

Escola Secundária do Padre António Martins Oliveira de Lagoa

Ciências da Terra e da Vida

SERES VIVOS TRANSGÉNICOS

Pedro Pinto N° 14 11ªA

27/11/2003

Índice

Introdução.....	3
Seres Vivos Transgênicos.....	4
O que são?	4
Transformação Genética de Animais	6
Métodos de Transferência de Genes.....	6
Microinjecção de ADN.....	6
Transferência de células embrionárias	7
Transformação Genética de Plantas	9
Métodos de Transferência de Genes.....	10
Transferência mediada de genes.....	10
Utilização de plasmídeos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ou de <i>A. rhizogenes</i>	11
Transferência directa de genes	12
Transferência de genes para protoplastos.....	12
Transferência de genes por bombardeamento de partículas.....	13
Conclusão	15
Bibliografia.....	16

Introdução

Os melhoramentos de plantas têm tentado, ao longo do tempo, promover cruzamentos entre espécies muito distintas, no sentido de obter novos produtos. Durante anos, os melhoradores têm tentado cruzar espécies muito diferentes com o intuito de obter novas variedades com interesse económico. Cruzamentos interespecíficos levaram à obtenção de novas espécies como, por exemplo, de *Triticale*. Apesar de serem conhecidos alguns casos de sucesso, muitos dos cruzamentos efectuados não levaram à obtenção de novas variedades devido à existência de barreiras sexuais.

O tema deste trabalho é os seres vivos transgénicos, uma importante área da biotecnologia. Procurou-se clarificar o significado de ser vivo transgénico, assim como as técnicas usadas tanto na produção de animais transgénicos, e em maior foco as técnicas usadas na produção de plantas transgénicas, onde tem havido um maior investimento.

Seres Vivos Transgênicos

O que são?

Organismo em cujo genoma foi inserido ADN de outra espécie (o gene estranho designa-se transgene). O organismo original não tem esse gene, ou tem uma versão diferente desse gene. Os cientistas fazem organismos transgênicos para testar as funções dos genes, e também para criar melhores organismos. Será nocivo ou perigoso para o organismo? Isso é uma controvérsia nos nossos dias. Se um organismo, por exemplo, um morango, transportar um novo gene que expressa uma nova proteína, que aumentasse a resistência ao frio, isso seria bom. Os agricultores poderão obter melhores colheitas e ficar menos dependentes do tempo. Mas continuarão os morangos melhorados a ser morangos se o transgene for de um tomateiro resistente ao frio?

Organismos complexos como os morangos ou os tomates provavelmente expressam cerca de 5 mil a 10 mil genes. Os genes fazem proteínas que interagem, por exemplo, gene A faz proteína A que se transforma em gene B. As proteínas podem estar a efectuar reacções consecutivas e/ou em outros sistemas regularizadores que dependem delas



Imagem 1 – Tomateiro transgênico (à esquerda) e tomateiro normal (à direita).

mesmo. Existe redundância num organismo, assim se algum sistema regularizador falhar, os outros podem compensar. São necessárias muitas expressões de genes coordenadas para fazer todo um organismo. Assim, um “novo” gene em 10 mil provavelmente não irá modificar a sua identidade ou alterar drasticamente o organismo. Por outro lado, se for um gene regularizador crucial, muitas alterações podem ocorrer. Os cientistas efectuam diversos testes, e a FDA tem regulamentos de segurança que tem de ser cumpridos antes de um novo alimento ser aprovado.

É na agricultura que tem havido mais investimento nesta área. Este tipo de biotecnologia transformou a agricultura. Antes, a produção de novas colheitas era feita à maneira antiga, por exemplo, a selecção e apanha do organismo com as melhores

qualidades para a reprodução. Agora as colheitas com novas qualidades podem ser geradas de uma forma específica e em muito pouco tempo. Quase todos os alimentos domésticos não são “naturais”, são diferentes dos seus parentes selvagens. Portanto, como toda a nova tecnologia, deve-se proceder com cuidado e aprender o máximo dela.

Transformação Genética de Animais

O termo “animais transgênicos” descreve animais aos quais os cromossomas contêm cópias integradas de genes ou gene construídos derivados de outras espécies ou que não são usuais no animal. Por esta razão, os ratos, as ratazanas e outros pequenos mamíferos são usados para introduzir ADN estranho nos oócitos ou embriões (blastocitos).



Imagem 2 – À esquerda encontra-se um porco transgênico e à direita um porco vulgar.

Métodos de Transferência de Genes

De entre as diferentes técnicas de transferência de ADN salientam-se duas: 1) microinjecção de ADN linear no pronúcleo; 2) transferência de células embrionárias para blastocitos.

Microinjecção de ADN

Injecção de moléculas de ADN linear para ovos fertilizados (fase pronuclear) com um microscópio invertido, equipamento de micromanipulação e aparelhos de injecção.

A primeira produção com sucesso de um rato transgênico com microinjecção pronuclear foi em 1980. O método de microinjecção pronuclear de produzir um animal transgênico resultou na introdução de sequências de ADN linear nos cromossomas dos ovos fertilizados. Se o material genético transferido estiver integrado num dos cromossomas embrionários, o animal irá nascer com uma cópia desta nova informação em todas as células. O ADN estranho tem de ser previamente integrado no genoma para a duplicação do material genético que precede a primeira clivagem.

Se isso não ocorrer, apenas algumas células irão integrar o gene. Por esta razão, o ADN é introduzido no ovo fertilizado no primeiro estágio, que é o período pronuclear que ocorre imediatamente a seguir da fertilização. Após várias horas da entrada do esperma no oócito, os pronucleos do macho e da fêmea são visíveis como individuais através da luz normal do microscópio e não se encontram fundidos no zigoto.

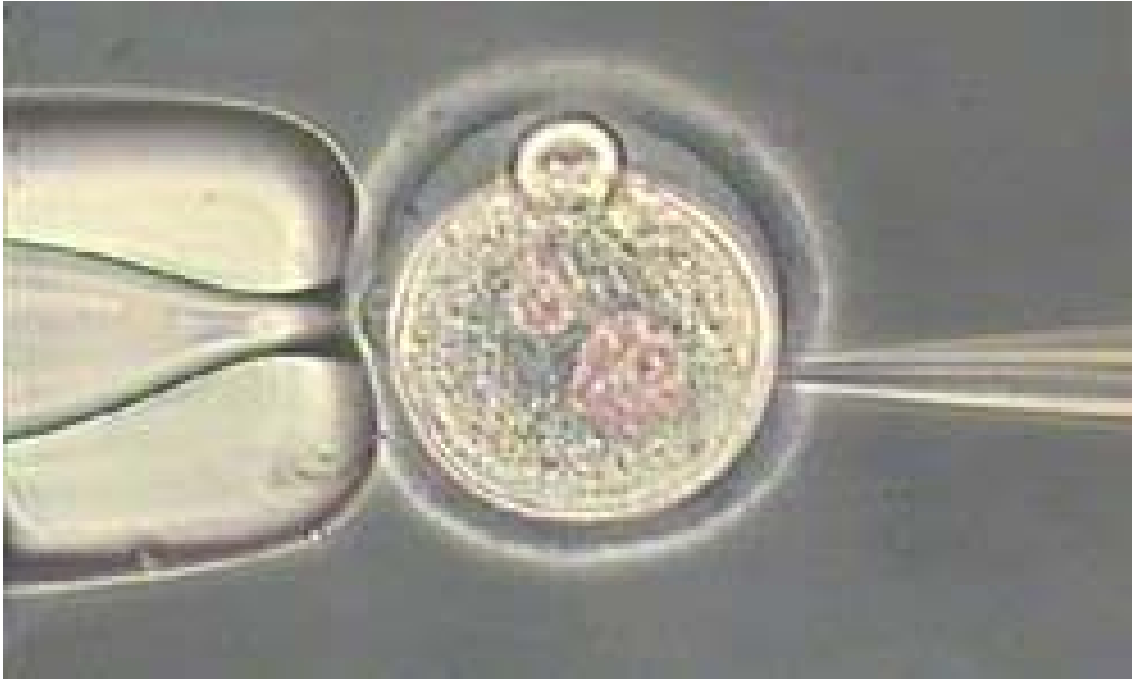


Imagem 3 – Microinjecção de ADN

O ADN pode ser injectado em qualquer dos pronucleos sem diferença nos resultados. Normalmente a injeção é feita no pronúcleo do macho, porque é mais largo do que o núcleo da fêmea e também porque se encontra perto da superfície do oócito.

Estes oócitos são subsequencialmente transferidos para o útero de animais pseudogravídios e desenvolvem-se até ao fim.

Transferência de células embrionárias

Células embrionárias são derivadas de células de blastocitos normais. Estas células são pluripotentes, significa que se podem desenvolver em qualquer tipo de tecido. Ao remover as células embrionárias da cultura e ao colocar-se novamente dentro do embrião (blastocito), permite a divisão das células e tornam-se partes do embrião. A transfusão permite inserir *in vitro* ADN estranho nas células. O alvo deste processo é a recombinação homóloga com o cromossoma da célula, por exemplo, a introdução ou

modificação do ADN numa localização com sequências de ADN homólogo. Seguidamente à transfusão, os descendentes de uma célula individual (clone) são analisados usando métodos microbiológicos para determinar quando alguma mutação acontece. As células dos clones identificados que mostraram a reacção desejada são multiplicados *in vitro* e são injectados em blastocitos.

Estes blastocitos injectados são depois implantados em úteros de fêmeas pseudográvidas.

Transformação Genética de Plantas

A transformação genética de plantas constitui um sistema interessante para adicionar e/ou alterar, de maneira direccionada, características importantes, codificadas por um ou mais genes. Após a descoberta de que a bactéria fitopatogénica *Agrobacterium* é um vector natural de transferência de genes, os investigadores passaram a dispor de uma ferramenta poderosa para estudar e modificar o genoma das plantas. Tirando o partido da utilização deste microrganismo, foi possível definir bases moleculares da interacção planta/patógeno, bem como compreender a função e regulação de genes implicados no desenvolvimento e fisiologia das plantas. A



Imagem 4 – Plantas transgénicas.

capacidade de utilização de *Agrobacterium* tem sido um impacto extraordinário em avanços recentes da investigação científica em plantas e, em particular, na biotecnologia vegetal, visando quer o direccionamento de vias metabólicas de síntese de compostos com interesse industrial. A disponibilidade de um sistema de transferência de genes constituiu a base da aplicação da tecnologia de ADN recombinante à introdução de genes estranhos em plantas. Vários sistemas de transferência de genes foram desenvolvidos, tendo-se deparado, os investigadores, com um sem número de problemas, dos quais importa referir a presença de parede celular, que funciona como uma barreira à transferência de ADN. Por seu turno, as células espermáticas e zigoto são praticamente inacessíveis e os pró-embriões demasiado pequenos para que possam ser transformados eficazmente. Apesar destes e de outros condicionantes da eficácia da transferência de genes, a transformação de plantas é possível. A reduzida aplicação da tecnologia de ADN recombinante a espécies e variedades com interesse agronómico deve-se ao facto de existirem poucos métodos para selecção eficaz de transformantes independentes, capazes de manter as suas características. Os progressos realizados desde

a obtenção das primeiras plantas transgênicas em 1984 fazem supor que o desenvolvimento de novos métodos de transferência de ADN ou a optimização dos existentes, associado à descoberta de novos genes marcadores, permitirão que a transformação genética venha a constituir um processo eficaz de melhoramento na agricultura do futuro.

Métodos de Transferência de Genes

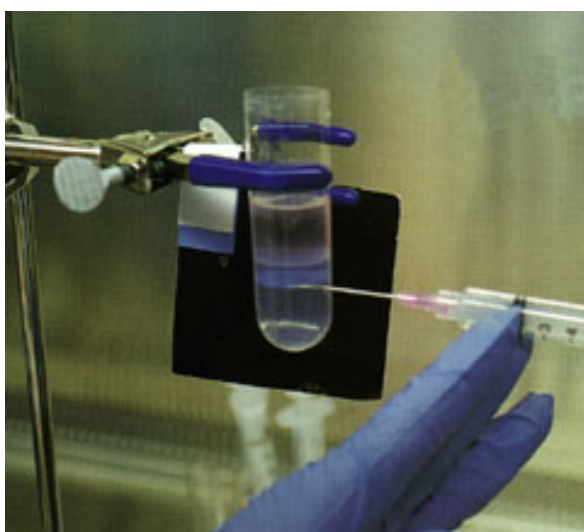


Imagem 5 – Cientistas tentam desenvolver novas técnicas de transferência de genes, na Universidade de IOWA.

Foram desenvolvidos diferentes métodos de transferência de genes, embora alguns deles se tenham revelado inadequados, dado que não foi possível obter plantas transgênicas. De entre os métodos que se revelaram inadequados podem citar-se: transformação de pólen; macronjecção; electroforese; incubação de sementes embriões, tecidos ou células em ADN; electroporação de tecidos; fusão de lipossomas com tecidos (por exemplo, Gad e col., 1990); injeção de

lipossomas; tratamento com microlaser; ultrassonicação.

De entre as diferentes técnicas de transferência de ADN salientam-se, por terem sido as mais amplamente utilizadas e com maior sucesso, as seguintes: 1) transferência de genes mediada por um vector (*Agrobacterium*); 2) transferência directa de ADN para protoplastos; 3) transferência de genes por bombardeamento de partículas; 4) microinjecção; 5) microporação.

Transferência mediada de genes

Para que um sistema de transferência mediada de genes possa ser eficaz, é indispensável dispor de um vector de ADN eficiente e reprodutível. Um vector pode definir-se como um agente capaz de promover uma ou mais etapas no processo global de transferência de material genético, qualquer que seja a sua origem, para plantas ou

suas partes. A transferência de material genético exógeno engloba as seguintes etapas: integração, incorporação, transcrição, tradução, manutenção e transferência através de mitoses e meioses. Um vector de genes permite a transferência de material genético entre plantas e também a transferência de informação genética de bactérias, fungos ou mesmo animais para plantas. De entre os vectores mais utilizados citam-se o plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* ou Ri de *A. Rhizogenes*, vectores de *Caulimovirus* (vírus do mosaico da couve-flor) e de *Geminivirus*. O sucesso na aplicação do sistema *Agrobacterium*, para transferir genes para uma ampla variedade de espécies vegetais, levou a pensar que este vector fosse universalmente útil. Dada a sua ampla utilização exemplificamos a transferência mediada de genes com o sistema *Agrobacterium*. Não há dúvida que este sistema constitui um excelente vector para a produção de plantas transgênicas e existe, hoje, um sem número de plantas transgênicas com interesse económico, que têm sido obtidas por transferência de genes mediada por *Agrobacterium*.

Utilização de plasmídeos de *Agrobacterium tumefaciens* ou de *A. rhizogenes*

A utilização de *Agrobacterium tumefaciens*, ou de *A. rhizogenes* na transferência de genes, baseia-se no facto de estes microorganismos do solo serem capazes de infectar, na natureza, um grande número de plantas (algumas monocotiledóneas, dicotiledóneas e gimnospermas) herbáceas ou lenhosas, através de zonas de ferida, provocando a formação de tumores *crown gall* e *hairy roots*, respectivamente.

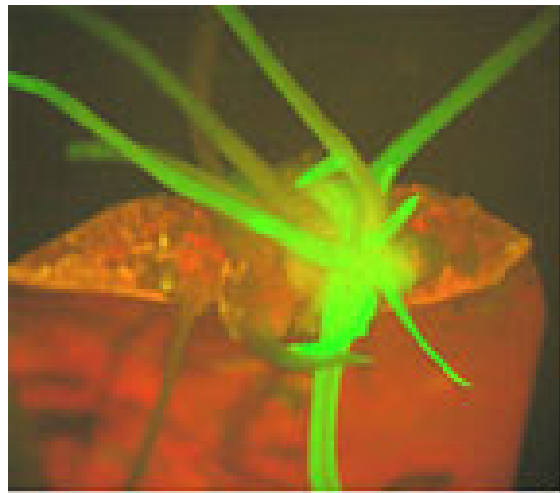


Imagem 6 – Raízes induzidas por *A. rhizogenes*.

O fenótipo transformado deve-se à inserção, através de zona de ferida, de um plasmídeo Ti (indutor de tumorigénese) ou de um plasmídeo Ri (indutor de raízes) das correspondentes estirpes virulentas de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*).

Nas plantas sensíveis ao *Agrobacterium*, durante o processo de infecção ocorre transferência de uma porção de ADN plasmídico (T-ADN) da bactéria para células da

planta, onde é inserido ao acaso, no genoma nuclear, ligando-se, covalentemente, ao ADN da planta.

Transferência directa de genes

Ao contrário da transferência mediada, a transferência directa de genes não requer qualquer tipo de vector. Pode concretizar-se recorrendo quer à transferência de ADN para protoplastos quer à transferência para células de tecidos por bombardeamento de partículas.

Transferência de genes para protoplastos

Os protoplastos podem ser considerados um sistema experimental ideal para transferência de genes. A transferência directa de genes aparece como uma alternativa à utilização de *Agrobacterium* como agente de transferência de ADN. O facto de os protoplastos apresentarem franca acessibilidade através do plasmalema permite que o ADN estranho seja integrado nos protoplastos de uma determinada população e que, na sequência, possam vir a ser regeneradas plantas transgênicas. A integração de ADN nos protoplastos pode ser promovida através da utilização de agentes químicos (o mais vulgar é o polietileno glicol) ou utilizando equipamentos próprios – electroporadores – que induzem a formação reversível de poros na



Imagem 7 – Electroporador

membrana plasmática através dos quais penetram as moléculas de ADN estranho. Virtualmente, qualquer população de protoplastos pode ser transformada, embora com diferentes eficiências, desde que requisitos mínimos tenham sido respeitados. Num tal contexto, parecia que não há problemas em obter plantas transformadas a partir de protoplastos onde se integrou ADN estranho. Apesar de se ter verificado um progresso enorme na capacidade de regeneração de plantas transgênicas a partir de protoplastos, muitos são ainda os constrangimentos. A regeneração de plantas a partir de protoplastos

afigura-se como um processo que apresentará sempre condicionalismos que têm a ver com as características da própria espécie que são, em regra, genótipo-dependentes. A transferência de genes para protoplastos tem apresentado particular importância no caso de espécies não infectáveis pelo *Agrobacterium*, como é o caso de gramíneas. Têm sido feitos progressos enormes na obtenção de plantas transgênicas de gramíneas, nomeadamente de arroz, aveia e milho, tendo sido o caso mais recente a obtenção de plantas transgênicas de arroz (Potrikus e col., 2000) contendo fitoeno (vitamina E) na cariopse. Apesar de existir um considerável número de casos de sucesso na aplicação da tecnologia de ADN recombinante a cereais e outras gramíneas, a sua aplicação está longe de ser uma rotina.

Transferência de genes por bombardeamento de partículas

Este sistema baseia-se na capacidade que micropartículas pesadas (ouro ou tungsténio), cobertas com ADN, têm de integrar genes, virtualmente, em todos os tipos de células. Desde o início da concepção de equipamentos apropriados para o bombardeamento de partículas em ambiente estéril, esta tecnologia mereceu maior atenção por parte de investigadores, na expectativa de que ela resolveria todos os problemas de transferência de ADN não resolvidos, quer pelo sistema de transferência



Imagem 8 – Plantação de soja geneticamente modificada.

mediada por *Agrobacterium*, quer por transferência directa de ADN para protoplastos. A transferência de genes por bombardeamento de partículas surgia com algumas vantagens e com potencial para uma aplicação generalizada destacando-se, em particular, entre outras: facilidade de manuseamento; capacidade de, com um único disparo, transferir genes para um elevado número de células; as células alvo poderem ser desde micrósporos a células em cultura, células de tecidos diferenciados ou meristemas; as células alvo poderem estar à periferia ou no interior de tecidos; depender apenas da optimização de parâmetros físicos.

Em 1988, Christou obteve, por biolística, as primeiras plantas transgênicas de soja. Curiosamente, no mesmo ano era referida a obtenção de plantas transgênicas da mesma espécie, utilizando o sistema de transferência mediada por *Agrobacterium*. Nos anos seguintes veio a verificar-se que a eficiência do sistema de biolística na transformação de soja era muito superior à obtida pelo sistema mediado por *Agrobacterium*. O sistema de transferência de ADN por biolística surgiu, assim, como uma solução para a obtenção generalizada de plantas transgênicas, em particular nos casos de monocotiledóneas não infectáveis por *Agrobacterium* ou de espécies recalcitrantes à regeneração de protoplastos, como é o caso de muitas plantas lenhosas. Verificou-se, no entanto, que o sistema de biolística não permite, em muitos casos, uma integração estável e leva à formação frequente de quimeras. A biolística aparece com alta potencialidade na transformação *in situ*. A capacidade de utilização da biolística na transferência de ADN para células subjacentes ao meristema apical apareceu como uma maneira de solucionar problemas verificados nos diferentes sistemas de transformação usados até à década de 90 do século passado.

Em princípio, as células dos meristemas apicais deveriam ser transformáveis por *Agrobacterium*, por microinjeção ou por biolística. No entanto, a utilização do sistema *Agrobacterium* revelou-se absolutamente ineficiente na transformação de meristemas, em virtude da baixa capacidade destas células para integrarem o T-ADN. Por outro lado, a biolística praticada, utilizando os equipamentos disponíveis, não se manifestou aplicável como um processo de rotina, em particular no que, se refere aos meristemas de cereais ou outros que, tal como estes, apresentem dimensões muito reduzidas. Em 1991 (Sauter e col., 1991) foi concebido um novo equipamento capaz de direccionar microprojecteis para meristemas apicais. Este sistema associa as vantagens da **microinjeção** (introdução específica do ADN numa determinada célula) com as vantagens da biolística (capacidade de penetração de diferentes projecteis num só bombardeamento). Um tal equipamento reúne as condições necessárias à introdução, de maneira previsível e de rotina, de ADN em qualquer célula de um meristema apical sem perturbar o futuro desenvolvimento da planta. Esta técnica de transferência directa de ADN, denominada de **microbombardeamento**, tem como base a produção de um aerossol a partir de micropartículas de ouro em água contendo o ADN a transferir.

Conclusão

Conclui-se que um ser vivo transgénico, é um organismo geneticamente manipulado: ser vivo em cujo genoma foi inserido ADN de outra espécie (o gene estranho designa-se transgene).

É possível produzir animais transgénicos, utilizando diversas técnicas, das quais as mais vulgares são; injectando ADN linear e transferência de células embrionárias para blastocitos.

É igualmente possível produzir plantas transgénicas utilizando técnicas de transferência directa de ADN das quais as mais vulgares são: microinjecção, biolística e microbombardeamento e técnicas de transferência de ADN estranho para plantas, é ainda aplicada amplamente, quer em laboratórios de investigação, quer em empresas, tendo em vista o melhoramento de cultivares com interesse comercial.

Bibliografia

FRIED, George H.; HALDEMOS, George J. – *Biologia*, Lousã, Editora McGraw-Hill, 1.^a ed., 2001, pp. 37-50.

LIMA, Nelson; MOTA, Manuel – *Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações*, Lousã, LIDEL, 1.^a ed., 2003, pp. 401-426.

Dicionário da Língua Portuguesa Contemporânea – Academia das Ciências de Lisboa – II Volume, Lisboa, Editorial Verbo, 1.^a ed., 2001, pp. 3611.

Diciopédia 2004 (DVD), Porto, Porto Editora, 1.^a ed., 2003.

URL: http://www.brinkmann.com/ECET_appl5.asp

URL: <http://geocities.yahoo.com.br/antitrangenicocartilha.htm>

URL: <http://diferencial.ist.utl.pt/edicao/24/trans.htm>

URL: <http://grupos.uol.com.br/gruposfolha?folha.ciencia.transgenicos>

URL: <http://www.byweb.pt/genoma/animais.html>

URL: <http://www.bio.org/animals/faq.asp>

URL: http://animali.tiscali.it/altriamici/articoli/200308/07/animali_transgenici.html

URL: <http://www.med.ohio-state.edu/tafhome/homepage.html>

URL: <http://europa.eu.int/comm/research/news-centre/en/agr/01-09-agr01d.html>

URL: <http://rhein-zeitung.de/old/97/07/26/topnews/klonpolly.html>