vírus do herpes zoster – Instala-se nos neurônios sensitivos.

Vírus Epstein-Barr (EBV) – É transmitido pela saliva e é encontrado em cerca de 95% da população humana adulta. Instalam-se nos linfócitos B de memória e, de tempos em tempos, as células infectadas passam a produzir vírions, que vão parar na saliva, sendo passados a um novo hospedeiro. Porém, em indivíduos com o sistema imune abalado (pacientes transplantados, por exemplo), o EBV pode catalisar a formação de linfomas ou câncer nas células epiteliais da rinofaringe.

Vírus da imunodeficiência humana (HIV) – Multiplica-se nas células que expressam o receptor CD4, como os linfócitos CD4+, podendo, inclusive, se multiplicar ou ser transportado pelo organismo por outras células, como os monócitos, os macrófagos ou as células dendríticas. O desenvolvimento de uma vacina contra o HIV é dificultada pela intensidade de mutações sofridas pelo vírus. Estas, provêm da ação de enzimas como a transcriptase reversa. A existência de inúmeros mutantes permite ao HIV contornar a resposta imune humoral (anticorpos) e celular (linfócitos T). Acrescenta-se a destruição progressiva dos linfócitos CD4+ e CD8+, que organizam normalmente a resposta imunológica

contra patógenos. Isso significa que, quanto mais a infecção progride, menos o sistema imunológico consegue controlar a multiplicação do vírus. Por conseguinte, o organismo acaba ficando à mercê de infecções oportunistas. Os fármacos atualmente disponíveis não combatem a forma latente do HIV, mas alguns pontos de seu ciclo de vida, como o bloqueio da entrada na célula (inibidores de fusão), a inibição de proteases, da integração e da retrotranscrição.

Vírus da hepatite B (VHB) – Instala-se nos hepatócitos, causando, quando reativados, a cirrose e o hepatocarcinoma.

Vírus da hepatite C (VHC) – É transmitido pelo sangue. Produz proteínas que inibem a ação dos interferons. Além disso, as células CD4+ e CD8+ têm seu período de ação encurtado. Em decorrência dos erros catalíticos da ação de várias de suas enzimas, resultam formas variantes, que, como no caso do HIV, impedem a produção de uma vacina eficaz, além de limitar o efeito terapêutico de antivirais. O melhor combate terapêutico disponível é a combinação do antiviral ribavirina com o interferon alfa.

Vírus do sarampo e Vírus da rubéola – São vírus que, aparentemente, se instalam no sistema nervoso central, causando panencefalite.

Papiloma-vírus (HPV) – Instala-se nas células epiteliais das mucosas genitais, cutâneas ou da laringe. Transmite-se por via sexual, sendo os tipos HPV-16 e o HPV-18 responsáveis pelo câncer do colo do útero. Essa enfermidade pode ser evitada por meio da realização anual do teste chamado “esfregaço de papanicolau”. Quando a atenção da mulher, frente ao problema, esmorece, podem surgir patologias de baixo risco (panencefalite progressiva, verrugas e proliferações não tumorais) ou de alto risco (câncer do colo uterino, cânceres cutâneos ou da orofaringe).

Em contraposição aos malefícios causados pelos vírus, atualmente, estão sendo desenvolvidas terapias, baseadas no emprego dos próprios vírus como vetores de moléculas terapêuticas ou como “princípios ativos *per se*”.

Os vetores virais são muito usados na chamada “terapia gênica”. Essa terapia consiste basicamente na introdução

de uma informação genética particular nas células de uma pessoa vitimada por um mal hereditário. No momento, as doenças hereditárias decorrentes do defeito de um único gene (mucoviscidose, hemofilia, miopatia de Duchenne e talassemia, por exemplo), constituem-se nos alvos principais dos vetores virais. Há três tipos de vetores virais, a saber, adenovírus, vírus adeno-associado e retrovírus (PAGÈS; PIVER, 2008). O **adenovírus** é um vírus de DNA dupla-fita não recoberto², no qual os genes estruturais são substituídos em parte ou na totalidade pelo transgene (DNA de um *locus* genômico completo, incluído o promotor) ou micro-RNA. O **vírus adeno-associado** é um vírus de DNA simples de aproximadamente 4,7 quilobases – possui nas duas extremidades as repetições terminais invertidas e, entre elas, as séries de genes para replicação e para a formação das proteínas do capsídeo. Entretanto, para se propagar, esse vírus necessita estar associado ao adenovírus, daí a sua denominação – no qual a sequência de genes entre as RTI é substituída pelo transgene. O **retrovírus** é um vírus recoberto, que possui genes específicos para ativar a expressão (devem ser obrigatoriamente inativados para que o vetor possa ser usado com mais segurança), RTI, gene sinalizador da encapsidação e os genes codificadores de proteínas catalisadoras e estruturais. No retrovírus, os genes codificadores de proteínas são substituídos pelo transgene e seu promotor. De modo geral, qualquer um dos vetores citados seria um vírus desprovido da capacidade de replicação e de liberação de novos vírions. O sucesso da terapia gênica repousa, essencialmente, em se dispor de vetores capazes de acomodar moléculas terapêuticas de alta massa molar, de apresentar tropismo específico (ou seja, o vetor deve alcançar um tecido particular, em cujas células deve liberar as moléculas terapêuticas)³ e de não estimular a resposta imune do paciente (a qual destruiria as células do tecido receptoras da molécula terapêutica).

Como “princípios ativos *per se*”, os vírus poderiam ser usados como “antibióticos” – na chamada fagoterapia – e

2 Um vírus de DNA dupla-fita não recoberto é um vírus cujo genoma possui uma sequência de bases nitrogenadas, em ambas as extremidades (que formam as “repetições terminais invertidas – RTI”; promotores essenciais para a replicação do genoma e sua encapsidação), genes estruturais e o gene para formar as proteínas do capsídeo.

3 Apesar de o tropismo viral limitado ser raro na natureza, sabe-se que, em cada família de vírus, existem muitas variantes (conhecidas por sorotipos), as quais podem apresentar tropismos diferenciados. Por exemplo, os sorotipos 4 e 8 da família dos vírus adeno-associados têm preferência, respectivamente, pelo sistema nervoso central e fígado (PAGÈS; PIVER, 2008).

como agentes anticancerígenos (na chamada viroterapia oncológica).

A fagoterapia corresponde ao emprego dos fagos no combate às infecções causadas por bactérias. Os fagos são vírus que infectam exclusivamente bactérias, por isso, também são conhecidos por bacteriófagos. A fagoterapia é um procedimento terapêutico que foi dividido por D'Hérelle em meados do século XX (DEBARBIEUX, 2008). Os bacteriófagos, que são encontrados em seres constituintes dos três grandes domínios da vida (archaea, bactérias e eucariotos), apresentam formas e ciclos vitais variados. Porém, podem ser divididos em dois grandes grupos, a saber, líticos (que destroem as bactérias hospedeiras) e lisogênicos (que, de início, não destroem a bactéria hospedeira, mas misturam seu material genético com o dela).

Todos os bacteriófagos dividem as mesmas etapas precoces do ciclo infeccioso: o reconhecimento e a adsorção sobre a bactéria-alvo e, depois, a injeção do material genético no citoplasma bacteriano. As duas etapas seguintes, a infecção propriamente dita com a multiplicação do bacteriófago em detrimento da célula hospedeira, e a lise bacteriana com a liberação dos novos fagos, são imediatas para os fagos líticos, mas retardadas para os lisogênicos. A latência desses últimos perdura enquanto os genes necessários para a lise estão reprimidos. Além disso, durante essa fase, há troca de material genético entre o fago e a célula hospedeira.

No caso em que o ácido nucleico do fago se insere de forma perene no genoma da bactéria, o vírus recebe a denominação de profago (DEBARBIEUX, 2008).

A latência do bacteriófago pode ser revertida, quando a bactéria recebe, por exemplo, alta carga de radiação ultravioleta ou é submetida à temperatura elevada.

Embora a fagoterapia tenha precedido a antibioticoterapia em cerca de duas décadas, ela perdeu terreno para os antibióticos – substâncias químicas de estruturas conhecidas e que podiam ser sintetizadas em grande quantidade e a baixo custo – pelas seguintes razões: natureza incerta deste “princípio ativo” na época de seu lançamento (limiar do século XX); dificuldade de se preparar suspensões contendo, apenas, um tipo de fago; e inexistência de protocolos reprodutíveis para a produção rentável pelas empresas farmacêuticas. Contudo, os bacteriófagos líticos possuem dois grandes trunfos não negligenciáveis, a saber, infectar apenas as bactérias hospedeiras e se multiplicar no local da infecção, fato que potencializa muito sua ação antibacteriana.

Atualmente – embora o uso da fagoterapia continue inibida pela produção de toxina e pela ativação do sistema imune do paciente – duas vertentes complementares estão sendo usadas, na tentativa de ressuscitá-la. Uma delas seria identificar e purificar as enzimas responsáveis pela lise da bactéria, as quais seriam os princípios ativos de uso real. A outra seria aperfeiçoar os métodos de separação e purificação dos fagos líticos a serem usados em medicamentos. Soma-se a isto, a criação de protocolos rigorosos para validar as prospecções de uso em humanos.

Segundo Debarbieux (2008), empresas de alimentos dos Estados Unidos obtiveram a aprovação, pelo FDA, para usar bacteriófagos antilistéria em gêneros alimentícios para uso humano. Inegavelmente, o futuro da fagoterapia parece estar atrelado ao uso combinado com os antibióticos, nos casos de infecção generalizada, a qual não responde adequadamente aos antibióticos convencionais.

A viroterapia oncológica – cujo início remonta aos anos 1950, mas que ressuscitou nos anos 1990, na esteira dos desenvolvimentos espetaculares nos campos da imunologia, biologia e genética molecular – baseia-se na identificação ou na concepção de vírus que infectam especificamente as células tumorais (oncotropismo), deixando livres as células sãs (ROBERTS et al., 2006). Os vírus utilizáveis para essa finalidade poderiam ser os “selvagens” – que são naturalmente oncotrópicos – ou tornados oncossetivos por meio de modificações genéticas. O emprego dos vírus “selvagens” explora a fraqueza das células cancerosas, no que tange ao grande número de receptores virais na membrana citoplasmática, à alta concentração intracelular de fatores de transcrição dos promotores para a síntese de proteínas do vírus e às alterações do mecanismo de defesa antiviral. A modificação genética do vírus visa dar-lhe um caráter oncotrópico, inexistente em seu estado natural. As estratégias empregadas são: inserir no genoma viral sequências de nucleotídeos reconhecidos por fatores de transcrição muito ativos nas células tumorais; modificar pelo menos uma proteína constituinte do capsídeo; e, inibir a expressão de genes virais em proteínas, que neutralizam as defesas naturais das células sadias.

De acordo com Rommelaere et al. (2008), os vírus oncológicos podem ter seu genoma acrescido de um gene específico, por exemplo, um que se expressa na proteína apoptina, a qual estimula o suicídio da célula cancerosa (apoptose).

Apesar do grande potencial da viroterapia oncológica, sua aplicação em humanos, ainda, não é feita, sobretudo pelo temor de o vírus oncológico poder causar efeitos

colaterais adversos, tais como recombinar com outros vírus, gerando um vírus variante altamente transmissível entre humanos; persistir no corpo por períodos longos de tempo, podendo gerar uma derivação genética de alta periculosidade; estimular o sistema imune do paciente, bem como chegar a uma distribuição generalizada pelo organismo do paciente.

A validação terapêutica da viroterapia oncológica – a qual compreende três fases, a saber, fase 1, que avalia a tolerância do medicamento pelo corpo, fase 2, que verifica a eficácia, o metabolismo e a administração do tratamento e, fase 3, que consiste em um teste duplo-cego, no qual nem o médico e nem o paciente têm como distinguir entre o fármaco e o placebo – ainda não chegou à fase 3. Em virtude da complexidade fisiológica do corpo humano, torna-se difícil extrapolar os dados pré-clínicos disponíveis até agora. Provavelmente, os vírus oncológicos não erradicariam por completo os tumores em uma monoterapia viral. No entanto, efeitos oncosuppressores encorajadores foram obtidos ao combinarem-se tratamentos convencionais a um componente viral. Esses tratamentos combinatórios são promissores, pois obtêm uma vantagem inegável da seletividade dos vírus oncológicos. Isso permite minimizar os efeitos secundários e contornar os mecanismos de resistência que são, geralmente, desenvolvidos pelas células tumorais contra os agentes anticancerígenos utilizados. Os progressos obtidos na otimização de vírus oncológicos (vírus da doença de Newcastle, vírus do sarampo, adenovírus, reovírus e parvovírus, entre outros) e em suas formas de aplicação – uso de formas farmacêuticas lipossomais – apontam para a disseminação do seu emprego na terapia do câncer em futuro não distante (ROMMELAERE et al., 2008).

Do exposto, pode-se concluir que os vírus constituem uma das formas mais traiçoeiras da natureza. Munidos apenas com seu material genético comprimido no interior de uma cápsula proteica cristalina, esses agentes infecciosos podem viajar com facilidade. Ao atingirem as células, inserem seus genes e apropriam-se dos mecanismos de cópia genética e produção proteica, utilizando-os para se autorreplicar bilhões de vezes. Uma vez formados, os novos vírus podem atravessar a superfície da célula hospedeira, agarrados a bolhas minúsculas de membrana celular, ou, então, continuar a se reproduzir até que a célula finalmente se rompa. Porém, à medida que a virologia progride, o ciclo viral – um mecanismo, muitas vezes, devastador, que atenta contra a vida dos organismos superiores (o homem, mais precisamente) – oferece pontos-alvo para minimizar ou eliminar a capacidade de proliferação dos próprios vírus. Esse combate se dá por meio de três vertentes principais,

a saber: a inibição de enzimas-chave do ciclo – como a transcriptase reversa e as proteases ácidas do HIV ou da DNA-polimerase do HSV –, o vírus atenuado ou modificado, usado como vetor de fármacos, e a identificação de componentes estruturais imunogênicos a serem usados na produção de vacinas.

1.3 TECNOLOGIAS INTEGRANTES DOS PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

1.3.1 Tecnologia de anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são obtidos por meio da técnica de fusão celular, segundo o esquema da Figura 1.1.

Em virtude da alta especificidade, os anticorpos monoclonais são ferramentas importantes na detecção, quantificação e localização de determinadas substâncias presentes no organismo. Basta que tenham a habilidade de desencadear a resposta imune, com a consequente formação do anticorpo correspondente.

Existem várias aplicações para os anticorpos monoclonais (testes de gravidez, medicamentos contra o câncer como o Herceptin®, entre outros), assim como grandes perspectivas de uso na medicina.

O grande emprego na medicina, até o momento, tem sido no combate ao câncer de mama. Essa enfermidade é a doença maligna mais diagnosticada entre as mulheres, mas que deixará de ser fatal em um futuro próximo. A razão deste prognóstico repousa no aprimoramento dos equipamentos para o diagnóstico por imagem (mamografia digital, ultrassom e ressonância nuclear), e no desenvolvimento de novos fármacos, basicamente inibidores enzimáticos⁴ e anticorpos monoclonais. Entre estes últimos, já são comercializados o **Trastuzumab (Herceptin®)** e o **Pertuzumab**, que se ligam ao receptor de superfície HER2 (receptor do fator de crescimento Epitelial 2 Humano), e o **Bevacizumab (Avastin®)**, que bloqueia o receptor

4 Como inibidores enzimáticos, temos o **Anastrozole**, o **Letrozole** e o **Exemestane**, que inibem a aromatase, e o **Lapatinib**, que inibe a tirosina cinase (enzima que catalisa a fosforilação da extremidade citoplasmática dos receptores transmembrana conhecidos por HER2, IGF-1R – receptor de fator de crescimento 1, semelhante à insulina – e EGFR – fator de crescimento epitelial).

VEGF, o qual estimula a angiogênese. Lembra-se que o primeiro fármaco, desenvolvido em 1977, para combater o câncer de mama foi o **tamoxifeno**, uma molécula que compete com o estrogênio por uma proteína transportadora intracitoplasmática, que ao se ligar ao DNA, o estimula a se expressar em proteínas reguladoras da sobrevivência e crescimento da célula (ESTEVA; HORTOBAGYI, 2008; MOULDER; HORTOBAGYI, 2008).

1.3.2 Tecnologia de bioprocessamento

Nessa tecnologia, células vivas ou componentes de sua maquinaria metabólica (por exemplo, enzimas e organelas) são utilizadas para sintetizar produtos, degradar substâncias e/ou produzir energia. As células mais empregadas são as de micro-organismos unicelulares, como bactérias e leveduras, ou células de mamíferos (SCHMIDELL et al., 2001). Podem ser identificadas três vertentes nessa tecnologia, a saber: a fermentação microbiana, o cultivo de células de mamíferos e a biodegradação (uso de micro-organismos para combater a poluição ambiental – biorremediação – ou de plantas na descontaminação das águas de resíduos industriais, fitorremediação).

A partir da década de 1990, a produção em larga escala de proteínas humanas (anticorpos monoclonais e eritropoietina, entre outras) tornou-se o alvo central do complexo biotecnológico-farmacêutico.

Para tanto, vem sendo desenvolvida uma via alternativa de produção, baseada no uso de animais transgênicos de grande porte, os chamados “zooreatores”. São animais gerados após submissão às técnicas de engenharia genética, tais como, injeção do DNA codificador da proteína desejada em um embrião unicelular do animal (Figura 1.7) – procedimento empregado, por exemplo, na produção da α -1-antitripsina e antitrombina humanas – ou por meio da transferência nuclear de células somáticas – a clonagem propriamente dita – a qual permitiu a obtenção da ovelha “Dolly”, há alguns anos. A ideia é obter fêmeas transgênicas de mamíferos, de cujo leite a proteína desejada seria extraída e purificada. Nessa linha, em breve surgirá no mercado um produto – cujo nome de fantasia será ATRYN[®], fabricado pela GTC Biopharmaceuticals, sediada nos Estados Unidos – contendo a antitrombina humana, extraída do leite de cabras transgênicas (STIX, 2005). A antitrombina é uma proteína presente no sangue com atividade anticoagulante e anti-inflamatória, a qual pode ser usada no tratamento de portadores de uma doença hereditária, conhecida como deficiência hereditária de antitrombina, que torna seus portadores altamente susceptíveis à trombose (formação de coágulos sanguíneos).

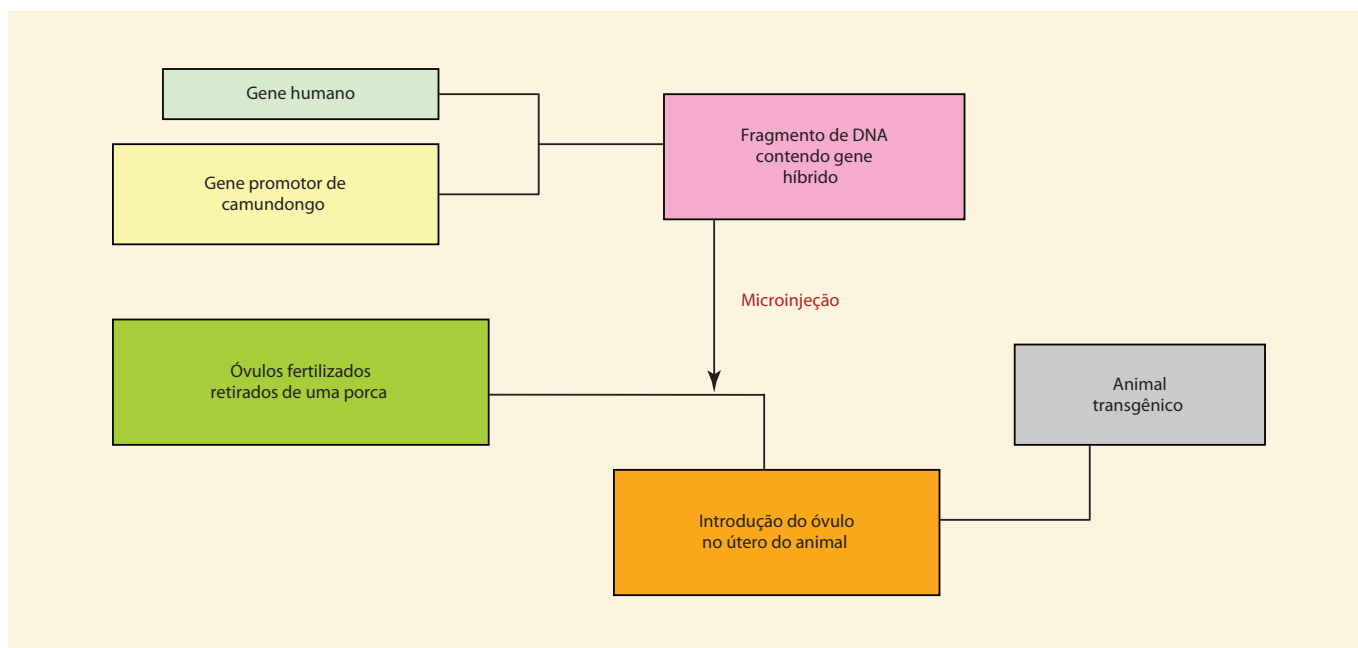


Figura 1.7 Esquema de obtenção de animal transgênico. O gene híbrido, formado pelo gene codificador da proteína láctea humana e pelo gene promotor da expressão desse gene, oriundo do camundongo, é injetado, com o uso de uma microagulha, no interior do pronúcleo masculino do óvulo fertilizado de porca. Este, por sua vez, é inserido no útero da porca (doadora ou de aluguel), resultando em um animal transgênico, cujo leite será rico em proteína láctea humana.

Ao lado do ATRYN, o bioprocessamento por “zooreatores”, permitirá a obtenção dos mais variados tipos de proteínas, como, por exemplo, a proteína constituinte das teias de aranha⁵, o fator IX (proteína envolvida no processo de coagulação do sangue, cuja falta causa a hemofilia) e o fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) (proteína usada para estimular a produção de glóbulos brancos e recrutar células-tronco da medula óssea, em pacientes com o sistema imune debilitado) (PESQUERO et al., 2007).

A introdução de zooreatores no complexo biotecnológico-farmacêutico é estimulada pela grande perspectiva comercial. Segundo Stix (2005), o custo de um laboratório de fabricação de fármacos a partir de células de hamster – muito usadas atualmente na produção de anticorpos monoclonais – pode chegar a US\$ 400 ou 500 milhões, enquanto um rebanho de cabras é capaz de produzir quantidades comparáveis da mesma proteína por US\$ 50 milhões. A estimativa de vendas, somente para o ATRYN (preconizado nos tratamentos para ponte de safena, queimaduras ou septicemia), seria da ordem de US\$ 700 milhões/ano.

A transgenia – entendida como a transferência direta do DNA entre os habitantes da biosfera, ultrapassando as barreiras das espécies, gêneros, famílias etc. – possibilita, também, duas outras aplicações de grande interesse comercial: disponibilidade de cobaias vivas e nos xenotransplantes.

Na atualidade, discute-se intensamente o emprego de animais (camundongos, ratos, coelhos, primatas etc.) como cobaias, para testar os mais variados produtos para uso humano (cosméticos, alimentos, medicamentos, produtos químicos etc.). Por meio da transgenia, se pode obter animais com as características específicas do fenômeno que se deseja estudar (doença, modificações teciduais por agentes físicos e/ou químicos, entre outros), implicando a redução do número de animais a serem submetidos aos testes, bem como o sofrimento infringido a eles durante a realização desses testes (GOLDBERG; HARTUNG, 2006). Lembra-se que os animais transgênicos permitirão avaliar com muito mais detalhes as fisiopatologias de inúmeras doenças, o desenvolvimento de novas formas de tratamento, novos testes para diagnósticos, agentes terapêuticos mais eficazes e baratos, além de, quem

sabe, o tão esperado protocolo para a terapia gênica (PESQUERO et al., 2007).

Diferentes órgãos para uso em humanos podem ser obtidos de animais transgênicos – a princípio em quantidade ilimitada – trazendo, como benefício principal, a redução do número de pacientes nas filas de transplante de órgãos. Os órgãos, por serem coletados logo após o sacrifício do animal, não ficam sujeitos aos efeitos *post-mortem*, como hemorragia e alterações metabólicas. O xenotransplante, apesar das vantagens que apresenta, acarreta três problemas adicionais: questões éticas – transponíveis, à medida que o benefício da intervenção seja claramente demonstrado –, a rejeição do órgão pelo receptor e a introdução no organismo humano de algum vírus ou micro-organismo estranho. A rejeição pode ser contornada, se o animal transgênico possuir, na superfície do órgão, uma proteína humana, a qual impede a resposta imune do receptor, ou, então, se um gene do animal, que produz uma proteína imunogênica (por exemplo, a enzima -1,3-galactosil-transferase) for silenciado (PESQUERO et al., 2007). A introdução de um elemento estranho no organismo do receptor, constitui uma questão aberta e que requer, ainda, muito estudo.

1.3.3 Tecnologia da cultura de células

A tecnologia da cultura de células consiste em promover o crescimento de células animais e vegetais em meios de cultura específicos. As células vegetais por serem totipotentes (a planta completa pode ser gerada a partir de uma única célula) constituem uma ferramenta importante para a biotecnologia vegetal, possibilitando a obtenção de muitas variedades de uma determinada espécie de planta.

No caso do cultivo de células animais, devem ser considerados três aspectos.

As células de insetos podem ser usadas na proliferação de vírus, os quais normalmente as infectam, sendo úteis como agentes de controle biológico de pragas na lavoura.

As células de mamíferos podem ser empregadas como estoque genético para o melhoramento de raças de animais de interesse econômico. Um exemplo notório seria a obtenção e a manutenção de zigotos bovinos, oriundos do cruzamento de touros e vacas geneticamente superiores (KREUZER; MASSEY, 2002).

Finalmente, tem-se as células-tronco, que, por serem indiferenciadas, podem se dividir infinitamente e dar origem a novas células, tanto células-tronco quanto células

5 Em 2001, foi feita a tentativa de expressar, nas glândulas mamárias de cabras lactentes, o gene do aracnídeo responsável pela formação da proteína, a qual pode ser usada na fabricação de vários produtos que requerem fios com alta resistência à tensão (raquetes de tênis, fios de microsutura, entre outros).

diferenciadas. Nesse caso, distinguem-se dois tipos de células-tronco: as **tecido-específicas** (células imaturas encontradas em todos os tecidos do corpo, que, ao se dividir, geram uma célula especializada do tecido ao qual pertencem e outra indiferenciada) e as **embrionárias**, resultantes das primeiras divisões do zigoto. A diferença marcante entre elas é que as tecido-específicas só se diferenciam nas células do tecido ao qual pertencem – por exemplo, as células indiferenciadas do fígado apenas dão origem às células especializadas do tecido hepático (células secretoras da bile, do duto biliar etc.) – enquanto as embrionárias poderão se diferenciar em qualquer célula do corpo, desde que cultivadas em meio contendo os fatores essenciais para uma determinada diferenciação. O emprego de células-tronco tecido-específicas é feito há anos, quando se considera a terapia do transplante de medula óssea, para o tratamento da leucemia. Essa técnica é eficiente, porque a medula contém alto teor de células-tronco sanguíneas, que geram todos os elementos figurados do sangue do paciente. Merece lembrança, também, os transplantes de células-tronco neurais de fetos – para tratar doenças cerebrais – e de células beta produtoras de insulina, retiradas de cadáveres e usadas para combater o diabetes (COOKSON, 2005).

A primeira linhagem de células-tronco – isto é, população de células idênticas capazes de se renovar indefinidamente pela divisão celular, mantendo seu estado genérico e retendo o potencial de originar células-filhas mais especializadas – foi obtida em 1998, a partir de embriões humanos a serem descartados, na fase de blastocisto, existentes nas clínicas de fertilização *in vitro*. Atualmente, existem cerca de duas centenas de linhagens de células-tronco disponíveis para estudo. No entanto, o emprego desse tipo de células, ainda, está sujeito à contestação legal e ética, dificultando a realização de experimentos com elas. Para complicar, lembra-se que o debate sobre este assunto gira em torno de três questões – células-tronco embrionárias, clonagem reprodutiva e clonagem terapêutica – as quais estão intimamente relacionadas, para alguns, ao passo que, para outros, podem ser abordadas em separado (GARDNER; WATSON, 2005). Outros caminhos para obter células com as características das células-tronco – reconversão de células adultas à condição de pluripotência ou partenogênese (ativação de óvulos humanos não-fertilizados para que se dividam como embriões) – são de eficácia, ainda, a ser confirmada. Aliás, o avanço na diversificação das terapias regenerativas está intimamente ligada à compreensão dos mecanismos que levam as células-tronco tecido-específicas, ditas

adultas, a se transdiferenciar, ou seja, produzir novos tecidos funcionais que não pertençam à linhagem de sua camada embrionária. Por exemplo, uma célula-tronco hematopoiética, originada do mesoderma, se transdiferencia em tecido hepático, que provém do endoderma da gástrula. Uma questão técnica de suma importância é a não transplantabilidade direta das células-tronco embrionárias em pacientes, em razão da grande probabilidade de causarem câncer. Aliás, sobre isto, acrescenta-se a suspeita de que tumores cancerosos possuam, em seu bojo, células-tronco – talvez na proporção 1:5.000 ou 1:10.000 – que garantem a proliferação do mal e/ou sua recidiva após o aparente sucesso do tratamento químico e/ou radioterápico (BELLINGHINI, 2005). Ou seja, para que elas tenham valor terapêutico é preciso dominar, com precisão, os meios de estimulação (acoplamento entre determinadas proteínas sinalizadoras e os fatores de crescimento), que levam a célula embrionária a se diferenciar em um determinado tipo particular de célula. Apesar disso, colecionam-se resultados promissores no tratamento de certas cardiopatias (cardiopia isquêmica crônica, infarto agudo, cardiopia dilatada e mal de chagas) e de doenças autoimunes (diabetes tipo 1, *lupus* e esclerose múltipla) (BRAGA, 2005).

Uma aplicação das células-tronco embrionárias, que vem ganhando relevância na área do fármaco-biotecnologia, seria na obtenção de animais transgênicos, tornados aptos a produzir fármacos de origem proteica (“zooreatores”). A técnica em questão – denominada modificação genética controlada⁶ – consiste em se introduzir uma dada sequência de DNA (em geral, o equivalente a um determinado gene) em uma cultura de células-tronco do animal a ser clonado, visando silenciar um gene endógeno natural (o animal resultante é denominado *knockout*) ou modificar a sequência de um gene natural, de tal sorte que se expresse em uma proteína ligeiramente diferente da normal (o animal resultante é chamado *knockin*). Uma vez realizada a modificação genética, as células-tronco embrionárias que, efetivamente, incorporaram o gene modificador, são separadas e, a seguir, injetadas em embriões da espécie animal a ser submetida à transgenia (PESQUERO et al., 2007).

As vantagens mais notórias do uso das células-tronco são: a) Viabilização de protocolos de tratamento pela via

6 Técnica que visa essencialmente obter animais com alterações específicas do genoma, ou seja, um gene-alvo é substituído por uma sequência mutada que, uma vez introduzida, irá inativá-lo ou modificá-lo.

da terapia celular; b) Serem instrumentos para viabilizar estudos sobre o desenvolvimento embrionário humano; c) Colaborarem na descoberta e na elucidação de mecanismos de ação de novas drogas; d) Servirem de campo para testes de toxicidade de drogas em geral.

Entretanto, serão necessárias várias décadas de estudos sobre a obtenção, o cultivo e a compreensão dos mecanismos de diferenciação das células-tronco embrionárias, a fim de contornar obstáculos, viabilizando otimizar a eficiência de obtenção de linhagens de células-tronco, controlar sua diferenciação e crescimento no interior do organismo, distinguir claramente se o sistema imune do paciente ataca as células-tronco ou as células delas diferenciadas, além de estabelecer claramente as vantagens das células-tronco embrionárias frente às células somáticas, nas diferentes aplicações em terapia.

1.3.4 Tecnologia de engenharia de tecidos

Essa tecnologia é o resultado da união entre a biologia celular e a ciência dos materiais, que permite a obtenção de tecidos semissintéticos em laboratório. Normalmente, esses tecidos são formados por células vivas (por exemplo, células epidérmicas e cartilaginosas, entre outras) ancoradas em estruturas biodegradáveis. Nessa categoria, podem ser incluídos os chamados *stents* farmacológicos, muito utilizados atualmente para desobstruir artérias, sobretudo as coronarianas e as carótidas. São constituídos por uma rede de material biocompatível à qual se junta um biopolímero contendo uma droga – liberada lentamente – que evita o acúmulo de tecido fibroso em torno do stent, o que facilita a ancoragem de células endoteliais novas com a consequente recuperação funcional do vaso arterial. Adicionalmente, a coagulação indesejável de plaquetas em torno dessa estrutura é evitada ou muito reduzida (FISCHETTI, 2006).

Ao lado dos *stents* farmacológicos, também é realidade a cultura de pele e de cartilagens, tecidos que requerem pouca vascularização e de estrutura, praticamente, bidimensional. No entanto, produzir *in vitro* tecidos constituintes de órgãos com estrutura tridimensional, cujas células funcionais não se regeneram com facilidade e que devem possuir boa vascularização interna, constitui, na atualidade, um grande desafio para a área de engenharia de tecidos (LAVIK; LANGER, 2004; KHADEMHOSEINI et al., 2009).

Estão sendo desenvolvidos estudos que visam minimizar os efeitos do infarto do miocárdio. Segun-

do descrito por Cohen e Leor (2004), o infarto ocorre porque um vaso sanguíneo importante, que alimenta o ventrículo esquerdo do coração, é bloqueado. Parte do miocárdio é privado de sangue e oxigênio, o que causa a morte das células contráteis do coração (cardiomiócitos) e cria uma área de tecido morto. Como os miócitos quase nunca se dividem, as células sobreviventes não conseguem repovoar a área. As células-tronco locais, que atuam como precursoras de novas células em outros tecidos são incapazes de cicatrizar a ferida. Em vez disso, células fibrosas não contráteis repõem gradualmente os miócitos mortos no infarto. Os miócitos saudáveis das adjacências também podem morrer, causando a expansão da área lesada. Nesse processo, conhecido por remodelagem, a parede do ventrículo na área do infarto torna-se mais delgada e se alarga, podendo até se romper. Os autores citados estão desenvolvendo uma matriz constituída por alginato de cálcio – polímero hidrofílico e biocompatível, obtido de algas marinhas (na forma de sal de sódio) e que não ativa o sistema imune do paciente – visando ancorar cardiomiócitos. Os resultados obtidos indicam êxito parcial em bloquear a expansão do infarto em corações de ratos. Porém, ainda resta muito por fazer, para que o enxerto da matriz de alginato, contendo cardiomiócitos e células endoteliais, possa se tornar um dispositivo funcional em humanos.

Segundo Khademhosseini et al. (2009) já existem vários produtos baseados na engenharia de tecidos como o Epicel[®], que é um substituto permanente da pele no tratamento de queimaduras, o Carticel[®], que consiste de uma suspensão injetável de condrócitos reparadores de cartilagem, derivados do paciente e cultivados com fatores promotores de crescimento, e o Vascugel[®]. Este último é uma estrutura feita de células endoteliais do doador e projetada para ser posicionada na porção superior de um vaso sanguíneo danificado; as células saudáveis do curativo enviam sinais para células no interior do vaso lesionado, que promovem o crescimento, reduzem a inflamação e melhoram a cicatrização.

Para finalizar, merece lembrança o estudo sobre o aproveitamento da seda – material de grande interesse para o homem, sobretudo na confecção de indumentárias – em suturas médicas (por ter baixa rejeição pelo organismo humano), em implantes de vasos sanguíneos (produzidos a partir de fibra de seda endurecida, e que podem substituir seções danificadas de artérias obstruídas) e em esponjas de seda (usadas como estruturas de sustentação na reconstrução de tecidos ou ossos) (OMENETTO; KAPLAN, 2010).

1.3.5 Tecnologia de biossensores

Essa tecnologia resulta da junção da biologia molecular e da microeletrônica. Basicamente, um biossensor é um dispositivo bioeletrônico composto por uma substância biológica imobilizada junto à superfície sensora de um transdutor (Figura 1.8). A substância biológica pode ser um micro-organismo, uma única célula de organismo pluricelular, um anticorpo ou uma enzima. Quando a substância biológica for uma enzima, o biossensor será chamado eletrodo enzimático. A grande vantagem do biossensor é permitir a detecção e/ou quantificação de um dado composto presente na solução em baixíssima concentração. O biossensor gera sinal eletrônico digital diretamente proporcional à quantidade da substância a ser dosada, explorando as especificidades das moléculas biológicas (KREUZER; MASSEY, 2002). Esse assunto será retomado no capítulo 9.

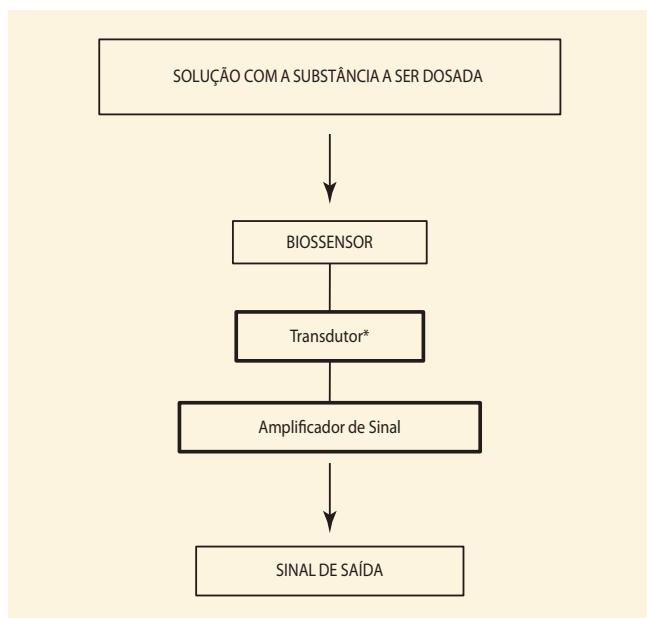


Figura 1.8 Esquema de um biossensor.

* O transdutor é uma placa eletro-sensível sobre a qual é imobilizado o componente biológico (células, enzimas, etc.), que interage com a substância a ser dosada.

O biossensor descrito aqui segue os fundamentos da eletrônica convencional. No entanto, nos últimos anos, estão sendo desenvolvidos sensores totalmente novos, construídos com base nos princípios da nanotecnologia. O material nanotecnológico mais promissor para esse fim são os nanotubos da variedade alotrópica grafite do carbono. Na grafite, os átomos de carbono ligam-se conforme um padrão geométrico hexagonal plano. Uma

folha monocamada de grafite, cuja espessura é igual ao diâmetro de um átomo de carbono, é enrolada em forma de cilindro com cerca de 1 nm de diâmetro, dando origem ao nanotubo de carbono. Uma grande quantidade de nanotubos de carbono, dispostos aleatoriamente [nanorede de carbono] entre dois microeletrodos, submetidos a uma diminuta diferença de potencial elétrico, torna-se tão condutora quanto os metais. Arranjando a nanorede de carbono sobre uma superfície inerte e extremamente fina, e juntando aos nanotubos certas moléculas de reconhecimento – anticorpos monoclonais, por exemplo, atuando como receptores – que reagem com uma biomolécula-alvo, tem-se um biossensor nanométrico (GRUNER, 2006).

A ligação da biomolécula com o receptor perturba o fluxo de elétrons pela nanorede, causando variação na diferença de potencial elétrico entre os microeletrodos, que é medida. Especula-se adaptar um sistema desses, para dosar o teor do antígeno específico de próstata (PSA, em inglês) em amostras de sangue, ou ainda, dispor um conjunto de sensores de nanoredes, cada um com uma molécula de reconhecimento diferente, propiciando a detecção de muitos genes ou proteínas específicas de interesse médico (GRUNER, 2006). Segundo Gruner (2007), uma nova tecnologia geralmente passa pela seguinte sequência de estágios de desenvolvimento: conceito, P&D, prova de conceito, protótipo, desenvolvimento de produto e fabricação. No caso de dispositivos para fins químicos e biológicos – ainda, segundo o autor citado – há duas empresas desenvolvendo este tipo de produto: Motorola (Schaumburg, Illinois; <www.motorola.com>), que tem um produto desses em fase de protótipo, e a Nanomix (Emeryville, Califórnia; <www.nano.com>), que possui vários deles entre as fases de P&D e de desenvolvimento de produto.

O desenvolvimento de nanodispositivos realmente aplicáveis, conforme discutido aqui, não pode prescindir de uma fonte de energia adequada, que os mantenham operacionais por longos períodos. O sensor de nanorede de carbono discutido requer energia, mesmo que da ordem de nanowatts ou microwatts, a qual deve provir de uma fonte geradora ou, melhor dizendo, nanogeradora. Se o dispositivo for planejado para atuar no organismo, seria muito interessante que a energia, a qual é absolutamente necessária para o seu funcionamento de modo autônomo, provenha do próprio corpo. Segundo Wang (2008), uma possibilidade de se obter energia elétrica em voltagem ultrabaixa, seria aproveitar uma série de microenergias que o corpo gera, a saber, energia mecânica (como os movimentos do corpo e o estiramento muscular), energia de vibração (como as ondas acústicas)

e energia hidráulica (como fluxo sanguíneo e de outros fluidos corporais). A questão é: Como converter todas essas formas de energia em eletricidade?

O referido autor está desenvolvendo nanogeradores, baseados em um conjunto de nanofios de óxido de zinco, dispostos verticalmente, formados por cristais hexagonais com propriedades tanto piezoelétricas quanto semicondutoras. Um eletrodo retangular com a superfície inferior sulcada fica acima dos nanofios e se move lateralmente em resposta a forças externas como a vibração, a pressão arterial ou ondas acústicas. O nanogerador descrito por Wang (2008), ainda, deve ser melhorado, haja vista seu tempo de funcionamento autônomo alcançar 50 h, no máximo. Além disso, um dispositivo com tamanho de 6 mm² gera uma corrente de saída de 800 nanoamperes e uma voltagem de 10 milivolts. As melhorias a serem introduzidas nesse dispositivo são: otimizar o empacotamento dos nanofios entre os eletrodos, arranjar mais de um nanogerador em série (para aumentar a voltagem de saída ou em paralelo) e, finalmente, produzir nanofios uniformes tanto na altura quanto no diâmetro. Ainda na linha do nanotubo de carbono, segundo Regis (2009) é possível construir um dispositivo, denominado nanorádio, capaz de desempenhar as funções exigidas para um rádio típico, quais sejam, antena (recepção), amplificador, demodulador e sintonizador simultaneamente. Entre as várias possíveis aplicações antevistas pelo autor, a mais provável para um futuro não distante seria na administração controlada de medicamentos.

Nessa linha de materiais filiformes lembra-se, ainda, das possibilidades do emprego de fios de seda para tecer películas finas – a serem alojadas sob a pele –, nas quais seriam inclusos circuitos de silício, hologramas ou redes de difração, que mudariam de cor, por exemplo, quando o nível de oxigenação do sangue fosse alterado (OMENETTO; KAPLAN, 2010).

A área da bioeletrônica, inegavelmente, abre para a biotecnologia farmacêutica perspectivas fantásticas para um futuro mais ou menos remoto, à medida que os procedimentos de miniaturização vão sendo aperfeiçoados. A mimetização eletrônica de organelas celulares parece ser uma possibilidade factível na prática. Choi (2009) descreve um protótipo eletrônico do complexo de Golgi⁷,

constituído por um chip sobre o qual foram imobilizadas diversas enzimas. Depositando-se sobre o chip uma gotícula de 300 bilionésimos de litro, contendo várias moléculas de interesse dissolvidas, e fazendo-a escorrer (usando recursos eletromagnéticos) pelos sulcos do chip, promove-se as reações catalisadas pelas enzimas presentes. O autor aplicou o dispositivo “golgiano” na obtenção da heparina – um anticoagulante de amplo uso – a partir de seu precursor inativo ter percorrido o complexo de Golgi artificial. Talvez, segundo o autor, esse procedimento se torne mais eficaz na produção do anticoagulante do que o processo atual, que é baseado na cultura de tecido animal. Nessa linha de biodispositivos, merece lembrança um tipo de prótese auricular, que está sendo desenvolvida com a finalidade de substituir os canais semicirculares do ouvido interno danificados, permitindo que o paciente volte a ter a percepção do movimento espacial, evitando tonturas e quedas frequentes (DELLA SANTINA, 2010)⁸. Frente à literatura pertinente, parece não ser exagerado afirmar que os desenvolvimentos mais espetaculares para a biotecnologia farmacêutica originar-se-ão da área dos biossensores, na forma de micro e/ou nano dispositivos, que tornarão factíveis as “viagens pelo corpo humano”, até há pouco pertencentes ao campo da fantasia. Serão pequenos aparelhos realizando cirurgias, administração de medicamentos e auxiliando no diagnóstico de enfermidades (DARIO; MENCIASSI, 2010; HARADA et al., 2009; MALLOUK; SEN, 2009; WANG, 2009).

1.3.6 Tecnologia de engenharia genética

Essa tecnologia, também chamada DNA recombinante, permite recombinar material genético de diferentes origens. Na natureza, o material genético é constantemente recombinado por meio do *crossing-over* entre cromossomos homólogos dos progenitores durante a formação dos gametas, quando óvulo e espermatozoide se unem na fertilização ou, no caso de procariotos, quando duas bactérias trocam material genético por meio da conjugação, transformação e/ou transdução. Em cada uma dessas situações de recombinação natural, o resultado é o aumento da variação genética, a qual serve de material para a mudança evolutiva dirigida pela seleção natural (KREUZER; MASSEY, 2002).

7 Organela formada por uma rede de sacos membranosos empilhados, cuja função básica reside na modificação estrutural de proteínas, tornando-as funcionais. Sabe-se que os sacos mudam continuamente de forma e que o trânsito das vesículas, no interior deles, pode ser acompanhado, mas há dúvidas sobre o conteúdo interno das vesículas.

8 No site da Johns Hopkins Medicine, disponível em <www.hopkins-medicine.org/otolaryngology/research/vestibular/VNEL>, podem ser encontrados pormenores sobre o referido dispositivo.

Merece destaque o fato de o homem poder interferir na variação genética quer por meio do cruzamento seletivo quer pela tecnologia do DNA recombinante.

No cruzamento seletivo, indivíduos com uma dada característica de interesse são escolhidos para serem progenitores da futura geração. Desta se procede a uma nova seleção e se obtém a terceira geração, e assim sucessivamente, até que se obtenha uma população de indivíduos com a característica desejada.

Na engenharia genética promove-se a junção de segmentos de moléculas de DNA provenientes de diversas fontes. Uma das moléculas de DNA é clivada em um ponto previamente estabelecido e religada a um pedaço de outra molécula de DNA por meio do uso das enzimas de restrição. O novo DNA é transferido para a célula-alvo por meio de um plasmídeo ou vírus, que atuam como vetores (Figura 1.2).

Na engenharia genética move-se um único gene – cuja função é bem conhecida – de um organismo para outro, com ou sem relação taxonômica, enquanto no cruzamento seletivo são transferidos vários genes com funções indeterminadas entre indivíduos aparentados taxonomicamente. Enfim, é o grau de aleatoriedade que distingue claramente a engenharia genética (não aleatória) do cruzamento seletivo (aleatório).

Um exemplo de aplicação dessa técnica foi a obtenção de um rebanho de cabras produtoras (“zooreatores”) da antitrombina humana (ATryn®), que, em linhas gerais, consistiu de cinco etapas (STIX, 2005):

- 1^a) Obtenção do transgene: resulta da associação de um gene, que ativa a produção de leite no animal (promotor da betacaseína), com um gene da proteína terapêutica (no caso, o gene que se expressa na antitrombina humana).
- 2^a) Transferência do transgene para um óvulo de cabra: essa operação pode ser realizada de duas maneiras: por microinjeção – o transgene é injetado diretamente no núcleo de um embrião unicelular – ou por clonagem, na qual o transgene é inserido em uma célula diferenciada do animal, a qual é, em seguida, fundida com um óvulo desnucleado, formando um embrião. Em ambos os métodos, o embrião resultante é inserido no útero de uma fêmea receptora.
- 3^a) Seleção das cabritas geradas portadoras do transgene.
- 4^a) Indução da lactação nas cabras.

- 5^a) Cruzamento das cabras mais eficientes na lactação com bodes normais. Os filhotes transgênicos constituem um rebanho ordenado regularmente. A antitrombina humana é separada do leite e purificada até alcançar o grau farmacêutico.

A engenharia genética está sendo empregada para desenvolver uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, que flocula em baixas concentrações de glicose no meio de fermentação. Uma levedura com essa característica se torna relevante, quando usada na produção de álcool etílico em quantidade da ordem de bilhões de litros por ano. Nesse caso, o processo de produção prescindiria da centrifugação – operação unitária importante para separar as células do caldo fermentado, mas que requer alto consumo de energia elétrica, além da centrifuga ser um equipamento caro e que requer manutenção constante –, já que a levedura floclada se deposita no fundo do fermentador e o caldo fermentado é removido por decantação (BUYS, 2002).

A estratégia, segundo Buys (2002), consiste em se fabricar um plasmídeo, contendo o gene causador da floclação, chamado FloI – que normalmente se encontra silenciado nessa levedura –, o promotor do gene da álcool-desidrogenase (que é inibido pela glicose), e o marcador de seleção, o qual é formado pelo gene que se expressa na proteína de membrana chamada arginina-permease, cuja função é controlar os canais por meio dos quais a arginina penetra no interior da célula. Esse gene, no entanto, não é vital para a levedura, porque ela possui uma via natural de biossíntese desse aminoácido.

O detalhe característico desse plasmídeo é que o gene promotor e o FloI são inseridos no meio do gene da arginina-permease. Assim, quando o plasmídeo é introduzido no interior da célula – por meio, por exemplo, do choque térmico, o qual causa pequenas fissuras nas plasmalemas das células, através das quais os plasmídeos penetram –, ele parece com o trecho do cromossomo contendo o gene da arginina-permease, originando uma alça. A porção livre da alça, contém os genes FloI e o promotor, os quais durante o pareamento dos cromossomos homólogos (um dos eventos da divisão celular), são inseridos no genoma por meio do *crossing-over*. No final, obtém-se levedura recombinante com o gene FloI regulado pelo promotor, que, por sua vez, é dependente da concentração de glicose no meio e, em adição, com o gene natural da arginina-permease silenciado.

A importância do marcador de seleção consiste no fato de que as células, que não produzem o canal de

arginina-permease, são insensíveis à canavanina – um análogo estrutural da arginina, que bloqueia o crescimento celular –, permitindo que as células recombinantes sejam as únicas a crescerem em um meio de cultura rico em canavanina, uma vez que o inibidor de crescimento não penetra mais na célula. Ainda, segundo Buys (2002), deve ficar claro que, a rigor, as leveduras resultantes não são transgênicas. Isto porque nenhum dos elementos genéticos introduzidos nelas proveio de espécies diferentes de micro-organismos. As modificações empregadas produziram apenas um rearranjo genético, do qual se obteve o efeito desejado: o de condicionar a floculação das células em função da falta de glicose no meio de fermentação.

Inegavelmente, os avanços proporcionados, até agora, pela engenharia genética têm sido fantásticos. Porém, recentemente foi demonstrada a possibilidade de se criar “vida sintética” por meio da síntese completa do genoma da bactéria *Mycoplasma genitalium*, que foi transplantado para outra bactéria do mesmo gênero, na qual se replicou corretamente (KRAUSS, 2010; BIELLO, 2010). Em que pese a mídia ter alucinado o feito de obtenção de “célula sintética”, na verdade, apenas o genoma da célula enxertado em uma bactéria é sintético – ou seja, a célula que recebe o genoma é uma célula natural, portanto, não sintetizada pelo homem. Todavia, o primeiro passo para fabricar “vida sintética” já foi dado, sem dúvida alguma.

1.3.7 Tecnologia de engenharia de proteínas

Essa tecnologia, geralmente associada à engenharia genética, visa o melhoramento das proteínas naturais (por exemplo, mudar o pI da molécula, aumentar ou diminuir a capacidade emulsificante e aumentar a solubilidade em solventes polares ou apolares) ou a criação de novas proteínas com alguma propriedade diferente daquelas encontradas na natureza.

Segundo Kreuzer e Massey (2002), a tecnologia da engenharia de proteínas possui duas vertentes de grande interesse:

- A) Engenharia enzimática:** consiste em se modificar com maior ou menor intensidade a estrutura molecular de uma enzima – proteína com atividade catalítica – a fim de aumentar a termoestabilidade, a especificidade pelo substrato, a estabilidade frente ao pH, entre outras. Isso é feito na tentativa de ampliar o leque de aplicações desses catalisadores em processos industriais. A modificação poderá ser feita por meio de manipulações químicas da estrutura molecular – seria a chamada modificação direta – ou indiretamente pela modificação genética da fonte
- B) Engenharia de abenzimas:** as abenzimas são anticorpos com atividade catalítica. Os anticorpos e as enzimas se assemelham, por serem proteínas que se ligam a moléculas específicas (substratos), diferindo, no entanto, pelo fato de o anticorpo se ligar à molécula específica por simples afinidade e a enzima por afinidade e para promover modificações intensas na molécula de substrato. A criação de uma abenzima visa suprir a falta na natureza (ou uma fonte rara e de baixa produtividade) de enzimas com características ímpares. Por exemplo, desenvolver endonucleases de restrição e proteases ultraespecíficas é de grande interesse na atualidade.

1.3.8 Tecnologia do RNA antissenso

Essa tecnologia é empregada para bloquear ou diminuir a produção de certas proteínas. Consiste em se usar um oligonucleotídeo com sequência complementar de bases nitrogenadas a um determinado RNA_m – favorecimento da interação oligonucleotídeo-RNA_m –, visando impedir a sua tradução na correspondente proteína (Figura 1.9). Essa tecnologia abre espaço para a chamada engenharia metabólica, que tem o objetivo de permitir a obtenção de compostos de interesse comercial, mas que são intermediários de vias metabólicas intracelulares. Atualmente, apresenta interesse, também, no desenvolvimento de terapias anticâncer e/ou antivirais.

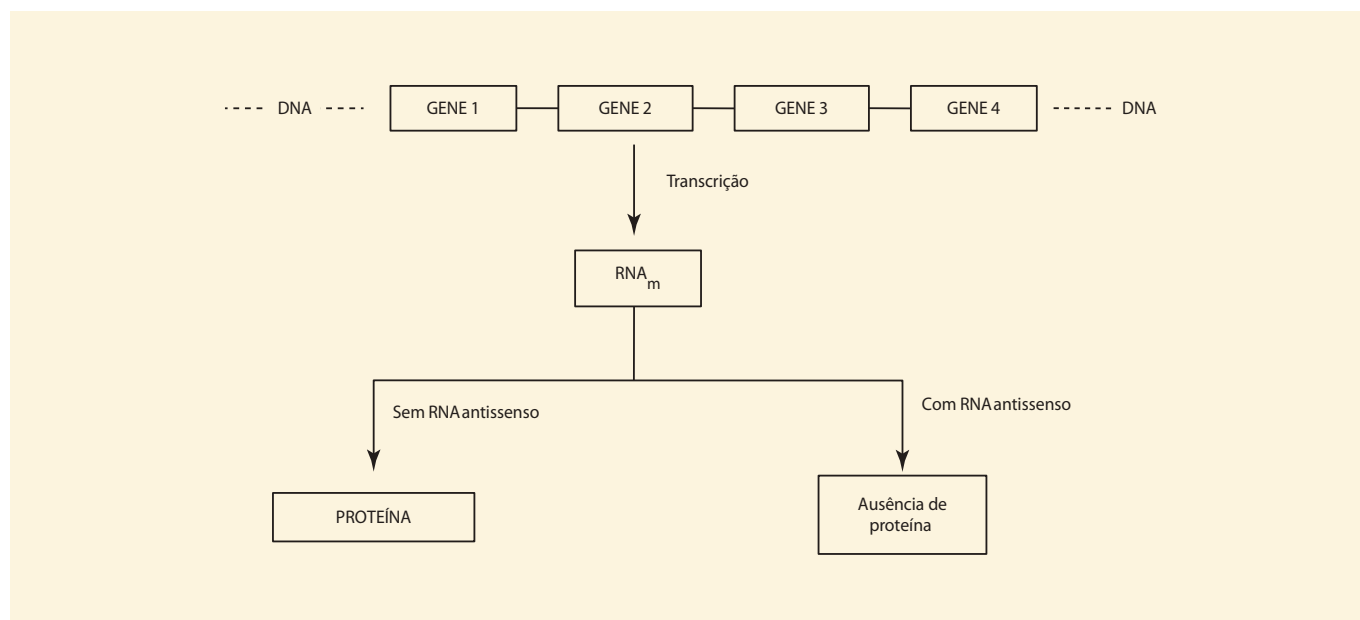


Figura 1.9 Esquema do mecanismo do RNA antissenso. Quando o RNA anti está presente no citoplasma, o RNAm não se liga ao ribossomo e a tradução em proteína é bloqueada.

1.3.9 Tecnologia do chip de DNA

Essa tecnologia resulta da junção entre a área de semicondutores e a biologia molecular.

O DNA é uma biomolécula, que favorece a criação de estruturas (por exemplo, para o estudo cristalográfico de macromoléculas) e de dispositivos nanotecnológicos.

Recorda-se que o DNA é uma estrutura nanométrica, consistindo de um esqueleto duplo de moléculas de fosfato e açúcar, no meio da qual se encontram pares de bases nitrogenadas unidas por ligações de hidrogênio (**A**denina-**T**imina e **C**itosina-**G**uanina). A molécula se contorce, comumente, em uma dupla hélice de mão direita (B-DNA) ou, dependendo das condições do meio, de mão esquerda (Z-DNA), ambas com cerca de 2 nm de diâmetro. Atualmente, as ferramentas disponibilizadas pela biotecnologia – sobretudo as enzimas de restrição (cortam a molécula de DNA em posições bem definidas), as ligases (enzimas que catalisam a formação de ligações covalentes entre átomos) e a máquina PCR (reação em cadeia da polimerase; permite que se façam milhares de cópias de uma mesma fita de DNA) – permitem sintetizar novas moléculas de DNA ou manipular moléculas naturais de DNA. Além disso, as duas fitas constituintes do DNA apresentam as extremidades livres, ou seja, não pareadas, possibilitando a interação entre diferentes DNA – sintético e/ou natural – de modo programável e previsível. Uma extremidade

formada por N-bases desemparelhadas de comprimento possibilita a existência de 4^N arranjos de seqüências de bases (SEEMAN, 2004).

A variabilidade dos arranjos das extremidades das fitas de DNA permite que elas sejam arranjadas no espaço tridimensional de inúmeras maneiras, como, por exemplo, um cubo. Se, dentro do cubo, for inserida, digamos, uma molécula de proteína, a qual – em virtude das dimensões nanométricas da cela cúbica – é imobilizada em uma dada conformação, o conjunto pode ser submetido à análise cristalográfica para determinar a estrutura da proteína de interesse. Se a proteína for um receptor celular, o conhecimento de sua estrutura dimensional permitirá o planejamento preciso de um ligante de baixa massa molar, por exemplo, um fármaco (SEEMAN, 2004).

Segundo Seeman (2004), existe a possibilidade de se aproveitar a interconversão entre os dois tipos de dupla hélice de DNA, a chamada mudança B-Z (Figura 1.10), para criar uma chave lógica de liga-desliga, análoga àquelas do tipo 0/1 dos circuitos eletrônicos impressos em chips de silício. Teoricamente, a combinação lógica de vários tipos diferentes de moléculas de DNA – nesse caso, se inclui tanto DNA natural quanto sintético e de comprimentos e arranjos helicoidais distintos, mas bem definidos – permitiria esboçar modelos de “nanomáquinas” para fins de sensoriamento intracelular ou, até mesmo, computacionais.

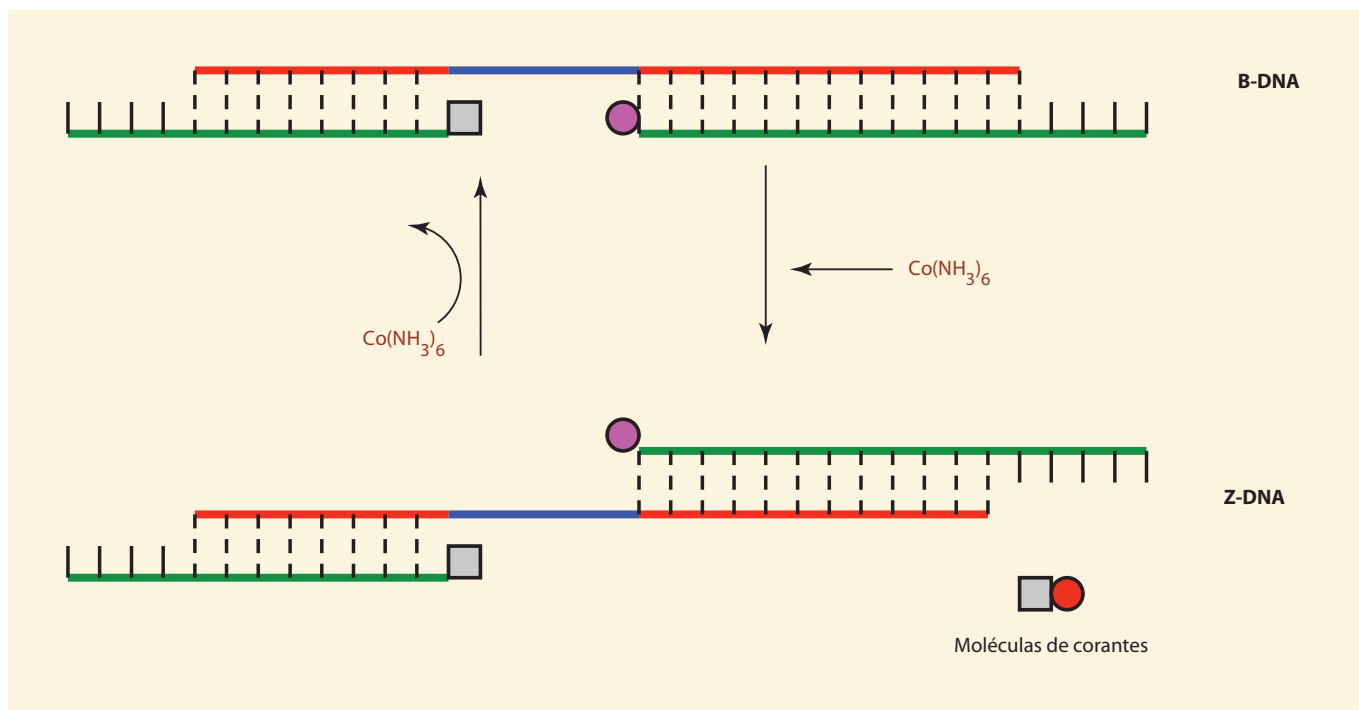


Figura 1.10 Interconversão das duplas hélices (B-DNA e Z-DNA) catalisada pelo cobalto de hexamônio. As configurações B-DNA/Z-DNA representariam uma chave lógica tipo liga/desliga.

É evidente que o conceito computacional, envolvendo moléculas de DNA – ou seja, moléculas biológicas virarem matéria-prima de uma nova espécie de computador – deve ser tratado com as devidas ressalvas. Com certeza um computador biológico não teria desempenho melhor do que um computador convencional. Basta lembrar que a velocidade de síntese proteica dos ribossomos – sem dúvida, uma máquina biológica natural admirável – é de apenas centenas de operações por segundo, bem inferior, portanto, aos bilhões de operações por segundo dos dispositivos eletrônicos (SHAPIRO; BENENSON, 2006; BENENSON et al., 2004). No entanto, a nanomáquina biológica fala a “língua” das células vivas.

A vantagem dos computadores constituídos de moléculas biológicas vem de seu potencial para funcionarem em um ambiente bioquímico (até mesmo dentro de um organismo vivo) e interagir com ele por entradas e saídas, em forma de outras moléculas biológicas. Um computador biomolecular poderia agir como um “médico” autônomo dentro de uma célula, por exemplo. Ele poderia perceber sinais do ambiente indicando doença, processá-los, usando seu conhecimento médico pré-programado, e gerar um sinal ou um fármaco como saída (Figura 1.11) (SHAPIRO; BENENSON, 2006).

Os aspectos discutidos aqui ainda se encontram no campo das ideias criativas, exigindo muitos anos de desenvolvimento para se tornarem realidade.

Atualmente, porém, já são utilizadas lâminas de vidro especial sobre as quais se acham aderidas sondas de DNA (oligonucleotídeos constituídos pelas bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina). O DNA a ser analisado é removido da célula, marcado com uma substância fluorescente e, a seguir, é colocado em contato com o chip. Sequências hibridizadas (complementares) se ligam às sondas, e os pedaços não ligados são descartados. Dessa maneira, torna-se possível analisar, de uma só vez, milhares de sequências de bases nitrogenadas, que, na verdade, constituem diferentes genes. Um dispositivo desse tipo, constituído por uma lâmina de vidro (o suporte) e moléculas de DNA sintético (o “circuito”), recebeu o nome de “chip de DNA”, por analogia ao chip eletrônico (que tem base de silício e circuito metálico impresso).

Atualmente, existe no mercado uma variante do chip de DNA, chamada “chip de genes”, que consegue sequenciar um genoma ou buscar marcadores de variantes gênicas, visando associá-las à susceptibilidade a doenças futuras. O Affymetrix® (Human Genome U95Av2; U.S.Pat. Nº 5,744,305;5,445,934) é um “chip de genes”, que pode analisar rapidamente o DNA de uma pessoa em busca de uma série de variações pontuais, e indicar a propensão da pessoa a apresentar enfermidades no futuro (LEHRMAN, 2008). Mas, Lehrman (2008) enfaticamente adverte que, exceto no caso de transtornos

raros – provocados por uma única variante genética –, ter uma susceptibilidade genética está longe de ser uma garantia de doença. Genes múltiplos interagem dentro de um sistema biológico complexo, que inclui muitos outros aspectos importantes, entre eles o RNA

e substâncias químicas no meio ambiente. Em resumo, ainda está longe o momento em que a genotipagem, nos moldes preconizados, passará a ter um valor prático para subsidiar com segurança o diagnóstico médico de uma enfermidade.

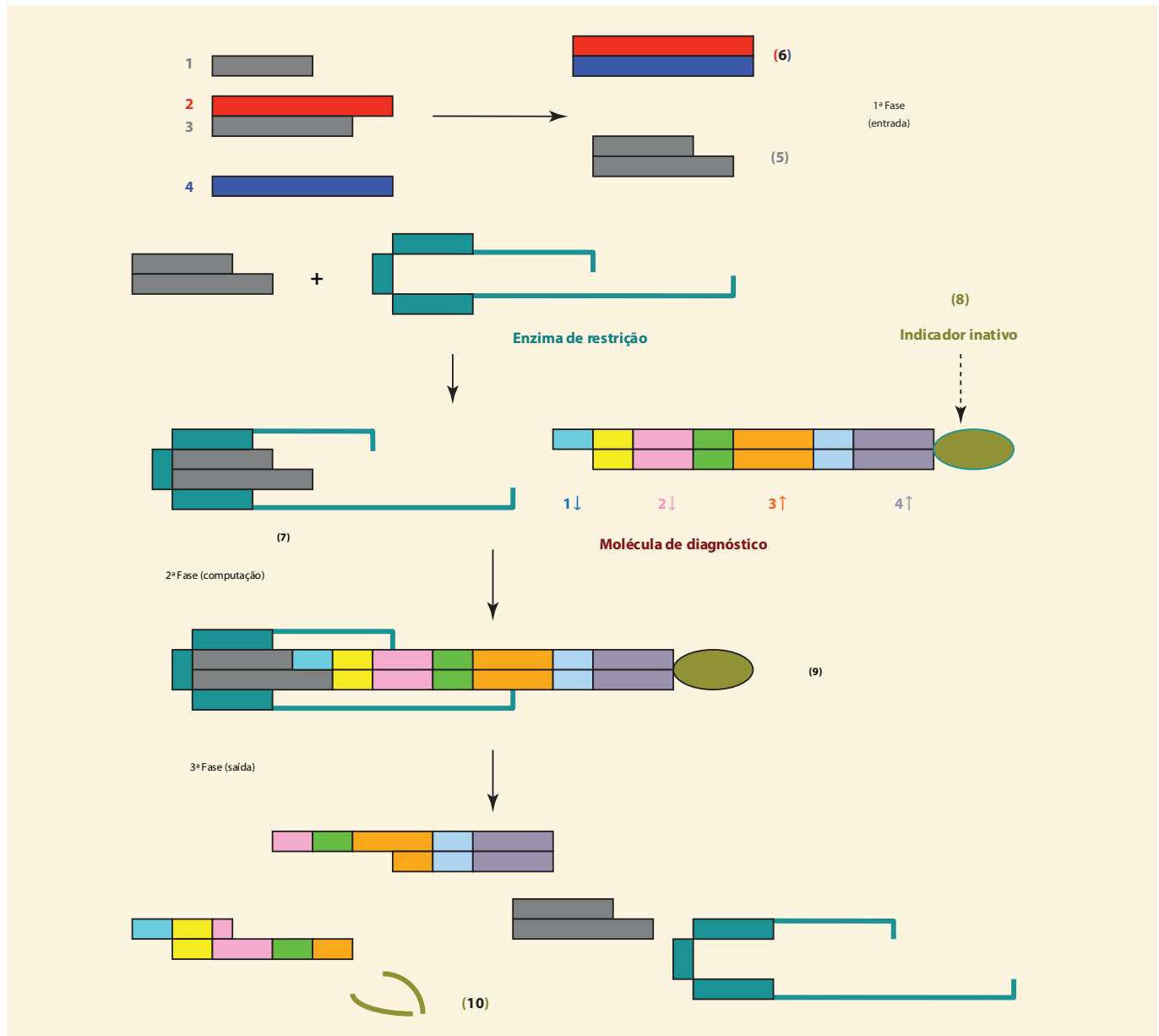


Figura 1.11 Esquema de ação de um "computador biomolecular" planejado para liberar um DNA antissenso (10) [impede a formação do RNA_m, que será traduzido em uma proteína anormal]. O processo se dá em três fases: **1ª FASE**, os oligonucleotídeos-sonda (1 e 2-3) detectam o RNA_m defeituoso (4), que é neutralizado pela união com a fita (2), resultando o complexo (6) inativo. Ao mesmo tempo as fitas 1 e 3 se unem, gerando o complexo (5); **2ª FASE**, o complexo (5) sinaliza ao sistema a existência da anomalia. A enzima de restrição acomoda em seu sítio o complexo (5) e, em seguida, a molécula diagnóstica [contendo a molécula indicadora (8) e os genes específicos com atividades abaixo (1↓ e 2↓) ou acima (3↑ e 4↑) do normal]. Se todos os indicadores da anomalia estiverem presentes (se dá o encaixe perfeito do complexo (5) e da molécula-diagnóstica no sítio ativo da enzima, sendo o conjunto representado pelo complexo [9]), ocorre a **3ª FASE**, quando a enzima de restrição cliva a molécula diagnóstica em posições específicas, gerando um sinal-diagnóstico positivo, que se traduz na liberação do DNA antissenso (10), o qual, a seguir, dirige-se ao genoma da célula para silenciar a transcrição do gene defeituoso. Salienta-se que o DNA antissenso (10) provém da ativação da molécula indicadora (8), no caso do complexo (9) possuir a conformação correta para a clivagem enzimática.

Embora o sequenciamento do DNA tenha sido demonstrado factível, resta encontrar uma maneira para reduzir os custos desse procedimento, sobretudo quando se trata do genoma completo de um indivíduo. Segundo Svoboda (2011) o sequenciamento completo de um genoma custa atualmente algo entre US\$ 5 mil e US\$ 15 mil, porém deve ser baixado para no máximo US\$ 1 mil. A tentativa mais recente para se tentar alcançar esse objetivo repousa no desenvolvimento de um “chip de DNA”, que, em essência, seria um transistor no qual uma molécula intacta de DNA passa por uma fenda de 3 nm de largura, situada no meio de um chip de silício. À medida que o DNA se move pelo nanoporo, um sensor elétrico o lê. Esse dispositivo permitiria ao médico estabelecer, com mais rapidez, conexões entre genes, vulnerabilidades de saúde e tratamentos terapêuticos ideais (SVOBODA, 2011).

1.3.10 Tecnologia da bioinformática

Bioinformática é o uso e a organização das informações biológicas. Representa a interface entre a ciência da computação, matemática e biologia molecular (KREUZER; MASSEY, 2002).

Atualmente, dispõe-se de uma quantidade enorme de dados sobre sequências de genes e proteínas; estrutura tridimensional de moléculas biológicas; mapas genéticos de muitas espécies de seres vivos. A bioinformática utiliza ferramentas computacionais como algoritmos, gráficos, inteligência artificial, programas estatísticos, simulações e gerenciamento de bancos de dados, possibilitando mapear e comparar genomas, determinar estruturas de proteínas, simular ligações entre moléculas (por exemplo, planejar novos fármacos baseados na estrutura dos receptores correspondentes) identificar genes, avaliar o efeito de mutações e determinar relações filogenéticas (KREUZER; MASSEY, 2002). Recentemente, foi proposto um método para digitalizar lâminas de microscopia, contendo amostras de tecido humano, que aumentaria a precisão dos diagnósticos emitidos pelos médicos patologistas, tanto pelo fato de a imagem poder ser manipulada nas suas dimensões para melhorar a sua nitidez quanto ela poder ser compartilhada por vários patologistas ao mesmo tempo. A implantação dessa metodologia vai revolucionar a análise patológica, cujas práticas remontam cerca de um século atrás (MAY, 2010; PERKEL, 2010).

Ressalta-se, como curiosidade, outra convergência entre os universos da informática e da biologia, no que

diz respeito à similaridade dos comportamentos dos vírus biológicos e dos vírus informáticos. Deve-se a Fred Cohen – citado por Filiol e Marion, 2008 – a introdução, no mundo cibernético, da noção de “vírus informático”, ou seja,

um vírus informático poderia ser, aproximadamente, definido como uma sequência de símbolos que, segundo uma interpretação e em ambiente determinado, provoca a modificação de outras sequências de símbolos desse mesmo ambiente, de forma que contenham vírus – eles mesmos, eventualmente modificados.

Em síntese, pode-se dizer que os vírus de ambos os universos citados, se assemelham em vários aspectos, a saber, na estrutura – um vírus biológico (VB) é composto por um filamento de ácido nucleico, que corresponde a uma sequência de letras codificadoras de funções precisas, como um programa. Analogamente, o vírus informático (VI) é um programa executado, quando penetra em um sistema; no efeito sobre o hospedeiro – ambos provocam infecção. O VI força e desvia os recursos de software de sistemas de informática por sua própria conta, engendrando, na maioria dos casos, disfunções em seu hospedeiro; e, finalmente, no modo de reprodução – os VI parecem ter em comum com os VB os poderes de se autoduplicar e, muitas vezes, de se ocultar indefinidamente, além de sofrer frequentes mutações (FILIOLO; MARION, 2008).

A lembrança dessa interdependência de áreas é importante, porque a similaridade dos mecanismos poderá servir de inspiração – tanto para o profissional da biologia quanto para o da ciência da computação – para a elaboração de hipóteses e/ou teses, visando explicar certas observações experimentais. Em última instância, modelos descritivos ou, até mesmo, quantitativos poderão ser gerados e empregados no equacionamento de fenômenos, tanto cibernéticos quanto biológicos. Porém, o sucesso interpretativo dessa correlação, deve considerar a observação feita por Filiol e Marion (2008):

o ciclo de reprodução do vírus dentro das células se executa de acordo com um esquema, ou programa único, codificado pelo genoma viral. No entanto, em informática, a concepção propriamente dita de programa e de dados não existe, pois um computador manipula símbolos. Todo o dado é um programa potencial e, inversamente, todo programa é um dado. O reverso da medalha é o aproveitamento dessa ambivalência para tomar o controle de um sistema.

1.4 BIOTECNOLOGIA E APLICAÇÕES

1.4.1 Na medicina

Na medicina a biotecnologia tem profundas implicações em duas grandes áreas: diagnóstico clínico e terapêutica.

1.4.1.1 DIAGNÓSTICO

Nessa área a biotecnologia tornou a realização dos testes de laboratório muito mais rápida e precisa, graças ao uso de ferramentas do tipo: anticorpos monoclonais, biossensores, sondas de DNA, chips de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR).

1.4.1.2 TERAPÊUTICA

Essa área da medicina está sendo revolucionada pela biotecnologia por meio do desenvolvimento dos processos de cultivo de células animais e vegetais, bem como do processo fermentativo tradicional com o uso de micro-organismos geneticamente modificados. Graças a esses avanços, dispõe-se – atualmente em grande quantidade – de substâncias de ocorrência endógena no homem, tais como a interleucina-2 (que ativa a resposta imunológica pelas células T), a eritropoietina (que regula a produção dos eritrócitos) e o ativador de plasminogênio tecidual (que dissolve coágulos sanguíneos). Merece lembrança a possibilidade de se utilizar plantas e animais transgênicos na produção de medicamentos. Além disso, diferentes terapias baseadas na biotecnologia estão sendo introduzidas na prática médica atual e com grandes perspectivas futuras. As terapias mais estudadas no momento são:

- A) Terapia de substituição:** várias substâncias de ocorrência natural no homem, que, por deficiência dos genes produtores, deixam de ser produzidas em quantidades compatíveis com a vida, são produzidas em escala industrial graças à engenharia genética e às técnicas de bioprocessamento. A insulina (hormônio faltante nos diabéticos) e o fator VIII (proteína importante para a coagulação do sangue, da qual os hemofílicos são carentes) são produzidos em quantidades suficientes para suprir a demanda.
- B) Terapia gênica:** consiste na administração de genes funcionais em pessoas que os possuem em forma defeituosa. É um procedimento que, ainda, deve ser aprimorado, para que os genes sejam

introduzidos nas células adequadas, nas posições corretas dentro do genoma, e respondam corretamente aos sinais fisiológicos.

- C) Terapia celular:** consiste na substituição das células que estão funcionando mal por células saudáveis. Por exemplo, no diabetes do tipo autoimune – em que os anticorpos do corpo atacam as células das ilhotas de Langerhans – poder-se-ia introduzir, no pâncreas, células produtoras de insulina capazes de evitar a sua destruição pelos anticorpos. Essa terapia, ainda, está na fase experimental.
- D) Terapia imunossupressiva:** emprego de anticorpos monoclonais específicos para bloquear a ação das células T (um dos componentes do sistema imunológico humano) e controlar, por exemplo, a rejeição de órgãos transplantados.
- E) Terapia antineoplásica:** consiste em se bloquear a ação de oncogenes por meio do uso de anticorpos monoclonais ou da tecnologia do RNA antissenso.

Para finalizar, lembra-se do aperfeiçoamento da produção de vacinas, sobretudo as de DNA, que estão revolucionando o setor de prevenção de enfermidades (MORROW; WEINER, 2010; LADDY, 2009). No campo das vacinas, no momento, os adjuvantes – ingredientes que estimulam respostas imunes às vacinas – estão merecendo muita atenção. Como adjuvantes clássicos tem-se: sais de alumínio, vitamina E e monofosforil lipídio A e, em desenvolvimento, saponinas extraídas de vegetais, CpG (um marcador do DNA bacteriano sem os grupos metila característicos do DNA humano), interleucinas e outras moléculas sinalizadoras de células (GARÇON; GOLDMAN, 2009; WELDER, 2009).

1.4.2 No meio ambiente

Como é do conhecimento geral, o meio ambiente vem sendo agredido pela atividade humana ao longo dos séculos. Infelizmente, a intensidade da agressão aumentou sobremaneira nas últimas décadas; e o passo da espiral **remoção desenfreada dos recursos não renováveis/ geração de lixo não biodegradável** cresce, dia após dia.

A biotecnologia nessa área é vista por uma boa parcela das comunidades humanas como uma forma de não só resolver os problemas ambientais atuais, mas também como meio de não aumentar o descalabro ambiental.

Essa perspectiva baseia-se na substituição de processos químicos transformadores de matérias-primas não renováveis por processos biológicos, que empregam materiais renováveis, bem como na alta especificidade, precisão e previsibilidade oferecidas pelas tecnologias biotecnológicas.

A biotecnologia pode contribuir na área ambiental por meio de três vertentes: a biorremediação, a prevenção de problemas ambientais e o monitoramento ambiental.

A biorremediação é um processo natural, de baixo custo, bom rendimento e de demanda energética baixa. Normalmente, é executado pelo uso de seres vivos adaptados, há milhões de anos, a ambientes hostis, os chamados micro-organismos extremófilos. A ideia básica consiste no uso da tecnologia da engenharia genética para transferir os genes, que conferem ao micro-organismo a resistência a uma dada condição (por exemplo, termorresistência) a outra célula, que normalmente vive no ecossistema a ser depurado.

A prevenção dos problemas ambientais baseia-se no desenvolvimento da chamada **indústria sustentável**, a qual inclui processos e produtos que estão de acordo com a exigência atual dos consumidores por produtos que não comprometam os recursos, ainda existentes no planeta, para as futuras gerações. Em síntese, pode-se definir como indústria sustentável a atividade produtiva que se utiliza de todas as estratégias possíveis para prevenir a poluição e permitir a preservação integral do meio ambiente. A sustentabilidade é perseguida levando em conta o binômio **limpeza/eficiência**. Quaisquer mudanças nos processos de produção, práticas ou produtos que tornem a produção mais limpa e eficiente é um grande avanço na direção da sustentabilidade (KREUZER; MASSEY, 2002).

As indústrias sustentáveis utilizam tecnologias e experiência para:

a) Reduzir o uso de material e o gasto de energia, ao mesmo tempo que otimizam o emprego de recursos renováveis. Os processos de produção estiveram, por muito tempo, atrelados ao uso do petróleo como fonte de matéria-prima e energia, mas, também, de poluição ambiental. Nos últimos anos, a biomassa agrícola, graças à biotecnologia, tem sido usada como matéria-prima para obtenção de energia e produtos alternativos àqueles oriundos do petróleo. Atualmente, por exemplo, utilizam-se resíduos agrícolas (bagaço de cana, palha de arroz etc.) para a obtenção de vários produtos de interesse comercial, como o etanol combustível, o xilitol (adoçante não cariogênico) (LIMA et al., 2004;

HUBER; DALE, 2009; SELEGHIM; POLIKARPOV; 2009), entre outros.

- b)** Minimizar a geração de poluentes nocivos ou lixo durante o processamento e uso dos produtos derivados. A versatilidade da biotecnologia para a indústria sustentável se reflete especialmente no melhoramento dos processos de produção. Biocatalisadores (células, organelas celulares ou enzimas) são utilizados no lugar de catalisadores químicos sempre que possível. A força-motriz para essa substituição reside no fato de que os biocatalisadores – por serem altamente específicos – geram muito menos produtos colaterais indesejáveis e requerem bem menos energia para catalisar as reações. Por exemplo, já é possível converter, quase completamente, a sacarose em frutose e ácido glicônico, por meio do uso das enzimas invertase, glicose oxidase e catalase, usando reator com membrana operado a temperatura entre 30 °C e 40 °C (TOMOTANI et al., 2005; TARABOULSI JÚNIOR, 2010). Todos os segmentos industriais estão se beneficiando da biocatálise, cuja principal deficiência, ainda, é a indisponibilidade no mercado de biocatalisadores adequados à ampla diversidade das reações executadas em escala industrial. No entanto, a biotecnologia – sobretudo por meio das engenharias genética e de proteínas – vem colaborando intensamente na ampliação da oferta dos mais variados tipos de biocatalisadores para a indústria em geral.
- c)** Produzir produtos recicláveis ou biodegradáveis. Nesse caso em particular, a biotecnologia, ainda, não desabrochou plenamente, restando muitos melhoramentos a serem feitos. No entanto, resultados positivos já estão aparecendo, como, por exemplo, a obtenção do polihidroxibutirato (PHB) de bactérias, que serve de matéria-prima para a produção de plásticos biodegradáveis.

Finalmente, o monitoramento ambiental pode ser feito por meio do uso de biossensores e/ou de indicadores biológicos. Por exemplo, para constatar a presença de fenóis no meio ambiente, preconiza-se o uso de biossensor formado por uma bactéria metabolizadora de compostos fenólicos geneticamente modificada. A modificação genética consiste na inclusão de um gene no genoma da bactéria, que se traduz em uma proteína de fácil detecção, quando ativado por um complexo fenol-receptor resultante do contato entre a bactéria e o meio contendo a substância tóxica referida (KREUZER; MASSEY, 2002).

1.4.3 Na agropecuária

A biotecnologia tem se mostrado muito útil no setor agropecuário no que tange à redução dos custos de produção, na melhoria da qualidade e do valor nutricional dos cultivares e dos animais de interesse econômico.

Na agricultura, avanços espetaculares têm sido obtidos por meio da engenharia genética e da cultura de células vegetais. Por exemplo, plantas geneticamente modificadas podem ser obtidas utilizando-se, como vetor, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, micro-organismo comum no solo que injeta parte do seu DNA nas células da planta, infectando-a. As principais características incorporadas nos cultivares por meio da biotecnologia são o melhoramento nutricional e organoléptico, retardo do amadurecimento, resistência a doenças causadas por parasitas (bactérias, fungos, vírus, insetos, nematoides, ervas daninhas etc.) e aumento da resistência a condições climáticas adversas (geadas, secas prolongadas).

Merece ser lembrado que o melhoramento nutricional do cultivar visa à obtenção de grãos, frutas e verduras com perfil proteico completo e com teor maior de minerais e vitaminas. Esse procedimento leva aos chamados **alimentos funcionais** – possuidores de níveis significativos de componentes biologicamente ativos benéficos à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis –, como, por exemplo, chá verde enriquecido de compostos antioxidantes (importantes no combate dos radicais livres formados no organismo), brócolis e repolho com alto teor de glicosilatos (que estimulam a biossíntese de enzimas antineoplásicas) (KREUZER; MASSEY, 2002).

Na pecuária, a biotecnologia tem contribuído para melhorar a saúde dos animais de interesse econômico, em virtude dos avanços introduzidos nos métodos de diagnóstico de doenças, no aumento da variedade e da disponibilidade de vacinas e de medicamentos. A disponibilização de anticorpos monoclonais específicos tem permitido o diagnóstico rápido e preciso de várias doenças, como brucelose, raiva, disenteria bovina, febre aftosa e triquinelose. Todo o criador tem como objetivo principal obter produção constante ou aumentada (por exemplo, em leite, lã, ovos etc.) reduzindo os gastos com ração. Esse melhoramento vem sendo alcançado por meio do cruzamento entre raças de animais com as características desejadas.

Desde os primórdios da domesticação dos primeiros animais até duas décadas atrás, o cruzamento entre animais com características desejadas (gado com maior massa muscular e menos gordura, por exemplo) era feito

pelo estímulo do acasalamento natural. Porém, com o advento da biotecnologia moderna – aquela resultante das técnicas do hibridoma e do DNA recombinante inventadas nos anos 1970 – o cruzamento de animais passou a ser feito por meio do transplante de embriões. Os embriões são produzidos *in vitro* pela combinação de espermatozoides e óvulos extraídos dos animais com as qualidades genéticas desejadas, seguida de sua implantação no útero de “vacas de aluguel”, as quais podem ser de outra linhagem. A vantagem desse procedimento consiste no maior número de reses obtidas.

Os avanços da biotecnologia no setor agropecuário chegam aos consumidores por meio dos alimentos processados, quer pela indústria de alimentos quer nas cozinhas residenciais (a partir de alimentos frescos). O processamento industrial de alimentos, que se avulta nos dias atuais, conforme se atesta pela enorme variedade de produtos nas prateleiras dos supermercados, deve muito do seu desenvolvimento à biotecnologia. Por exemplo, as empresas que produzem derivados do tomate (extratos, massas, ketchup etc.) usam frutos provenientes de cultivar modificado geneticamente por meio da seleção de variantes somaclonais. Esse tomate contém 30% menos água e requer bem menos energia durante o seu processamento, em grande parte, baseado na evaporação da água por meio da operação unitária de secagem. Um aumento de 0,5% do conteúdo de sólidos do tomate propicia uma economia da ordem de US\$ 35 milhões para a indústria norte-americana processadora de tomates (KREUZER; MASSEY, 2002).

É oportuno lembrar que o primeiro produto vegetal modificado geneticamente, aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, Agência norte-americana que regula drogas e alimentos), foi um tomate que podia amadurecer no pé, evitando sua colheita na fase imatura (verde). A Calgene, empresa que desenvolveu essa variedade de tomate, por meio da tecnologia do RNA antissenso foi capaz de separar as vias metabólicas que provocam os processos de amadurecimento e de apodrecimento do fruto. Os processos referidos são sequenciais, mas catalisados por enzimas diferentes, e, portanto, diferentes genes estão envolvidos nessas vias. Usando um RNA antissenso, a Calgene inibiu a biossíntese de uma enzima fundamental para a via do apodrecimento, deixando intacta a via do amadurecimento (KREUZER; MASSEY, 2002).

O processamento industrial de alimentos deve garantir que estes sejam seguros para uso humano – atualmente, também, para animais domésticos de estimação – du-

rante todo o prazo de validade, estabelecido de acordo com a natureza do alimento. Esse aspecto é garantido pelo controle de qualidade rigoroso, quer da matéria-prima quer do produto acabado, o qual é conseguido por meio de dispositivos oferecidos pela biotecnologia, como os anticorpos monoclonais, os biossensores e as sondas de DNA, que permitem executar análises rápidas, sensíveis e precisas.

Se o melhoramento das matérias-primas (vegetais e animais) é conseguido por meio das tecnologias da biotecnologia moderna (sobretudo as técnicas do hibridoma e do DNA recombinante), o do processamento provém do desenvolvimento de equipamentos e do uso de biocatalisadores enzimáticos (SAID; PIETRO, 2004; NAGODAWITHANA; REED, 1993).

1.5 O BIONEGÓCIO

Apesar de existirem muitas definições para a biotecnologia, inclusive várias permeadas por aspirações idealísticas, como a biologia a serviço da humanidade ou a obtenção de produtos de interesse social ou que curem todos os males que afetam a saúde humana, a mais realística seria considerá-la como a arte de obter dividendos pecuniários a partir de procedimentos biológicos. Lembra-se que, sem a pressão e a disciplina próprias do mercado – ente difuso que permeia todas as atividades produtivas e que afeta direta e indistintamente a vida e a dinâmica das comunidades humanas – ter-se-ia, com certeza, uma ciência elegante, mas nenhuma tecnologia.

Embora a biotecnologia venha se desenvolvendo ao longo dos séculos, foram as inovações ocorridas na década de 1970 (melhoramento da compreensão da relação estrutura/atividade de macromoléculas, sobretudo das proteínas, da natureza altamente interativa das vias metabólicas celulares e dos mecanismos de regulação metabólica, a invenção da técnica do DNA recombinante e da fusão celular, culminando com a obtenção dos anticorpos monoclonais), que impactaram profundamente a experimentação e o pensamento biológico. Os efeitos do impacto ultrapassaram os limites dos laboratórios, alcançando o setor industrial e financeiro, no qual grandes empresários e banqueiros farejaram as enormes perspectivas do bionegócio, além dos escritórios de advocacia, parlamentos, agências de serviços civis e governamentais que se depararam com novos problemas de regulação (incluídos os de caráter moral e ético) e de proteção de patentes.

No mundo dos negócios, a biotecnologia pode ser considerada um setor atípico, porque, em geral, tenta comercializar tecnologias relacionadas com descobertas recentes nas ciências básicas. Em outros termos, a biotecnologia oferece como atrativo para o capital de risco, a potencialidade do mercado para um dado bioproduto e não um mercado real para ele, diferentemente de setores como o de computação, telecomunicações e eletroeletrônica, por exemplo, em que a tecnologia foi desenvolvida após a consolidação das teorias científicas sobre cada ramo de atividade.

Nessas condições, tem-se que o mercado vai sendo formado, à medida que a tecnologia é desenvolvida e/ou aprimorada, sendo que a euforia reinante nos laboratórios universitários e de institutos de pesquisa sobre a perspectiva mercadológica de determinados bioprodutos nem sempre é compartilhada pelos laboratórios industriais. Todavia, o confronto entre o entusiasmo dos cientistas – que os leva à busca desenfreada por recursos para a pesquisa, com o conseqüente desenvolvimento de novos produtos e/ou processos – e o mercado, que exige demanda pelo bioproduto oferecido, constitui-se na força-motriz propulsora para a consolidação do setor biotecnológico ao longo do tempo.

Qualquer setor produtivo para se consolidar, deve estimular, de alguma forma, a estruturação de empresas de pequeno, médio e grande porte, ou seja, deve atrair capital dos investidores. A princípio, configuram-se, apenas, empresas de pequeno porte, pela simples razão de o setor concernente à biotecnologia moderna (referente à exploração das oportunidades advindas da manipulação pontual do DNA celular) dispor, no primeiro momento, somente de metodologias potencialmente geradoras de produtos comercializáveis. Essa condição afastou, no início, as grandes empresas do setor químico-farmacêutico, as quais normalmente visam o retorno do capital investido no curto prazo e têm suas metas de desempenho avaliadas por quadrimestres, atitude gerencial desestimuladora para investimentos em inovação biotecnológica.

Embora não seja um fenômeno estritamente norte-americano, a emergência da aventura biotecnológica independente tem sido pronunciada nesse país. A vanguarda conquistada pelos Estados Unidos no bionegócio resultou da combinação de vários fatores: espírito empresarial voltado para a inovação e a competição; flexibilidade do sistema econômico; disponibilidade de capital de risco; investimento governamental forte em pesquisa básica; força de trabalho altamente diversificada, qualificada e

motivada; além de mercado acessível, aberto e bem regulamentado. Apenas como exemplos, entre as mais de 200 empresas norte-americanas de biotecnologia atuais, citam-se as pioneiras Collaborative Research (1961), Cetus (1971), Genentech (1976), Biogen (1977), Genex (1977) e Amgen (1979) (RATHMANN, 1994).

Evidentemente, não é necessário dispor de uma estrutura empresarial para o desenvolvimento científico, já que este pode muito bem ser obtido no âmbito universitário, desde que recursos, sobretudo governamentais, estejam disponíveis. Porém, uma organização empresarial é fundamental para converter a tecnologia em dinheiro, e isso independe da particular filosofia que norteia o empreendimento.

Por conseguinte, a conversão da biotecnologia em dividendos requer a montagem de uma empresa, que, nesse caso, deve possuir como características gerais: a) mão de obra não intensiva; b) mão de obra intelectualizada; c) mão de obra diversificada; d) manipulação de materiais renováveis e recicláveis; e) empresas de porte pequeno ou médio; f) uso de processos que requerem pouca energia; g) gerenciamento que leve em conta as leis específicas que regem o setor; h) reação do consumidor (expectativa \times qualidade ou desempenho do produto); i) segurança extrema, concernente aos riscos à saúde e ao meio ambiente; j) risco financeiro alto (o bioproduto tem vida de mercado curta); k) P&D continuados; l) retorno do capital inicial investido, no mínimo, em médio prazo.

1.5.1 Estruturação da empresa biotecnológica

Em linhas gerais, a fundação de uma empresa biotecnológica envolve as etapas:

1ª Preparação

Em geral, uma empresa biotecnológica começa a partir do entusiasmo de algumas pessoas (um ou dois cientistas e investidores de risco), que, dispendo de uma técnica relativamente bem estudada e dominada, vislumbram a possibilidade de produzir produtos e/ou serviços comercializáveis. A partir daí, elaboram uma estrutura organizacional seminal, arregimentando um grupo de assessores científicos capitaneados por um cientista de renome⁹, contratando um executivo experiente

e um escritório de advocacia, para tratar dos aspectos legais iniciais do empreendimento.

Um ponto fundamental nessa fase é a definição clara da missão e da estratégia a ser adotada pela empresa, ou seja, deve-se definir a área na qual se pretende atuar (por exemplo, produção de fármacos para uso humano ou animal, reagentes para diagnóstico, produtos para a agropecuária). Nessa etapa, o capital disponível é pequeno, devendo ser suficiente para remunerar a equipe científica, o executivo dirigente e o advogado, sendo suprido inteiramente pelos sócios fundadores (grupo composto por investidores de risco e, eventualmente, com a participação do acadêmico que desenvolveu a metodologia). É muito comum os primeiros contratados receberem um pequeno salário, complementado por uma dada quantidade de ações preferenciais conversíveis da empresa emergente.

Frequentemente, essa fase é rotulada como sendo o ano zero da empresa, tendo como características marcantes liquidez nula (ações inexistentes para negociação) e mais de 90% de chance de falir. Um fator que pode ajudar a dar sustentação à nova empresa é a obtenção da patente para o produto e/ou processo a ser explorado, já que esse título pode estimular o interesse de mais investidores de risco para se somarem aos sócios fundadores.

2ª Consolidação inicial

Se a etapa de preparação tiver sido bem-feita e o futuro bioproduto e/ou serviço apresentar apelo comercial, a empresa biotecnológica embrionária pode entrar no ano seguinte (rotulado como ano I) com a capacidade de consolidar o capital inicial pela atração de novos investidores de risco, os quais aceitam ações preferenciais conversíveis (APC) como garantia dos seus investimentos. Inclui-se a distribuição de APC a futuros membros da diretoria, a candidatos a postos de gerenciamento e chefia e aos membros da assessoria científica, também, garante a fidelidade dos recursos humanos à empresa em consolidação. Não raro nessa fase, pelo menos um investidor de risco com desenvolvimento trântico no meio empresarial passa a injetar capital na empresa, funcionando como agente multiplicador para atrair outros investidores. Abre-se, assim, a perspectiva de gerar um polo de atração crescente e contínuo de capital, elevando as perspectivas de sucesso da empreitada. Nessa fase, a estruturação administrativa é acelerada, sobretudo no que diz respeito à parte legal (organização de toda a documentação pertinente e elaboração do memorando descritivo da empresa). Apesar do viés positivo característico dessa etapa, a chance de falência beira os 65%,

9 A função dessa equipe é elaborar um plano de pesquisa consistente, que leve à obtenção de produtos ou serviços de valor comercial.

a liquidez do investimento é baixa e o valor das ações é muito baixo (menor que R\$ 1,0).

3ª Consolidação parcial

Nessa fase (correspondente aos anos II e III da existência do empreendimento) a empresa já dispõe de fontes de financiamento consistentes, garantidas pelo número alto de investidores (é comum empresas maiores e já constituídas quererem se associar. Intensifica-se a disputa entre os vários interessados em investir na empresa), aperfeiçoamento do plano estratégico (inclusão das estimativas de mercado e do período para o retorno dos investimentos), conclusão da estrutura organizacional (localização da fábrica, quadro de recursos humanos preenchido e organograma de responsabilidades definido, estratégia de vendas e distribuidores definidos, entre outras) e pela iminente comercialização do bioproduto e/ou serviço. Para a consumação deste último item, no máximo, a empresa estará no aguardo da liberação final do produto pela agência de controle governamental, por exemplo, FDA, Anvisa etc. Apesar das perspectivas estarem se materializando, nessa fase, ainda, a liquidez do investimento é baixa, a possibilidade de falência é de cerca de 40% e o valor das ações, embora maior que a fase anterior, ainda não é significativo (R\$ 3,0 a R\$ 5,0).

4ª Consolidação plena

É a fase correspondente aos anos IV e V do lançamento do bionegócio, quando o produto e/ou serviço já está no mercado, gerando receitas para a empresa e dividendos para os investidores, propiciando à empresa abrir seu capital para o público em geral, por meio da emissão de ações ordinárias (nominativas e/ou ao portador) em bolsa de valores. Ao chegar nesse ponto, a empresa já está consolidada e, ao atrair investimento acionário, poderá entrar em fase de expansão generalizada. Logicamente, a empresa alcança o auge da liquidez, a possibilidade de falir é muito reduzida (da ordem de 10%) e as ações podem alcançar valores da ordem de dezenas ou centenas de reais.

1.5.2 Indústria biofarmacêutica

Focando na indústria biofarmacêutica – terminologia adotada em consequência da natureza dos produtos resultantes (os chamados bioprodutos) das técnicas da fusão celular e do DNA recombinante –, tem-se que o montante de divisas movimentadas pelo setor nos Estados Unidos, no biênio 2002-2003, foi da ordem de US\$ 36 bilhões e, no mundo, algo em torno de US\$ 40-50 bilhões. Em

2004, a cifra saltou para US\$ 63 bilhões, quando cerca de 200 empresas lançaram no mercado novas drogas e vacinas (DEMAIN, 2007).

1.5.2.1 BASEADA NA BIOTECNOLOGIA MODERNA

Sem dúvida alguma, os mais famosos produtos da indústria biofarmacêutica são os polipeptídeos de mamíferos. As principais desvantagens desse tipo de droga são, em linhas gerais, a baixa biodisponibilidade, implicando a administração parenteral obrigatória, e o alto custo. Porém, a alta especificidade e a baixa toxicidade são características que superam as desvantagens apontadas.

Compõem o mercado de bioprodutos, fármacos anticancerígenos, fatores de coagulação sanguínea (para tratar hemofílicos), fatores estimulantes de macrófagos e granulócitos (para tratar a neutropenia), interferons e anticorpos monoclonais (Rituximab, Infliximab, Transtuzumab), entre outros.

No caso dos anticorpos monoclonais, talvez os bioprodutos de maior sucesso comercial, no período 2000-2004, a vendagem cresceu de um fator de aproximadamente quatro, sendo as cifras envolvidas da ordem de US\$ 2×10^9 (em 2000), US\$ $3,5 \times 10^9$ (em 2001), US\$ $4,3 \times 10^9$ (em 2002), US\$ $5,5 \times 10^9$ (em 2003) e $6,8 \times 10^9$ (em 2004) (DEMAIN, 2007). Ressalta-se que o mercado desses bioprodutos é o que mais cresce, entre todos os produzidos pela indústria biofarmacêutica. Mais de duas dezenas de anticorpos monoclonais diferentes são encontrados no mercado. Além disso, a efetividade terapêutica dos anticorpos monoclonais cresce continuamente, à medida que a fonte baseada em roedores está sendo substituída pela de tecidos humanos, sendo a concentração média, obtida nos processos fermentativos atuais, igual a 3g/L de meio fermentado (DEMAIN, 2007).

1.5.2.2 BASEADA NA BIOTECNOLOGIA TRADICIONAL

Ao lado dos bioprodutos resultantes das técnicas biotecnológicas modernas (fusão celular e DNA recombinante), existem inúmeros outros, ainda, obtidos a partir de processos fermentativos catalisados por micro-organismos.

A preferência pelo uso de micro-organismos na fabricação de compostos de interesse comercial frente às fontes animal, vegetal ou por síntese química, deve-se, sobretudo, à possibilidade de se obter alta quantidade de produto, por meio da manipulação das condições de

cultivo e das características genéticas das células. Embora os micro-organismos sejam potenciais produtores de uma ampla variedade de substâncias, eles as produzem nas quantidades necessárias para a sua subsistência. Ou seja, ao longo da evolução, eles desenvolveram mecanismos regulatórios, que impedem a superprodução de metabólitos, quer primários (moléculas de baixa massa molar que são intermediários ou produtos finais das vias metabólicas intracelulares, além de poderem ser convertidos em coenzimas ou serem usadas como monômeros de biomoléculas poliméricas), quer secundários (moléculas de baixa massa molar, produzidas pelos diferentes micro-organismos na fase não exponencial de crescimento, que desempenham várias funções, a saber, hormônios sexuais, ionóforos, antibióticos – para eliminar outras espécies competidoras –, efetores de diferenciação, estimulantes da simbiose e efetores de comunicação entre células da mesma espécie). Porém, do ponto de vista industrial o interesse reside, justamente, no fato de a célula microbiana produzir e excretar em excesso determinada substância de valor econômico. Para tanto, os mecanismos regulatórios devem ser sobrepujados por meio da variação das condições de cultivo, de mutações induzidas (provocadas por agentes químicos ou físicos) e/ou da manipulação pontual do genoma por meio da técnica do DNA recombinante.

A genética contribuiu de forma espetacular na obtenção de cepas microbianas altamente produtoras de metabólitos em geral. O procedimento consiste em se submeter a cepa a um agente químico (azida sódica, por exemplo) e/ou a um agente físico (exposição aos raios ultravioleta), seguida da separação dos mutantes, que produzem em maior quantidade o metabólito desejado. Repetindo o procedimento várias vezes, obtém-se no final uma cepa altamente produtora, que é empregada na fermentação industrial. Por exemplo, submetendo cepas altamente produtoras de tetraciclina à mutação, resultaram mutantes, que produziam o antibiótico dimetiltetraciclina em grande quantidade (DEMAIN, 2007). Atualmente, a mutação, digamos, clássica coexiste com as técnicas da biotecnologia moderna.

No contexto do parque biotecnológico, a indústria de fermentação ocupa um lugar de grande proeminência. Provavelmente, tal condição resulta, entre outras, de características como (DEMAIN, 2007):

- a grande razão área por volume apresentada pelos micro-organismos, que facilita a captação de nutrientes do meio de cultura, elevando a taxa metabólica e biossintética do agente catalisador do processo;
- a grande variedade de reações que o micro-organismo é capaz de realizar simultaneamente;
- a fácil adaptação do micro-organismo às condições de cultivo, permitindo que a cepa possa ser transferida da natureza para um frasco com meio de cultura – do tipo sintético ou complexo – e, deste, para um fermentador carregado como meio de cultivo, constituído por fontes de carbono e nitrogênio baratas, mas que estimulam a célula a produzir substâncias de maior valor agregado;
- a facilidade com que as células microbianas podem ser submetidas à mutação – quer *in vivo* quer *in vitro* –, visando ao aumento da produtividade da substância desejada, ou da sua atividade – catalítica, se for enzima, ou biológica, no caso de uma substância não enzimática (antibióticos, hormônios etc.) –, ou, ainda, visando a obtenção de uma molécula inteiramente nova;
- a capacidade do micro-organismo para produzir substâncias enantioméricas dextrógiras ou levógiras, diferentemente da síntese química tradicional, que sempre leva à mistura racêmica, da qual o enantiômero desejado é de difícil separação e com rendimento pífio (do ponto de vista da escala industrial).

Como referido, da fermentação microbiana industrial resultam, como produtos de interesse comercial, metabólitos tanto primários quanto secundários.

1.5.2.2.1 Metabólitos primários

Alguns dos principais metabólitos primários de interesse comercial são:

- A) Aminoácidos:** Alguns exemplos destes compostos são o ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, L-lisina, DL-metionina e L-fenilalanina. O mercado mundial de aminoácidos não é inferior a 5 bilhões de dólares, apresentando um crescimento de 7% por ano. Merece realce, o ácido L-glutâmico – entre os 19 aminoácidos produzidos em escala industrial é o obtido em maior quantidade. São utilizados micro-organismos dos gêneros *Corynebacterium* (*C. glutamicum*) e *Brevibacterium* (*B. flavum*) –, que, na forma de glutamato de sódio, é muito usado como realçador de sabor, em produtos alimentícios.
- No intuito de superproduzir aminoácidos, os mecanismos regulatórios por retroalimentação, atuantes na célula microbiana, têm seus efeitos reduzidos por meio das estratégias:
- a) isolar mutante auxotrófico e submetê-lo à privação de um composto necessário ao seu metabolismo;

- b) isolar mutante resistente a um análogo tóxico (antimetabólito) ao produto que se deseja obter;
- c) combinar em uma mesma cepa mutante a auxotrofia e a resistência ao antimetabólito. Aliás, um procedimento corriqueiro na obtenção de cepas mutantes destinadas à produção de metabólitos primários.

Nessa área, merece menção o uso da técnica do DNA recombinante, que permitiu a obtenção de cepas superprodutoras de metabólitos primários. As cepas selvagens e/ou mutantes tiveram seu genoma acrescido de plasmídeos portadores de óperons, relacionados à biossíntese do aminoácido desejado. O impacto da engenharia genética, nessa área, resultou do emprego das estratégias:

- a) amplificação do gene codificador de uma enzima limitante da velocidade de uma dada via metabólica;
- b) amplificação do gene codificador da primeira enzima atuante, após uma ramificação da via metabólica;
- c) clonagem de gene codificador de enzima, que responde com maior ou menor intensidade à regulação por retroalimentação;
- d) introdução de gene codificador de enzima, que apresenta vantagem funcional ou energética frente a sua análoga naturalmente produzida pelo micro-organismo;
- e) amplificação do gene codificador de uma enzima-chave do metabolismo central, responsável pelo aumento do fluxo de carbono na via metabólica correspondente (por exemplo, a via glicolítica). Visa-se a redução ou eliminação dos gargalos de fluidez da via de interesse, causados pelo acúmulo de intermediários metabólicos;
- f) perturbação do mecanismo de transporte de aminoácidos através da membrana citoplasmática.

Ao reduzir-se a entrada de certo aminoácido na célula, consegue-se reduzir a eficiência do controle por retroalimentação e, em consequência, aumenta-se a produção do metabólito, bem como sua excreção para o caldo fermentado. Acrescenta-se que, se o aminoácido é excretado ativamente por meio de um carreador de membrana, o aumento da formação desse carreador pela célula, irá potencializar o acúmulo do produto no meio de fermentação.

B) Nucleotídeos e nucleosídeos: Basicamente dois são os compostos dessa categoria, que têm interesse comercial (como realçadores de sabor), sendo obtidos por via fermentativa. São duas purinas ribonucle-

osídeo-5'-monofosfatos, chamadas ácido guanílico (5'-GMP) e ácido inosínico (5'-IMP). O maior produtor mundial destes compostos é o Japão, cuja produção média anual é de cerca de 2.500 ton/ano, envolvendo cifras da ordem de US\$ 350 milhões/ano (DEMAIN, 2007). Em linhas gerais, as referidas purinas podem ser obtidas por três caminhos distintos: hidrólise do RNA de levedo com nuclease fúngica, seguida da desaminação enzimática do AMP para IMP; produção dos nucleosídeos inosina e guanosina por fermentação, usando um mutante de *Bacillus subtilis*, seguida de sua fosforilação química; e, produção do IMP (a partir do açúcar) por fermentação com *Corynebacterium glutamicum* e do GMP (a partir da guanina) por síntese química, usando células intactas de *Brevibacterium ammoniagenes*. A produção de IMP por fermentação direta do açúcar não é inferior a 20g/L de meio.

C) Vitaminas: São substâncias que, embora requeridas em pequenas quantidades, exercem papel fundamental nas vias metabólicas intracelulares, sobretudo como coadjuvantes de enzimas-chave na biossíntese de metabólitos primários e secundários. São produtos de alto valor comercial, cujo mercado atual envolve cifra superior a dois bilhões de dólares. Os micro-organismos são as principais fontes de vitaminas ou de seus precursores. Por exemplo, *Ashbya gossypii* (riboflavina/vitamina B₂), *Propionibacterium shernanii* (vitamina B₁₂), *Gluconobacter oxydans* (vitamina C).

D) Ácidos Orgânicos: São compostos de grande interesse comercial, geralmente, obtidos de micro-organismos. Entre os de interesse comercial destacamos os principais.

O ácido cítrico é amplamente usado nas indústrias farmacêutica e de alimentos como acidulante, realçador de sabor, estabilizante, agente tamponante e antioxidante; é produzido por fermentação, usando cepa de *Aspergillus niger* (rendimento aproximadamente de 200g/L).

Podemos destacar também o ácido acético (vinagre) e o ácido L-lático, que é obtido da fermentação com *Rhizopus oryzae*, com uma produtividade da ordem de 2g/L.h.

O ácido L-lático é usado na fabricação do polilactato, um plástico biodegradável, e como solvente na forma de etilactato, produto não agressivo ao meio ambiente; dado sua compatibilidade e a de seus derivados com as questões de defesa ambiental, sua produção tem sido estimulada.

O ácido glicônico é amplamente usado no polimento de superfícies metálicas a serem submetidas a galvanoplastia, por exemplo, e em medicamentos hepatoprotetores (na forma de gluconato de cálcio). O ácido itacônico é muito usado na indústria química para obter resinas e fibras com características especiais. É obtido por processo fermentativo, no qual é empregado o fungo *Aspergillus terreus*.

E) Álcoois: Constituem uma grande variedade de produtos, dos quais citam-se tão somente a título de exemplos.

O **etanol** é o álcool usado em bebidas alcoólicas para uso humano e como combustível *per se* ou como aditivo de gasolina. É de longe o álcool produzido em maior quantidade na atualidade. Por ano, são produzidos mais de 50 bilhões de litros, 50% dos quais são produzidos pelo Brasil a partir da cana-de-açúcar. Sua produção é feita exclusivamente por via fermentativa, usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora exista a possibilidade de obtê-lo por síntese, a partir do etileno – um derivado do petróleo.

O **butanol** é um álcool o qual, atualmente, tem se cogitado usar como substituto do etanol, por três razões: possui 30% mais energia química potencial do que o etanol, pode ser misturado à gasolina em base volumétrica de até 40% (no caso do etanol a razão volumétrica é de, no máximo, 25%) e ser mais facilmente armazenado e transportado, por ser menos volátil.

O **glicerol**, é um poliálcool obtido tanto por síntese química (a partir do propileno, um derivado do petróleo) quanto por via fermentativa pela *Candida glycerinogenes*; ambos os caminhos são relevantes para garantir a produção mundial na casa de 600 mil ton/ano. Ressalta-se que o glicerol, também, pode resultar como produto colateral da fabricação de óleos e gorduras, da fermentação etanólica e da fabricação do biodiesel (mistura complexa de ésteres metanólicos de ácidos graxos de cadeia longa, provenientes de triglicérides extraídos, sobretudo, de oleaginosas).

O **manitol** é um poliálcool usado como adoçante de baixa caloria, obtido por fermentação intermediada pela levedura *Candida magnoliae*. O mercado mundial para este produto é da ordem de US\$ 100 × 10⁶.

O **xilitol** é um poliálcool usado como componente de formulações alimentícias, geralmente associado como adoçante de baixa caloria e como estimulador das papilas gustativas para conferir, quando desejado pelo fabricante, sensação de frescor ao alimento processado. Atualmente, suas proprieda-

des anticariogênicas e farmacológicas estão sendo estudadas, prevenendo-se, também, uso na indústria farmacêutica. O xilitol comercializado é produzido exclusivamente por síntese química, a partir da redução catalítica da xilose presente em hidrolisados celulósicos. Porém, já está bem demonstrada a possibilidade de obtê-lo por fermentação com *Candida guilliermondii*, a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (CANILHA et al., 2008), assim como por processo bienzimático (uso acoplado da glicose 6-fosfatodesidrogenase e da xilose redutase) (TOMOTANI et al., 2008; TOMOTANI et al., 2009; TOMOTANI et al., 2010).

F) Polímeros: Os principais polímeros de origem microbiana, que apresentam interesse comercial, são os polissacarídeos. Entre eles, são destacados aqui os de maior expressão mercadológica.

Goma xantana, obtida da *Xanthomonas campestris*, muito usada como espessante em formulações alimentícias e farmacêuticas.

Dextrana, que é obtida do *Leuconostoc mesenteroides* e usada na área farmacêutica, como substituto do plasma sanguíneo humano e como princípio ativo antianemia na forma de dextranato ferroso.

Pululana, fitocoloides, sendo que os mais conhecidos são os de origem algal, ou seja, alginatos, ágar e caragenatos. A produção mundial anual gira em torno de 7,5 milhões de toneladas, envolvendo cifras da ordem de US\$ 6 × 10⁹. Ressalta-se que a biomassa formada, apenas, por microalgas – aquela da qual não foram extraídos os polissacarídeos – é *per se* um produto comercial de interesse, haja vista o mercado movimentar cifras da ordem de US\$ 1,25 × 10⁹ para uma produção mundial anual média de cerca de 5 mil toneladas (DEMAIN, 2007).

Politrimetileno tereftalato (3GT poliéster) uma biofibra resultante da polimerização do ácido tereftálico com o 1,3-propanodiol, sendo este último obtido da conversão do amido pela *Escherichia coli* geneticamente modificada.

1.5.2.2.2 Metabólitos secundários

São destacados, apenas, os principais metabólitos secundários de interesse comercial.

A) Antibióticos: Inegavelmente, são os mais famosos entre os metabólitos secundários. Constituem um grupo heterogêneo de moléculas com atividade biológica, tendo as mais diferentes estruturas mole-

culares e massas molares (por exemplo, cicloserina 102Da, bacilisina 270Da e nisina 2500Da), assim como mecanismos de ação amplamente variáveis. Pode-se afirmar que, com o amplo leque de antibióticos disponíveis no momento, é possível atacar e destruir, praticamente, quase todas as vias metabólicas dos micro-organismos patogênicos, como, por exemplo, a biossíntese de RNA, DNA e proteínas, o funcionamento dos componentes de membranas (citoplasmática, das organelas intracelulares), o transporte de elétrons na cadeia respiratória, a esporulação e a germinação.

Ressalta-se que o uso intenso de antibióticos causou o surgimento de novos patógenos e/ou de micro-organismos resistentes a eles. Além disso, novas moléculas – mais potentes e seguras – são requeridas para combater tumores, vírus e parasitas. Em consequência da necessidade constante de se dispor, cada vez mais, de novas moléculas, existem, descritos na literatura, cerca de 6 mil tipos diferentes de antibióticos, dos quais em torno de 160 são comercializados. Cita-se, como curiosidade, que existem espécies microbianas capazes de produzir dezenas de moléculas antibióticas. Por exemplo, cepas do *Streptomyces hygroscopicus*, do *Streptomyces griseus* e do *Bacillus subtilis*, que produzem, respectivamente, em torno de 200, 40 e 60 antibióticos diferentes.

O mercado mundial de antibióticos envolve cifras da ordem de US\$ 55×10^9 , sendo 62% de antibacterianos, 13% de imunoglobulinas e vacinas, 12% de antivirais anti-HIV, 7% antifúngicos e 6% antivirais em geral. Somente para antibióticos obtidos de cepas do gênero *Streptomyces*, o mercado mundial é da ordem de US\$ 25×10^9 (DEMAIN, 2007).

Entre os antibióticos individuais, cuja vendagem supera a marca do bilhão de dólares, citam-se a augmentina – combinação da amoxicilina com o ácido clavulônico, sendo, este último, um potente inibidor da β -lactamase bacteriana e que é obtido do *Streptomyces clavuligerus* (VIANA et al., 2010). Finalmente, merecem lembrança os chamados antibióticos semissintéticos, resultantes de modificações químicas introduzidas na molécula – quer por síntese química quer enzimática –, originalmente obtida da fermentação. Por exemplo, da produção anual total de penicilina G e V, que é da ordem de 60 mil toneladas, mais de 50% é direcionada para a produção do 6-APA (ácido 6-aminopenicilânico), que, por sua vez, serve de matéria-prima para a obtenção das penicilinas semissintéticas (amoxicilina, ampilina, entre muitas outras) e da produção anual

total de eritromicina, somente 25% são destinados para uso antibiótico direto, sendo o restante dirigido para a produção de eritromicinas semissintéticas (azitromicina, claritromicina e roxitromicina).

- B) Agentes antitumorais:** São fármacos obtidos, sobretudo, de actinomicetos, sendo os mais conhecidos a mitomicina C, bleomicina, daunorubicina e doxorubicina. No entanto, há um agente antitumoral – o Taxol® (usado no tratamento dos cânceres de mama e ovariano) – que é obtido por meio da cultura de células vegetais, cuja vendagem alcança valores da ordem de US\$ $1,6 \times 10^9$ (DEMAIN, 2007).
- C) Agentes inibidores:** Neste grupo, enquadram-se fármacos de baixa massa molar e obtidos de micro-organismos, que atuam como inibidores de enzimas naturalmente presentes no organismo. Um importante exemplo da terapia contemporânea relaciona-se às estatinas – potentes inibidores competitivos da enzima hepática 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase –, que são os princípios ativos de escolha para reduzir a hipercolesterolemia humana. Do fungo *A. terreus* obteve-se uma estatina batizada com o nome de lovastatina. Essa molécula foi modificada quimicamente, resultando na simvastatina (Zocor®) e, com base em sua estrutura molecular, foi obtida por síntese química a atorvastatina (Lipitor®), a qual parece ser a estatina mais prescrita pelos médicos atualmente.
- D) Produtos para uso agropecuário:** os micro-organismos também constituem fontes de moléculas biologicamente ativas para uso animal e vegetal. Os produtos usados nessa área podem ser divididos, conforme o tipo de problema a ser combatido, em sete grupos: os **biopesticidas**, que incluem fungicidas como a kasugamycina e as polioxinas; os **bioinseticidas**, por exemplo, nikkomicina e *Bacillus thuringiensis*; os **bioherbicidas, antihelmintos**, como a ivermectina e a doramectina, agentes obtidos de espécies do gênero *Streptomyces*; os **coccidiostáticos**, como a salinomicina, obtida de espécies do gênero *Streptomyces*; os **hormônios vegetais**, como as giberelinas – hormônios que regulam a floração, a germinação da semente e o alongamento do caule; e **agentes anabólicos para animais de interesse econômico**.

A indústria biotecnológica vem crescendo em ritmo acelerado, graças aos avanços sobre o conhecimento da intimidade da organização celular, baseados nas

técnicas da genômica, proteômica e da “metabolômica”. Acrescentam-se os equipamentos analíticos não invasivos (os vários tipos de microscópios e espectrômetros) cada vez mais sensíveis, que têm possibilitado desvendar as estruturas de componentes celulares e de biomoléculas, assim como dosar seus níveis intracelulares e estabelecer os correspondentes mecanismos de ação.

Lembra-se, também, do papel fundamental desempenhado pela bioinformática – embasada no desenvolvimento de conceitos matemáticos novos –, bem como da ciência da computação, a qual permite o armazenamento, a recuperação e a comparação de uma quantidade enorme de informações básicas sobre os componentes biológicos. A precisão com que os arranjos tridimensionais das estruturas dos biocomponentes são descritos, têm possibilitado desenhar novas moléculas, visando à interação com alvos específicos – como, por exemplo, receptores, canais iônicos ou carreadores de membrana.

À medida que novos genomas forem sendo sequenciados, células de organismos localizados em qualquer nível da escala evolutiva, poderão ser submetidas a técnicas pontuais de mutagênese e/ou de recombinação, transformando-se em fontes altamente produtoras de bioprodutos.

1.6 ASPECTOS SOCIAIS DA BIOTECNOLOGIA

Na Seção 1.5, “O bionegócio”, ficou claro que a participação governamental no apoio à pesquisa básica feita nas universidades e do capital e, por extensão, do capitalista são fundamentais para que a biotecnologia vingue econômica e comercialmente. No entanto, a biotecnologia tem como objetivos identificar, desenvolver, fabricar, controlar e comercializar produtos por meio da manipulação generalizada de seres vivos. Estes são transformados em fontes de bioprodutos com alta produtividade, além de serem usados como cobaias (para controlar, avaliar a toxicidade e a biodisponibilidade, estabelecer a posologia adequada e padronizar a atividade biológica dos bioprodutos) e como usuários finais.

Do exposto, não há dúvidas de que duas vertentes antagônicas – lucro *versus* segurança e garantia da dignidade dos seres vivos – permeiam a interação biotecnologia-sociedade. Este binômio, por sua vez, deve ser balanceado por meio da aplicação dos princípios da ética.

A ética, entendida como uma reflexão filosófica sobre a moralidade pode ser dividida em três domínios, a saber, a **metaética**, que trata de questões acerca da natureza da própria ética, como, por exemplo, se ela é ou não uma ciência; a **ética normativa**, que estabelece um padrão sobre aquilo que efetivamente é bom ou mau, correto ou incorreto; e a **ética prática**, que procura aplicar o estabelecido pela ética normativa às questões morais cotidianas (DALL’AGNOL, 2005).

A ética aplicada especificamente à biotecnologia é chamada **bioética** – ou seja, ética da vida. Por conseguinte, a bioética pode ser definida como o estudo sistemático da conduta humana no âmbito das ciências da vida e da saúde, analisadas à luz dos valores e princípios morais (DALL’AGNOL, 2005).

A bioética – como uma derivação da ética normativa – se adensou a partir de 1971, com base no pressuposto de que seria uma tentativa de pensar a vida como um todo, sem separá-la da ciência e da tecnologia (DALL’AGNOL, 2005).

Para tanto, segundo Dall’Agnol (2005), os problemas bioéticos devem ser debatidos a partir de quatro princípios básicos: da **autonomia**, que corresponde à capacidade para deliberar, ou seja, calcular os meios necessários para atingir um fim e escolher, permitindo ao ser agir livremente; da **não maleficência**, que pressupõe não causar danos ao organismo; da **beneficência**, que implica agir para o bem dos outros; e da **justiça**. Este último, por certo, é o mais complexo dos quatro princípios, haja vista incorporar intrinsecamente questões políticas e sociais. Grosso modo, se distinguem dois tipos de justiça, a saber, a formal – que exige tratar as pessoas iguais de forma igualitária e os desiguais diferentemente – e a material, que considera uma distribuição justa dar a cada um de modo igual; a cada um, segundo sua necessidade; a cada um, segundo o mérito; a cada um, segundo a contribuição individual (por exemplo, a distribuição de dividendos aos investidores de uma empresa biotecnológica em fase de consolidação final, conforme o capital inicial que cada um aplicou); a cada um segundo as “leis” do mercado, e assim por diante.

A este quadro, deve ser acrescido o fato de que conceitos, comportamentos e necessidades mudam com o passar do tempo. Por exemplo, a clonagem reprodutiva humana. É impensável, nos dias atuais, e, certamente, para os próximos séculos, realizar a clonagem para fins egocêntricos (eugenia, perpetuação da estirpe genealógica etc.) ou para produzir clones a serem

utilizados como fontes de órgãos compatíveis para transplante. Acrescenta-se, também, que a tecnologia para obter clones humanos perfeitos, ainda, está por ser desenvolvida.

Todavia, a clonagem reprodutiva poderá se tornar a tábua da salvação da humanidade em um futuro distante, quando a exaustão do planeta se consumir, bem como o esfacelamento do sistema solar, alguns bilhões de anos depois, obrigando o homem a se aventurar pelo universo. Não é segredo que o físico do homem é frágil demais para enfrentar as adversidades do espaço sideral (oscilações térmicas extremas; falta de oxigênio, água e víveres; radiações intensas etc.), e que, em consequência, seu organismo deverá ser fortalecido. Por isso, o melhoramento do genoma acoplado à clonagem reprodutiva garantirá, provavelmente, a sobrevivência de nossa espécie.

Dada a complexidade da temática concernente à interação da biotecnologia com a sociedade, focalizar-se-á, de modo breve, os aspectos sobre a privacidade genética e dos prognósticos laboratoriais, o uso da clonagem, das células-tronco, de mamíferos – como cobaias para experimentação – e de bioprodutos (com base nos exemplos da vacina contra o rotavírus humano e dos fármacos étnicos).

1.6.1 Sobre o uso dos bioprodutos

As vacinas são, de longe, os biofármacos de maior uso na profilaxia de doenças microbianas e viróticas transmissíveis entre os seres vivos (homem–homem ou animal–homem). Contam-se às dezenas os vírus capazes de causar danos sérios à saúde humana e, o que é pior, sem limites de fronteiras.

Há vírus causadores de epidemias altamente mortais, como o HIV, o rotavírus e a gripe, que em 2003 ceifaram, respectivamente, cerca de 7 milhões, 700 mil e 200 mil vidas (GESSAIN; MANUGUERRA, 2008). No entanto, há vírus como o ebola, a Sars (síndrome respiratória aguda severa), a gripe aviária e a varíola do macaco, que têm causado poucas mortes ao redor do mundo – menos de 1.000 mortes em 2003 (GESSAIN; MANUGUERRA, 2008). –, mas que apresentam um potencial epidêmico devastador, se em um dado momento, sofrerem mutações, que aumentem a virulência e o índice de transmissibilidade.

Entre os vírus conhecidos, o rotavírus, em particular, tem estimulado os cientistas a desenvolverem uma vacina para imunizar as crianças de 0 a 5 anos, porque possui alta transmissibilidade e causa uma diarreia aguda

muito forte, que, se não tratada a tempo, leva a óbito. O rotavírus – é um vírus constituído por 11 moléculas de RNA-dupla fita – cujo ciclo de vida, em linhas gerais, segue o esquema: o vírus entra pela boca da criança e acaba se fixando na superfície das células do epitélio intestinal. A seguir, o genoma viral entra nas células epiteliais e, no citoplasma, se multiplica milhares de vezes, eliminando para o lúmen intestinal toxinas e fluidos das células mortas. As novas partículas virais invadem outras células, repetindo o ciclo inúmeras vezes. Ao final, o lúmen intestinal fica repleto de células epiteliais mortas, fluidos gástricos e teciduais, que, ao serem expelidos do corpo, causam intensa diarreia. Esse quadro, se não for estancado, leva a uma forte desidratação, seguida de choque, culminando com o óbito do paciente (GLASS, 2006).

Dada a amplitude e a patogenicidade dessa enfermidade, decidiu-se desenvolver uma vacina contra o rotavírus. Após alguns anos de pesquisa, foi aprovada pelo FDA, em 1991, a vacina de nome Rotashield®, produzida e comercializada pela empresa farmacêutica Ayerst. A princípio, a vacina – administrada por via oral – mostrou-se eficaz na imunização. Porém, com o passar do tempo, observou-se que, entre 11 mil crianças vacinadas, uma apresentava o intestino dobrado em um determinado ponto – a esse efeito dá-se o nome de intussuscepção – e, se esse problema não fosse tratado a tempo, resultaria em óbito. Levando-se em conta o princípio bioético da não maleficência, a vacina foi retirada do mercado.

As autoridades sanitárias fundamentaram essa atitude, segundo os argumentos:

- a) Em um país desenvolvido no qual são raras as mortes causadas pela diarreia infantil aguda (DIA) – naturalmente, em virtude da excelência dos hospitais – não é admissível pôr em risco uma vida, mesmo que na proporção 1:11.000. Lembra-se que, nesses países, a vacinação teria como objetivo único a redução de custos decorrentes de hospitalização.
- b) Mesmo em países subdesenvolvidos, nos quais a DIA causa uma morte em 200 crianças enfermas, a administração de uma vacina, que sabidamente causará uma morte em 11 mil, não é um procedimento moral e ético, porque uma coisa é a criança morrer por acaso, mesmo que em decorrência de péssimas condições hospitalares, outra é morrer por meio de uma droga propositalmente administrada e produzida por uma empresa farmacêutica de renome.

- c) Independentemente da razão custo/benefício, seria inaceitável administrar em um país subdesenvolvido um produto banido em país rico. Segundo Glass (2006), assim se manifestou o ministro da saúde da Índia durante reunião promovida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1999:

Eu sei que essa vacina salvaria 100 mil crianças no meu país, mas quando surgisse o primeiro caso de bloqueio intestinal, eu não seria perdoado por permitir que uma vacina retirada do mercado norte-americano fosse usada na Índia.

Diante do impasse, os cientistas se debruçaram sobre as informações disponíveis, sendo que uma delas, em particular, chamou atenção. Se as crianças que contraíam o vírus naturalmente não tinham incidência de intussuscepção significativa em relação a outras crianças, então, por que a vacinação aumentava esse risco? Estudos, a seguir, comprovaram que o problema estava no fato de ter sido usado um rotavírus atenuado de macaco para produzir a vacina, e que, quando se utilizava o rotavírus de bovinos, tal problema não ocorria. Na esteira dessa descoberta surgiram, no mercado, duas novas vacinas, o Rotarix[®] (produzido pela GlaxoSmith Kline) e o Rotateq[®] (produzido pela Merck). O Rotarix[®] consiste de uma única cepa de rotavírus humano atenuado, no qual as proteínas naturais de fixação do capsídeo viral foram substituídas por variantes capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro. O Rotateq[®] consiste de uma mistura de cinco vírus geneticamente distintos. Estes são produzidos pela combinação de dez genes de rotavírus bovino com um de cinco genes de rotavírus humano, gerando vírus predominantemente bovinos com uma proteína antigênica humana na superfície. Esse arranjo, leva a uma vacina pentavalente, capaz de imunizar o paciente contra as principais variedades de vírus humanos, sem que haja perigo de a doença se manifestar, porque a natureza dos vírus modificados é essencialmente bovina, portanto, inócua ao ser humano (GLASS, 2006).

Com os avanços da genômica, em um futuro próximo, será possível personalizar a terapia medicamentosa, levando em conta a constituição genética particular do paciente. Essa abordagem, batizada de farmacogenômica, promete reduzir o custo e aumentar a segurança e eficácia de novos tratamentos.

No entanto, na esteira da ideia da futura medicina personalizada, alguns fabricantes de medicamentos têm demonstrado interesse em produzir e comercializar

remédios, focando as diferentes etnias humanas. A história dessa abordagem – os remédios étnicos – teve início com a aprovação pelo FDA, em 2005, do BiDil[®] (usado no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva de afro-americanos). O BiDil[®] é uma combinação dos princípios ativos hidralazina, que inibe a formação de radicais superóxidos, que dificultam o relaxamento dos vasos sanguíneos, e dinitrato de isossorbida, que estimula a formação de NO₂, o qual, por sua vez, estimula o relaxamento dos vasos, (KAHN, 2007). Segundo Kahn (2007), teme-se que a ideia de associar ao BiDil o rótulo de droga étnica, resulte da tentativa de revitalizar dois princípios ativos já superados por outros, como o enalapril (inibidor da enzima conversora da angiotensina). Acrescenta-se que o medicamento não pode ser considerado como droga farmacogenômica, porque seu mecanismo de ação não foi associado a nenhum gene específico, resultando, como consequência, ser inapropriado associá-lo a um grupo étnico particular.

Com base na história do BiDil, várias empresas, nos últimos tempos, vêm tentando revitalizar princípios ativos em fase de decadência comercial ou simplesmente aumentar suas vendas, alegando maior eficiência, quando direcionados para etnias específicas. Por exemplo, os medicamentos Iressa[®] (receitado para combater o câncer pulmonar), Crestor[®] (um redutor de colesterol) e a AidVax (vacina contra a AIDS) seriam mais eficientes em asiáticos; negros, asiáticos e hispânicos; e, negros e asiáticos, respectivamente (KAHN, 2007).

Embora o BiDil não seja de todo mal do ponto de vista terapêutico, haja vista sua comprovada capacidade de proteger a internação e morte de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, a aprovação da droga como específica para uma dada etnia, cria um precedente de imprudência. Tal conduta não se coaduna com o princípio bioético da justiça. Este refuta, claramente, o ato de estabelecer critérios, nem de distribuir bens, nem para o oferecimento de oportunidades, sejam educacionais ou de acesso à saúde, segundo o gênero, a etnia, a condição física, a nacionalidade, o *status* social etc. (DALLAGNOL, 2005).

1.6.2 Sobre a privacidade genética e do prognóstico laboratorial

O programa sobre o sequenciamento do genoma humano, após a publicação de seu rascunho, ensejou profunda reflexão sobre os limites da privacidade genética do indivíduo e do que seria (a invenção, no caso) ou não (a descoberta, no caso) patenteável. É evidente

que esses tópicos envolvem diretamente dois princípios bioéticos: a autonomia e a justiça. O indivíduo deve ser autônomo para decidir sobre como as informações de seu genoma e/ou resultados de prognósticos laboratoriais devem ser manipuladas. O princípio da justiça desautoriza qualquer tipo de segregação do indivíduo, baseada nas informações genéticas e de prognósticos de laboratório. Esses princípios também devem ser invocados no que concerne à patenteabilidade das descobertas biológicas, como a sequência de nucleotídeos de um gene ou de marcadores gênicos e das rotas de expressão gênica (transcrição em RNA e a tradução em proteína). A distinção clara entre descoberta – que engloba qualquer conhecimento adquirido sobre fenômenos e componentes biológicos naturais – e invenção – modificações claras e revestidas de utilidade de componentes biológicos, incluído o próprio ser vivo, executadas em laboratório – evitará a infração dos princípios bioéticos aludidos.

Evidentemente, este assunto, ainda, será motivo de intensos debates, já que muitos aspectos subjetivos – tais como religião, tradição cultural, grau de moralidade de uma comunidade, interesses econômicos e/ou políticos, arcabouço legal do país – deverão ser acomodados pelos legisladores, que, por sua vez, deverão contar com o apoio e a boa vontade dos cientistas. Stix (2006), ao abordar a questão das patentes de elementos naturais (genes, animais quiméricos, micro-organismos, receptores proteicos, entre outros), propõe discutir meios para responder adequadamente às questões: Como alguém pode patentear genes? Como se podem obter direitos de propriedade sobre um tipo de rato ou peixe se foi a natureza, não os humanos, que “inventou” seus genes? O que acontece com a liberdade da pesquisa científica, quando metade de todos os genes de câncer está patenteada? Isso significa que os pesquisadores precisam passar mais tempo lutando nos tribunais do que procurando por uma cura? Enfim, onde acaba o patenteamento da vida?

Tomar-se-á – em termos sucintos – um exemplo discutido por Stix (2006), para dar a ideia da complexidade desta questão. Em 1988, a Universidade de Harvard conseguiu, com o órgão de patentes dos Estados Unidos, patentear o OncoMouse, um camundongo geneticamente modificado, portador de um gene que o predispunha a contrair câncer. O novo roedor se mostrou uma ferramenta valiosa para a pesquisa da doença. A justificativa da patente se baseou no fato de que a adição do oncogene significou que esse camundongo tinha sido “inventado” por um humano. No fundo, a decisão sobre a patente levou em conta a utilidade do ser modificado

e, por extensão, embutiu o conceito ético da beneficência, ou seja, o uso de modelo animal para estudar uma doença gravíssima em humanos, objetivando a produção futura de medicamentos eficazes para combatê-la. No entanto, tal interpretação não foi acolhida pelo Canadá e nem pela Comunidade Europeia, que reconheceram somente aquela linhagem de camundongo como objeto da patente. Esta interpretação traz à baila dois aspectos, que os escritórios de patentes tendem a considerar na avaliação do pedido. Um deles diz respeito ao fato de que, em biotecnologia, o pré-requisito “avaliação da utilidade do invento”, deve preceder à inovação embutida no invento, ao contrário, portanto, do que é aceito em outras áreas. O outro é não considerar uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, um gene isolado e clonado) ou qualquer outro material genético como uma mera substância química. Acrescenta-se que “bioinformações”, ou seja, informações biológicas constantes de bases de dados, também tendem a não receber a exclusividade da patente. Por exemplo, há alguns anos, empresas tentaram obter patentes de sequências de nucleotídeos, capazes de localizar um gene completo em um cromossomo – as chamadas “etiquetas de sequência expressa” ou ESTs (na sigla em inglês) – alegando serem compostos químicos. Porém, a estrutura dessas etiquetas era deduzida a partir de bancos de dados disponíveis nas redes de softwares biológicos de acesso comum. Ou seja, ao se patentear as ESTs, estava-se patenteando informações, meramente. No entanto, permitir que a informação fosse patenteada tenderia a minar um ato de equilíbrio, que é uma das fundações de todo o sistema de patentes. Ou seja, durante a vigência da patente, seu detentor – caso queira ganhar dinheiro com ela – deve divulgá-la para estimular o aparecimento de investidores interessados. Mas, como poderia funcionar essa compensação se a informação a ser divulgada para outros é a própria informação patenteada? (STIX, 2006).

Quando se adentra no campo da genômica, deve-se ter claro que os dados genéticos permitem, apenas, prever com grande margem de insegurança um esboço da saúde do indivíduo no futuro. Os médicos, quando muito, poderão prever propensões a certas enfermidades (por exemplo, de natureza cardiovascular ou pulmonar) sem a presença dos sintomas característicos da doença. No entanto, se a privacidade não for garantida ao indivíduo e as informações se tornarem públicas, então, possíveis doenças futuras poderão ser tidas como preexistentes – por exemplo, pelo empregador ou seguradoras de planos de saúde –, podendo acarretar a dispensa da empresa e o pagamento de prêmio maior para fazer jus ao plano de saúde.

Todavia, é inegável que, a precisão do diagnóstico de futuras doenças, cresce, à medida que um número maior de informações seja disponibilizada aos médicos. Sucede, contudo, que a quantidade de dados – mesmo que seja para um só indivíduo – é normalmente grande, exigindo recursos da informática para armazená-los e manipulá-los. Aqui, surge a grande questão de como garantir a privacidade da pessoa, se, pelos ditames da ciência da computação, os dados relacionados à mesma pessoa devem ser mantidos agrupados em pastas, que devem ser simultaneamente protegidas e acessadas, localizadas, muitas vezes, em provedores diferentes. Além disso, o trânsito obrigatório das informações entre provedores se dá de forma global e integrada, debilitando a garantia de privacidade ao indivíduo.

Em que pese à dificuldade de se responder às questões: o que seria um defeito genético? Que variantes gênicas serão consideradas normais ou anormais? Qual é o limite entre o normal e o anormal? Quem definirá o limite entre normalidade e anormalidade? Uma saída para defender a privacidade do indivíduo deve ser encontrada, mais cedo ou mais tarde. Um caminho tentador, segundo Rothstein (2008), seria particionar as informações individuais, de modo a impedir que todas elas circulem pela rede ao mesmo tempo e que sejam acessadas em partes. Ou seja, somente ser trazidas à baila as informações necessárias, na quantidade suficiente para se atingir um objetivo específico. Exemplificando, um médico ortopedista não precisa saber se a paciente tem predisposição ao câncer de mama, para tratar de uma torção de tornozelo; assim como, o dentista não precisa saber sobre os casos de mal de Huntington na família do paciente, para lhe fazer uma obturação ou tratamento de canal.

A saída particionada de informações requer programas de software capazes de rastrear registros eletrônicos e selecionar apenas os dados relativos a um pedido específico. Mas essa ferramenta exige o uso de “critério de acesso contextual” – algoritmos do software especificando que, para uma pesquisa do tipo X, requerem apenas os dados A, B e C. Por exemplo, o critério de acesso contextual divulgaria a uma seguradora apenas a informação pertinente ao risco de morte.

Essa tecnologia é possível, mas ainda não está disponível. Destaca-se que a demanda comercial, sozinha, consequência do evidente desinteresse por parte das companhias seguradoras e de todas outras empresas – independente do ramo de negócios tratados – não forneceria incentivos suficientes para desenvolvê-la. Talvez deva ser imposta por via legal (ROTHSTEIN, 2008). Contudo, os

legisladores devem se conscientizar de que proteger a privacidade não é uma tarefa fácil e nem barata. Será um grande desafio para os legisladores balancearem quais informações devem ou não ser autorizadas.

É natural que um paciente tenha interesse em que seu prontuário de saúde esteja totalmente acessível ao seu médico, a fim de que este possa prescrever o melhor tratamento possível. Mas, se o médico o estiver atendendo via plano de saúde, como garantir que o prontuário não acabe no provedor da seguradora? E, digamos que, no futuro, o cliente desejasse trocar de seguradora, esta não poderia usar as informações do prontuário para convencê-lo a não mudar? Bastaria ela ameaçar de transferir o conteúdo do prontuário para a outra, que – sabendo de enfermidades passadas, presentes, e tendo condições para deduzir até as futuras – poderia cobrar um prêmio maior ou, mesmo, rejeitar a pessoa como cliente. Enfim, é essencial e desafiador decidir que indivíduos e entidades têm o direito a qual informação e com qual finalidade (ROTHSTEIN, 2008).

A problemática discutida terá maior ênfase quando o chamado Projeto Genoma 1000¹⁰ estiver concluído daqui a três ou cinco anos (ROTHSTEIN, 2008; <www.1000genomes.org>.).

A questão da privacidade é um assunto tão crucial, que até testes laboratoriais clínicos de prognóstico e/ou de diagnóstico podem ensejar discussão no âmbito da ética e da moral.

Seja o caso dos testes de detecção de autoanticorpos, que poderiam permitir prognosticar riscos (projetando a probabilidade de uma pessoa desenvolver certa doença para que ela possa receber um tratamento preventivo), prever quando os sintomas da possível doença se tornarão detectáveis, projetar a evolução da doença (prevendo a gravidade e o ritmo de progressão) e simplificar ensaios clínicos em humanos (NOTKINS, 2007).

Atualmente são conhecidas cerca de 40 doenças autoimunes, entre as quais citam-se o Mal de Addison, a Síndrome Antifosfolípídica, a Doença Celíaca, a Esclerose Múltipla, a Artrite Reumatoide e o Lupus Eritematoso.

10 Consórcio de pesquisa internacional, iniciado em 2008, com o intuito de criar um mapa do genoma humano cinco vezes mais detalhado que o já produzido pelo concluído Projeto Internacional do Genoma Humano, baseando-se na análise do genoma de mil pessoas diferentes, retiradas de populações ao redor do mundo.

O Mal de Addison provoca um transtorno das adrenais, causando fraqueza, perda de peso e baixa pressão arterial; a detecção de autoanticorpos contra o tecido adrenal e a enzima 21-hidroxilase são altamente preditivas. A Síndrome Antifosfolípídica provoca perda da gravidez, com formação de coágulos em vasos sanguíneos. A Doença Celíaca é um transtorno digestivo causado pelo glúten, sendo preditiva a identificação de autoanticorpos contra a transglutaminase tissular. A Esclerose Múltipla constitui um quadro neurológico que causa perda gradual de movimento; a detecção de autoanticorpos contra proteínas do revestimento de mielina é altamente preditiva, nesta patologia. A Artrite Reumatoide é uma inflamação crônica das articulações, sendo a detecção de autoanticorpos contra a citrulina, um sinal futuro para o surgimento dessa patologia no portador. O Lupus Eritematoso afeta indiscriminadamente vários órgãos, como articulações, rins, pele etc.

A relevância de se dispor de testes do gênero, relacionar-se-ia à possibilidade de se aconselhar a pessoa a tomar atitudes preventivas ao longo da vida, as quais assegurariam a não ocorrência ou – na pior das hipóteses – o alívio contra os sintomas da enfermidade. Contudo, antes que os autoanticorpos sejam amplamente usados para prever o risco de doenças futuras, muitas questões éticas e práticas difíceis, devem ser consideradas: Os médicos deveriam fazer exames para doenças que não têm tratamento preventivo nem cura? Qual a melhor maneira de garantir que os pacientes compreendam que um teste positivo não significa que a doença se desenvolverá com certeza, mas que há uma probabilidade de risco? Como minimizar os riscos de testes com resultados falso-positivos ou falso-negativos para que alguns pacientes não fiquem necessariamente apavorados ou equivocadamente tranquilizados? O custo da triagem de rotina é justificado pelo número de pessoas que seriam identificadas como pacientes de alto risco e poderiam se beneficiar de tratamento precoce? Para doenças autoimunes que ocorrem em família, os membros da família dos indivíduos afetados devem ser testados? Será mais fácil viver com a preocupação com um resultado indicativo de alto risco do que com a ansiedade de não saber? Um teste positivo poderá levar à discriminação por parte dos empregadores, empresas de seguro-saúde ou da sociedade em geral? (NOTKINS, 2007). Infelizmente, não há respostas simples para as indagações lançadas. Segundo Rothstein (2008), o erro mais comum é fazer o teste e aguardar os resultados antes de decidir como proceder. Por isso, o melhor conselho seria consultar um especialista e refletir profundamente sobre as possíveis consequências.

1.6.3 Sobre células-tronco e clonagem

Anteriormente, discorreu-se sobre os dois tipos básicos de células-tronco, as tecido-específicas e as embrionárias. A questão básica surge do modo como são obtidas. As tecido-específicas são simplesmente extraídas dos tecidos diferenciados do corpo. As embrionárias, no entanto, devem ser extraídas de um componente biológico específico, que é o embrião, o qual, ao final do procedimento, acaba sendo destruído. É neste ponto que a discussão de cunho ético, moral e filosófico se estabelece. Haverá muita polêmica, ainda, até que o conservadorismo religioso e o dinamismo inovador da ciência cheguem a um consenso sobre como adequar o aspecto ético e moral na utilização dessas células.

Essa discussão surgiu em 1998, quando pesquisadores informaram ao mundo que tinham desenvolvido linhas de células-tronco embrionárias humanas capazes de existir indefinidamente em placas de laboratório e de dar origem a qualquer tipo de célula humana (KREUZER; MASSEY, 2002).

Na época, já era prática comum a reprodução assistida (iniciada com o nascimento de Louise Brown, 20 anos antes), que implicava manipular-se blastocistos (fase do desenvolvimento embrionário com número limitado de células-tronco) *in vitro*, para posterior inserção no útero da pessoa receptora. Porém, o cultivo de tais células em placas de petri, por tempo ilimitado, catalisou a controvérsia sobre o uso do blastocisto, se, apenas, para a fecundação assistida e/ou como fonte de células-tronco embrionárias. Para polarizar, ainda mais, o debate, houve quem propusesse responder à questão: O que mais desrespeitaria a vida: descartar pura e simplesmente os blastocistos não implantados ou destruí-los para a retirada de células-tronco? Caso se concluísse que ambos os procedimentos não são éticos, então dever-se-ia responder – de uma vez por todas – a questão: A fecundação *in vitro* (dita, assistida) deve ser proibida ou todos os blastocistos implantados? Parece que a solução desta querela – como atesta a decisão do Superior Tribunal Federal do Brasil, tomada em 2008 – pende para o uso de blastocistos, não aproveitados para a fertilização, como fontes de linhagens de células-tronco embrionárias.

A biotecnologia moderna traz à baila outro problema polêmico, que se refere à clonagem de seres vivos.

A clonagem pode ser definida como o processo de propagação de clones. O clone, por sua vez, constitui uma

coleção de indivíduos geneticamente idênticos, oriundos de um único progenitor. Podem ser distinguidos três tipos básicos de clonagem: a clonagem molecular, a celular e a clonagem de organismo multicelular. A clonagem molecular engloba a clonagem de um ou mais genes ou um pedaço longo de DNA; basicamente, é a própria técnica do DNA-recombinante, em que o “clone” é um organismo recombinante e o gene/pedaço de DNA é uma molécula recombinante. Na clonagem celular, constituem-se linhagens de células como os anticorpos monoclonais. Normalmente, quando se refere simplesmente a clonagem, pressupõe-se a clonagem de organismo multicelular.

A clonagem vegetal – via enxertos de partes de plantas – não é vista como problema, mas a clonagem de animais é a que causa vendaval de emoções no seio da sociedade humana. Na clonagem animal, não são transferidos genes em separado, mas o núcleo completo de uma célula somática para uma germinativa anucleada, reativando, como consequência, os genes responsáveis pela proliferação celular.

A clonagem de animais efetivou-se em fevereiro de 1997, quando foi comunicado ao mundo o nascimento de uma ovelha clonada, batizada com o nome de Dolly. O procedimento de clonagem consistiu em se pegar um óvulo de ovelha – cujo núcleo fora removido previamente – e introduzir, nele, o núcleo de uma célula somática (no caso uma célula da mama de outra ovelha). O óvulo com o núcleo foi colocado em contato com tecido de oviduto por seis dias. Depois, foi inserido no útero de uma terceira ovelha. A Dolly nasceu cinco meses após o implante do óvulo, de acordo com o período de gestação normal das ovelhas. Lembra-se que, desde os anos 1980, células embrionárias vêm servindo como fonte de material genético para clonagem de animais de interesse econômico (vacas, bois, cabras, ovelhas etc.). No entanto, a Dolly foi o primeiro mamífero na face da terra a ser clonado a partir de uma célula somática de um animal adulto. Ou seja, os cientistas conseguiram “desespecializar” um material genético de células de tecido diferenciado, tornando-o novamente do tipo embrionário e capaz de gerar um novo organismo. Ao se proceder dessa forma, seria o clone uma cópia exata do progenitor?

Difícilmente.

Primeiro, porque o modo de criação do clone não seria igual ao do progenitor, já que a formação de um ser obedece à relação: NATUREZA + CRIAÇÃO = ORGANISMO (KREUZER; MASSEY, 2002). Segundo, o DNA mitocondrial pertence ao organismo doador do óvulo no qual é inserido o núcleo da célula somática. Esta última

objeção poderia ser removida, no caso em que o óvulo usado fosse da própria fonte da célula somática, da qual o núcleo foi retirado. Mas, mesmo assim, o modo de criação introduziria diferenças.

Deixando de lado o perigo potencial da clonagem direta de bebês (a chamada “clonagem reprodutiva”) – que, aliás, não parece ser a intenção dos cientistas, pelo menos da esmagadora maioria deles – a clonagem humana teria certo grau de aceitabilidade – e embasamento no conceito ético da beneficência – se a conduta fosse para contornar mutações no DNA mitocondrial, solucionar casos de infertilidade não resolvidos pela fertilização *in vitro* ou obter linhagens de células embrionárias em cultura para viabilizar as técnicas de terapia celular e de engenharia de tecidos. Ou seja, a ênfase seria dada à “clonagem terapêutica”.

Parece que, no debate clonagem reprodutiva *versus* clonagem terapêutica, o nó da questão não está no uso da técnica de clonagem em si, mas no seu controle. Ou seja, como delimitar a tênue fronteira entre esses dois aspectos da clonagem? Inegavelmente, o controle deve ser de cunho ético, haja vista o controle científico e tecnológico, geralmente permeados por interesses pecuniários e/ou juízos subjetivos dos cientistas, não fornecerem as salvaguardas necessárias para garantir a dignidade humana. Esta última poderia ser aviltada por meio da obtenção de zoo quimeras, nos moldes imaginados nos contos mitológicos de povos antigos.

Para finalizar esta seção, tomam-se as palavras de Garrafa (2003, p. 57),

Para que a liberdade da ciência seja preservada com responsabilidade, existem dois caminhos. O primeiro deles, por meio de legislações que devem ser construídas democraticamente pelos diferentes países no sentido da preservação de referenciais éticos estabelecidos em consonância com o progresso moral verificado nas respectivas sociedades. O segundo, a partir da construção democrática, participativa e solidária – pela Comunidade Internacional de Nações – de uma versão atualizada da “Declaração Universal dos Direitos Humanos”. Ou seja, a elaboração de uma espécie de “Estatuto da Vida”, pautado na busca afirmativa de bem-estar, saúde e felicidade e que possa servir de guia para as questões conflitivas já verificadas e para aquelas que certamente aparecerão no transcorrer dos próximos anos.

1.6.4 Sobre o uso de cobaias

Nos últimos anos, uma questão ética, que vem sendo seriamente discutida no âmbito da biotecnologia, diz respeito ao uso de animais não racionais na avaliação dos bioprodutos, quer na fase de desenvolvimento quer na fase da produção e comercialização. A cada ano, milhões de animais são sacrificados para avaliar a segurança de pesticidas, herbicidas, cosméticos, fármacos, alimentos e coadjuvantes das formulações em geral.

Por exemplo, para o lançamento de um pesticida são necessários cerca de 10 mil animais de diferentes espécies. Isto se deve à necessidade de avaliar se o produto é absorvido pela pele, se pode ser inalado, se deixa resíduos na colheita ou se pode ser ingerido. Para cada item, várias questões devem ser respondidas para indivíduos – fetos inclusive – de diferentes idades: por quanto tempo a pessoa pode ser exposta, que quantidade do produto pode absorver e como ele se distribui no organismo (GOLDBERG; HARTUNG, 2006).

Como exemplos de testes tradicionais para a avaliação dos efeitos de produtos usados em ou que podem entrar em contato com humanos, citam-se a toxicocinética, a toxicologia aplicada, a toxicidade sistêmica aguda e o LD₅₀.

O teste de toxicocinética mede a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção de substâncias químicas. Para sua aplicação, ministra-se uma substância aos animais e colhem-se sangue, urina e fezes. Então, os animais são mortos para localizar 100% do composto original e seus metabólitos no corpo. O teste de toxicologia aplicada avalia os efeitos de substâncias na pele, nos olhos e em membranas mucosas da vagina e da boca. Um composto é aplicado na membrana para averiguar vermelhidão, bolhas e irritação. Um teste muito usado para avaliar o grau de irritação de um composto é o chamado teste de Draize, que consiste em se gotear uma solução da substância em análise nos olhos de coelhos saudáveis. Esse é considerado um dos testes que causa maior sofrimento nas cobaias. O teste de toxicidade sistêmica aguda determina os efeitos da ingestão de uma substância, uma ou mais vezes, em 24 horas, observados por 14 dias. O clássico LD₅₀ consiste em administrar diferentes doses da substância a seis ou sete grupos de animais para determinar a dosagem média necessária para matar metade do grupo (GOLDBERG; HARTUNG, 2006).

Do exposto, fica claro que os aspectos éticos da não maleficência – considerando o ângulo das cobaias – e o da beneficência (considerando o lado dos humanos) se

contrapõem. Porém, como acertar de que um dado bioproducto é seguro para uso humano sem que seus efeitos (toxicológicos, iatrogênicos, farmacológicos etc.) sejam analisados em outros seres vivos?

A solução consiste em se procurar metodologias alternativas às clássicas, que sejam tão ou mais eficientes na aferição das propriedades da substância, de custo não excessivo e que forneçam resultados consistentes e reprodutíveis.

Segundo Goldberg e Hartung (2006, p. 51), algumas metodologias de substituição seriam:

- a) Analisar o estado normal e alterado de órgãos de animais por meio da observação de imagens obtidas com raios X, ressonância nuclear magnética e/ou tomografia por emissão de pósitrons. Essas técnicas permitem reduzir em até 80% o número de animais necessários para se obter dados conclusivos sobre os efeitos de uma droga;
- b) Interromper um teste doloroso para a cobaia, tão logo dados relevantes tenham sido obtidos. Por exemplo, seja o teste de uma vacina, digamos, contra a raiva. Se a cobaia vacinada e infectada com o vírus da doença, começar a girar sem controle é sinal de que a vacina falhou. Nesse caso, sacrifica-se o animal para livrá-lo de horas de agonia. Um aprimoramento do teste seria avaliar o nível sanguíneo de anticorpos após a infecção, em vez de esperar que o animal desenvolva os sinais do mal.
- c) Utilizar organismos inferiores na escala zoológica. Por exemplo, o peixe-zebra, dito paulistinha (*Brachydanio rerio*) e o nematoide *Caenorhabditis elegans*, usados para observar o desenvolvimento do sistema nervoso sob influência de substâncias químicas. A hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) é usada para detectar, de modo previsível e mensurável, o título de toxinas pirogênicas produzidas por bactérias. Esse teste, chamado LAL (*Limulus ameobocyte lysate*), permitiu abolir o uso de coelhos, nos quais a amostra possivelmente contaminada por pirogênio era injetada no sangue. Após 24h da administração, introduzia-se um termômetro no reto do animal para medir sua temperatura. Se estivesse aumentada, a amostra estava contaminada com pirogênio.
- d) Usar órgãos residuais de abatedouros. Por exemplo, modificar o teste de Draize, usando olhos de animais abatidos em vez de coelhos vivos.
- e) Usar cultura de células *in vitro* provenientes de tecidos humanos específicos (pele, pulmão, membranas

mucosas, músculo etc.). Uma variante de grande interesse prático é o desenvolvimento de tecidos sobre superfícies tridimensionais, que reproduzem, grosso modo, o olho, pulmões, sistema digestivo, entre outros órgãos. Esses tipos de aparatos estão se tornando de uso cada vez mais comum na indústria e na pesquisa biotecnológicas, contribuindo significativamente na redução da quantidade de cobaias usadas, além de reduzir o sofrimento dos animais durante os testes.

No entanto, deve ser ressaltado que os protocolos dos testes com cobaias, que vêm sendo usados desde o primeiro momento, estão bem descritos e desenvolvidos, inclusive fornecendo resultados com alto grau de precisão. Por exemplo, o teste de Straub-Hermann, usado como prova toxicológica de analgésicos entorpecentes (morfina e derivados), consiste em se injetar subcutaneamente em camundongo quantidades crescentes da amostra, na qual se suspeita existir algum composto morfínico. Se a cauda da cobaia se ergue, ficando ereta ou assumindo o formato de “S”, a amostra certamente contém morfina ou algum de seus derivados. Por isso, a substituição dos protocolos convencionais, visando salvaguardar o princípio ético da não maleficência com os animais, deve ser feita aos poucos e com muita cautela.

A validação de um novo teste biológico, visando reduzir o sofrimento animal, deve seguir a rigorosidade e a complexidade dos experimentos clínicos convencionais. Enquanto os testes clínicos devem demonstrar que uma nova droga é eficaz, a validação, também, deve demonstrar peremptoriamente que o teste biológico alternativo é tão ou mais eficiente que o realizado com cobaias.

A questão sobre a validação de testes biológicos alternativos foi considerada tão séria, que em 1996, na cidade de Solna, Suécia, houve uma reunião internacional para abordar o problema. Desse encontro, a Comunidade Europeia criou o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM, na sigla em inglês) e os Estados Unidos, o Comitê de Coordenação Interagências para a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, na sigla em inglês). Ambas as agências realizam estudos de “pré-validação” para avaliar o potencial de uma alternativa e eliminar problemas técnicos com o seu protocolo. Na Europa, se a fase de pré-validação é ultrapassada com sucesso, o ECVAM seleciona vários laboratórios em diferentes países para submeter ao teste alternativo uma grande gama de substâncias codificadas. Os resultados apresentados pelos laboratórios são julgados por uma comissão de mais de 35 cientistas, representando os países da Comunidade, a indústria e os grupos protetores dos animais. Durante

todo o processo de validação o ICCVAM participa como observador. Assim, se uma alternativa for capaz de aferir com precisão a propriedade relevante das substâncias, e seus resultados forem consistentes e reproduzíveis em laboratório, o comitê declara formalmente sua validade (GOLDBERG; HARTUNG, 2006).

À medida que o número de protocolos, que prescindem de cobaias, aumenta, as autoridades dos países baixam normas regulatórias, vetando o uso de animais. Por exemplo, na Comunidade Europeia nenhum cosmético, desde 2003, pode ser vendido se o produto final ou qualquer de seus ingredientes tiver sido testado em animais, desde que existam alternativas. A abolição dos testes de ingredientes cosméticos em animais deverá entrar em vigor em breve (GOLDBERG; HARTUNG, 2006).

Apesar de os custos envolvidos para desenvolver protocolos alternativos serem elevados, o emprego de animais, também, envolve custos altos – em termos mundiais, na casa dos bilhões de dólares – haja vista a diversidade de procedimentos para a seleção, procriação, manutenção e dispensação desses animais para os diferentes ramos da indústria de produtos biotecnológicos.

1.6.5 Agricultura

Conforme exposto, a técnica do DNA recombinante – inventada em 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer, quando transferiram com sucesso um gene de rã para uma bactéria (FURTADO, 2003) – tornou-se a ferramenta básica para a chamada engenharia genética. Desde então, numerosos organismos geneticamente modificados (OGM) – os, também, ditos “transgênicos” – foram introduzidos na biotecnologia. De todas as áreas produtivas impactadas por essa técnica, foi a agrícola que patrocinou o estabelecimento de acalorados debates nas comunidades, tanto científicas quanto leigas. A celeuma teve início em 1996, quando uma empresa biotecnológica lançou no mercado uma variedade de soja transgênica, que era resistente ao glifosato, um herbicida de baixa toxicidade e amplo espectro de aplicação.

A introdução dessa variedade de soja no campo veio satisfazer o escopo de todos os produtores rurais, ou seja, ganhar competitividade por meio da redução de custos e aumento da produtividade. Lembra-se da chamada “revolução verde”, que ocorreu a partir dos anos 1950, e que era baseada no tripé formado pelas máquinas (tratores, colheitadeiras, semeadeira-adubadeira etc.), pelas substâncias químicas (herbicidas, inseticidas etc.)

e por sementes selecionadas (submetidas a um processo contínuo de seleção e melhoramento desde os primórdios da atividade agrícola, há cerca de 10 mil anos). Essa “revolução verde” tornou a atividade agrícola altamente rentável, além de baratear o custo dos alimentos, haja vista a alta produtividade dos cultivares em geral (milho, trigo, soja, algodão, cana-de-açúcar, amendoim etc.).

Porém, ao longo das décadas, as pragas (insetos e ervas daninhas) foram adquirindo resistência às substâncias químicas, obrigando os fabricantes a uma busca incessante por novos compostos, os quais, infelizmente, eram cada vez mais venenosos ao homem e daninhos ao meio ambiente. Por isso, a introdução de uma variedade transgênica – menos exigente em substâncias químicas e mais resistente às pragas em geral – deveria ser bem recebida pelas comunidades. Em princípio, as plantas geneticamente modificadas satisfariam plenamente três dos quatro princípios éticos: autonomia (liberdade de um povo decidir sobre usar ou não a planta modificada), beneficência (maior produtividade, menor agressão ambiental etc.) e justiça (acesso maior a alimentos pelos povos subdesenvolvidos e/ou emergentes).

No entanto, o que tem ocorrido nos últimos 12 anos foi uma cisão apaixonada entre defensores e detratores dos transgênicos. A querela pode ser centrada no princípio da não maleficência, considerado plenamente satisfeito pelas comunidades a favor e pouco aceitável pelas comunidades contrárias. No Brasil, por exemplo, um, entre os 27 estados da república – o Estado do Paraná – vem combatendo a plantação de transgênicos dentro de seu limite territorial.

De um modo geral, pode-se considerar que as principais objeções aos OGMs na agricultura são em relação à introdução de organismos não naturais no meio ambiente, que causariam desequilíbrio nos ecossistemas, redução da biodiversidade gênica e transferência indevida de gene(s) para espécies de plantas aparentadas, entre outras; ao cruzamento de fronteiras genéticas naturais; à resistência a pesticidas, por não haver garantias de que as pragas não adquirirão resistência aos biopesticidas,

como a toxina do *Bacillus thuringiensis*, por exemplo; e à segurança dos alimentos geneticamente modificados, sendo que o aspecto relevante, nesse caso, é o da ocorrência de alergias – um alimento modificado geneticamente, que antes não causava alergia a determinadas pessoas, passa a causar.

Em que pese o ceticismo de milhões de pessoas sobre a segurança e as vantagens das plantas transgênicas, elas, sem a menor sombra de dúvida, vieram para ficar nos campos agriculturáveis do planeta. A soja plantada nos Estados Unidos, por exemplo, é quase totalmente transgênica, sendo que o mesmo ocorre na Argentina, na China e no Canadá, entre outros países. Somente no período 1996-2002, a área total cultivada com grãos geneticamente modificados passou de 1,7 milhão de hectares para 58,7 milhões (FURTADO, 2003).

Merece lembrança o fato de que o alimento de origem vegetal consumido, atualmente, provém de melhoramentos genéticos conseguidos por meio de cruzamentos seletivos. Por exemplo, *Beta vulgaris* (beterraba) × *Beta procumbens* aumentou a resistência do tubérculo contra nematoides; *Triticum aestivum* (trigo) × *Agropyron elongatum*, resultou em um híbrido resistente à seca. Ou seja, há milênios a humanidade se alimenta com vegetais insetos-resistentes, herbicida-tolerantes etc. O que o emprego da engenharia genética propiciou foi maior rapidez com que uma dada característica é incorporada nos cultivares. Todavia, a mudança provocada é muito semelhante àquela do cruzamento seletivo.

Finalmente, considerando que o relacionamento humano em qualquer campo, deve ser regido sempre pelo respeito e pela compreensão, ambas embasadas na moral e na ética, então, todo o alimento industrializado, no qual pelo menos um ingrediente seja proveniente de OGM, deve ter esse detalhe claramente evidenciado em seu rótulo. Ou seja, deixar bem evidenciado ao ser humano, que dispor ao seu bel prazer da aplicação do princípio ético da autonomia, naquilo que ingere, é seu direito inalienável.

Referências bibliográficas

AGUT, H. Um sistema estratégico de reprodução. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 14-19, 2008. Edição especial.

AST, G. How did alternative splicing evolve?. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 773-782, 2004.

_____. Genoma alternativo. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 3, n. 36, p. 52-57, 2005.

BARRICK, E. J.; BREAKER, R. R. O poder dos riboswitches. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 57, p. 46-53, 2007.

BELLINGHINI, R. H. Mocinha e bandida: em tumores, as células-tronco podem ser as grandes vilãs. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 39, p. 80, 2005.

BENENSON, Y. et al. An autonomous molecular computer for logical control of gene expression. **Nature**, London, v. 429, p. 423-429, May 2004.

- BIELLO, D. Criação da vida. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 98, p. 26-27, 2010.
- BRAGA, J. Liderança no coração. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 39, p. 74-79, 2005.
- BUYS, B. D. Leveduras modificadas aceleram a produção de álcool. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 1, n. 6, p. 40-47, 2002.
- CANILHA, L. et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 333-336, 2008.
- CHOI, C. Q. Gêmeos idênticos não são geneticamente iguais. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 73, p.14-15, 2008.
- _____. Golgi sintético. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 90, p. 16, 2009.
- COHEN, S.; LEOR, J. Alívio para corações partidos. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 3, n. 31, p. 68-75, 2004.
- COOKSON, C. A mãe de todas as células. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 39, p. 64-69, 2005.
- DALLAGNOL, D. **Bioética**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2005.
- DARIO, P.; MENCIASSI, A. Pílulas robóticas. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 103, p. 69-71, 2010.
- DEBARBIEUX, L. Bacteriófagos no combate às bactérias. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 51-55, 2008. Edição Especial.
- DELLA SANTINA, C. C. De volta ao equilíbrio com orelhas biônicas. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 96, p. 56-59, 2010.
- DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, New Rochelle, v. 3, n. 3, p. 269-283, 2007.
- ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N. Estratégias para o combate ao câncer de mama. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 74, p. 36-43, 2008.
- FILIOL, E.; MARION, J. Y. A virologia informática. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 78-81, 2008. Edição Especial.
- FISCHETTI, M. Stents vasculares. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 50, p. 94-95, 2006.
- FURTADO, R. A controvérsia dos OGMs nos trinta anos da engenharia genética. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 18, p. 26-33, 2003.
- GAGE, F. H.; MUOTRI, R. A. O que torna o cérebro singular. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 10, n.119, p. 34-39, 2012.
- GARÇON, N.; GOLDMAN, M. O novo poder das vacinas. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 90, p. 62-69, 2009.
- GARDNER, R.; WATSON, T. Colcha de retalho de leis. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 39, p.82-85, 2005.
- GARRAFA, V. Prós e contras da clonagem humana. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 14, p. 56-57, 2003.
- GERSTEIN, M.; ZHENG, D. Pseudogenes na vida real. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 52, p. 53-59, 2006.
- GESSAIN, A.; MANUGUERRA, J. C. Emergência viral permanente. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 68-71, 2008. Edição especial.
- GIBBS, W. W. O genoma oculto. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 19, p. 53-59, 2003.
- _____. O genoma oculto além do DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 20, p. 82-89, 2004.
- GLASS, I. R. Combate ao rotavírus. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 48, p. 41-47, 2006.
- GOLDBERG, A. M.; HARTUNG, T. Bom para os animais, bom para nós. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 47, p. 48-55, 2006.
- GRUNER, G. Carbon nanotube transistors for biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 384, n. 2, p. 322-335, 2006.
- _____. Nanoredes de carbono estimulam nova eletrônica. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 61, p. 68-75, 2007.
- HARADA, K. et al. Wireless reconfigurable modules for robotic endoluminal surgery. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ROBOTICS AND AUTOMATION, 9, Kobe, 2009. **Proceedings...** New York: IEEE, 2009. p. 2699-2704.
- HUBER W. G.; DALE, B. E. Gasolina de capim e outros vegetais. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 87, p. 24-31, 2009.
- KAHN, J. Medicamentos étnicos. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 64, p. 78-83, 2007.
- KHADEMHOSEINI, A.; VACANTI, J. P.; LANGER, R. Promessas da engenharia de tecidos. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 7, n. 85, p. 60-67, 2009.
- KRAUSS, M. L. Promessas da biologia sintética. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 94, p. 19, 2010.
- KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- LADDY, D. J. Electroporation of synthetic DNA antigens offers protection in nonhuman primates challenged with highly pathogenic avian influenza virus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 83, n. 9, p. 4624-4630, 2009.
- LAU, C. N.; BARTEL, D. P. Censores do genoma. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 16, p. 50-57, 2003.
- LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2004.
- LEHRMAN, S. Genoma ao alcance de todos. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 73, p. 12-13, 2008.
- LEMES, J. M. Cronograma de uma ameaça global. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 14, p. 44-45, 2003.
- LIMA, L. H. A. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 6, p. 734-738, 2004.
- LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 3. ed. New York: Scientific American Books, 1995.
- MALLOUK, T. E.; SEN, A. Viagem fantástica. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 7, n. 85, p. 68-73, 2009.
- MARÉCHAL, V. Vírus em emboscada no organismo. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 62-67, 2008. Edição especial.
- MAY, M. Novo olhar sobre doenças. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 97, p. 68-71, 2010.
- MORROW, M. P.; WEINER, B. D. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 99, p. 35-39, 2010.
- MOULDER, S.; HORTOBAGYI, G. N. Advances in the treatment of breast cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, St. Louis, v. 83, n. 1, p. 26-36, 2008.
- NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993.
- NESTLER, E.J. Comutadores ocultos do cérebro. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 10, n. 116, p. 67-73, 2012.
- NOTKINS, A. L. De olho na prevenção. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 59, p. 38-45, 2007.
- OMENETTO, F.; KAPLAN, D. Seda e os milagres da medicina. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 16, p.72-73, 2010.
- PAGÉS, J. C.; PIVER, E. Vírus, vetores de moléculas terapêuticas. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 44-49, 2008. Edição especial.
- PERKEL, J. M. Digitizing pathology. **Bioscience Technology**, Rockaway, v. 34, n. 2, p. 8-12, 2010.
- PESQUERO, J. B. et al. Aplicações dos animais transgênicos. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 56, p. 78-85, 2007.

- RAOULT, D. Mimivírus, o maior de todos os vírus. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 32-37, 2008. Edição especial.
- RATHMANN, G. B. Biotechnology Startups. In: MOSES, V.; CAPRE, R. E. (Ed.). **Biotechnology: the science and the business**. Churr: Hardwood Academic Publishers, 1994. p. 49-67.
- REGIS, E. Promessas do menor rádio já construído. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 7, n. 83, p. 36-41, 2009. Edição especial.
- ROBERTS, M. S. et al. Naturally oncolytic viruses. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, London, v. 8, p. 314-321, 2006.
- ROMMELAERE, J. et al. Câncer tratado por vírus. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 56-61, 2008. Edição especial.
- ROTHSTEIN, M. A. Proteção da privacidade de seus genes. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 77, p. 46-51, 2008.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. [V. 2].
- SEEMAN, N. C. Nanotecnologia e a dupla hélice. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 3, n. 26, p. 36-45, 2004.
- SELEGHIM, P.; POLIKARPOV, I. Desafios para transformar conceitos em realidade. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 87, p. 32-37, 2009.
- SHAPIRO, E.; BENENSON, Y. Computadores de DNA ganham vida. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 49, p. 48-55, 2006.
- SMITH, J.E. **Biotechnology**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- STIPP, D. Nova rota para a longevidade. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 10, n. 117, p. 33-39, 2012a.
- _____. Os calados traidores invisíveis. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 11, n. 124, p. 64-69, 2012b.
- STIX, G. O medicamento que veio do leite. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 43, p. 26-29, 2005.
- _____. Genoma humano: propriedade privada. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 4, n. 46, p. 82-89, 2006.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- SUHRE, K.; AUDICE, S.; CHAVERIE, J. M. Mimivirus gene promoters exhibit a predated conservation among all eucaryotes. **Proceedings of New York Academy of Sciences**, New York, v. 102, n. 41, p. 14689-14693, 2005.
- SVOBODA, E. O transistor de DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 104, p. 34, 2011.
- TRABOULSI JÚNIOR, F. A. *Enzimas microbianas na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo-alimentado e contínuo com membrana*. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; FANNING, G. T. À caça do vírus da gripe assassina. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 3, n. 35, p. 66-75, 2005.
- TOMOTANI, E. J.; NEVES, L. C. M.; VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in a membrane bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 149-162, 2005.
- TOMOTANI, E. J.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M. Processo de obtenção de xilitol a partir da xilose através de bioconversão enzimática em reator com membrana. Pedido de patente n. PI0803481-8. **Revista de Propriedade Industrial**, Rio de Janeiro, n. 1984, p. 93, 2008.
- TOMOTANI, E. J. et al. Partial purification of xilose reductase from *Candida guilliermondii* for the use of the conversion of xilose into xilitol. In: CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY, 2., 2007, Sevilha. **Proceedings...** Hackensack: World Scientific, 2009.
- TOMOTANI, E. J. et al. The use of xylose reductase for converting xylose into xylitol through a membrane reactor. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOCATALYSIS, 5., 2010, Hamburg. **Proceedings...** Berlin: BIO Deutschland, 2010. p. 103-104.
- VIANA, D. A. et al. Screening of variables influencing the clavulanic acid production by *Streptomyces DAUFPE 3060* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 6, p. 1797-1807, 2010.
- VILLARREAL, L. Afinal, os vírus são seres vivos?. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 28, p. 20-24, 2008. Edição especial.
- WANG, J. Can man made nanomachines compete with nature biomotors? **ACS NANO**, Washington, DC, v. 3, n. 1, p. 4-9, 2009.
- WANG, L. Z. Nano-engenhos com autogeradores. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 6, n. 69, p. 76-81, 2008.
- WEBSTER, G. R. ; WALKER, J. E. Influenza. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 14, p. 46-49, 2003.
- WELDER, W. J. H. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Columbus, v. 98, n. 4, p. 1278-1316, 2009.

