

Artigo - Biologia Molecular e Aplicação (Em português)

Categoria : Procitropicos Informa

Publicado por [Monica](#) em 24/10/2016

Afonso Celso Candeira Valois, Engenheiro Agrônomo, Mestre, Doutor e Pós-Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador Aposentado da Embrapa, Ex-Professor Associado da UnB, Ex-Professor Contratado da UEA/CEST, Ex-Secretário Municipal de Meio Ambiente de Tefé (AM).

1- Biologia Molecular é o estudo das propriedades dos organismos vivos, sistemas biológicos e derivados no nível molecular. O seu desenvolvimento nas últimas décadas tem despertado o interesse geral, principalmente para a ampliação do conhecimento, técnica, tecnologia e “know-how” na área biológica. Definições auxiliares: a) genótipo- é a constituição genética total de um indivíduo; b) genômica- estuda o conjunto de cromossomos de uma espécie; c) proteômica- estuda o conjunto das proteínas expressas pelos genes, através técnicas instrumentais; d) metabolômica- estuda o conjunto das mudanças nas rotas metabólicas e compostos químicos para a caracterização individual da importância nutricional ou toxicológica. Estão em curso estudos sobre epigenômica e transcriptomas!

2- Utilizando os fundamentos de outras disciplinas, a biologia molecular tem promovido um avanço significativo em áreas muito importantes para a saúde humana, agricultura e produção industrial. Uma dessas disciplinas bem articuladas com a Biologia Molecular é a própria Genética Molecular, que em sua essência significa “o estudo das propriedades do material genético no nível molecular”.

3- As técnicas mais recentes de biologia molecular vieram como um somatório a esses campos do saber, no sentido de complementar a investigação científica, provendo recursos para a criação e fortalecimento da engenharia genética, iniciada por Stanley Cohen em 1972, que deu margem ao início da geração dos organismos geneticamente modificados (OGM).

4- Por seu turno, o avanço consequente da geração, aprimoramento e aplicação das ferramentas biotecnológicas foram fatores primordiais para o sustentáculo da biologia molecular.

5- A própria definição da biotecnologia já mostra que se trata da aplicação de qualquer tecnologia usando sistemas biológicos, organismos e derivados para fabricar ou modificar processos e produtos para um fim específico, podendo ser enriquecida com o uso de técnicas de biologia molecular e celular (células, organelas, moléculas, organismos).

6- Com essa visão, tem sido notável o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, tendo como bons exemplos as técnicas do DNA recombinante e marcadores moleculares. Funcionamento da tecnologia do DNA recombinante- a partir do organismo doador, o procedimento básico é extrair e cortar o DNA do genoma doador em fragmentos contendo de um a vários genes (com o uso das enzimas de restrição- atuam como tesouras) e permitir que os fragmentos se insiram individualmente em pequenas moléculas de DNA automaticamente replicantes e abertas, como os plasmídeos (pequenos segmentos de DNA que se replicam automaticamente em células de procariontes e eucariontes- são usados como vetores na engenharia genética) bacterianos. Essas pequenas moléculas circulares atuam como transportadoras ou vetores para os fragmentos de DNA porque consistem de novas combinações de DNA do genoma doador (que pode ser de qualquer organismo) com o DNA vetor de uma fonte totalmente diferente (em geral, um plasmídeo bacteriano ou mesmo de vírus). Enzimas são proteínas envolvidas na catálise de reações metabólicas específicas. . Principais técnicas de obtenção de plantas transgênicas: a) *Agrobacterium tumefaciens* (dicotiledôneas), *A. rhizogenes* (monocotiledôneas), *A. vitis* (infecta exclusivamente a

videira)- consiste no uso de bactérias para a transformação genética de plantas. O gênero *Agrobacterium* pertence à família *Rhizobiaceae*, que também agrupa os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que são bactérias fixadoras de nitrogênio. Além das bactérias acima citadas existem ainda: *A. rubi* (induz tumores especificamente em *Rubus* spp) e *A. radiobacter* (saprófita, isto é, não patogênica). Mais de 600 espécies vegetais (a maioria Angiospermas dicotiledônea e Gymnospermas, e raramente Angiospermas monocotiledôneas) são infectadas por *A. tumefaciens* e por *A. rhizogenes*. Embora a incidência seja baixa, a galha-da-coroa pode tomar proporções desastrosas em certas culturas, conduzindo à perda quase total da produção, principalmente em algumas espécies ornamentais, frutíferas e florestais, que são propagadas vegetativamente. O plasmídeo vetor com os genes do doador é passado para a *Agrobacterium* e daí para a planta receptora. b) Eletroporação de Protoplastos- é um método utilizado para introduzir macromoléculas em células vegetais. Protoplastos são células vegetais desprovidas da parede celular e, tecnicamente, podem ser isolados de qualquer tecido vegetal. Em condições bem estabelecidas de cultura de tecidos, os protoplastos reconstituem suas paredes, dividem-se, formam colônias, produzem calos e regeneram plantas (totipotência), por embriogênese ou organogênese. A técnica consiste na indução de poros reversíveis em membranas celulares, resultando em fluxo de íons e moléculas através da membrana deformada. Utiliza pulsos elétricos de 250 V/cm através de descargas com capacidade de 58 uF. c) Biobalística- utiliza micro-projéteis em alta velocidade (1.500 km/h) para introduzir ácidos nucleicos e outras moléculas em células e tecidos in vivo. Essas partículas (de ouro ou tungstênio) penetram na parede e na membrana celular de maneira não-letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e integrado ao genoma nuclear do organismo receptor. . Planta transgênica- genótipo que possui gene que não se encontra em seus pais e que nele foi adicionado com o uso da tecnologia do DNA recombinante. Também, pode-se retirar um gene dessa planta que se encontra nos pais!

7- Foi vislumbrada a capacidade de “transformar” a vida ao serem desvendados os segredos das “ferramentas moleculares”, segredos que desde sempre estão explicitados na natureza, que por conhecê-los, manipula-os segundo suas regras e responde à toda interferência humana.

8- Assim, com perseverança e curiosidade, cientistas de várias áreas contribuíram para o desvendamento da estrutura do DNA e do código genético. Com isso, contribuições importantes foram feitas para o avanço do conhecimento da estrutura e da função das moléculas informacionais, levando à proposição (e ao questionamento) do dogma central da biologia molecular (replicação, transcrição e tradução).

9- A esse e a muitos outros conhecimentos gerados pela bioquímica, biofísica, bioinformática, microbiologia, genética e imunologia se deve o embasamento das técnicas de biologia molecular.

10- Aos poucos foi possível o domínio da geração e aplicação das técnicas de isolamento e manipulação das moléculas da vida, ora conhecendo as suas sequências, ora retirando ou substituindo partes de seus fragmentos, criando novas moléculas “quiméricas”, capazes de interferir na expressão do material genético das células.

11- Esse fervilhar de ideias e descobertas foi uma característica das décadas de 1970 e 1980 e tem se propagado até aos dias atuais. Com isso várias instituições de PD&I e CT&I se preocuparam no preparo de equipes de pesquisadores e professores, criação e aprimoramento de infraestrutura de laboratórios e apoio técnico e administrativo, culminando com excelentes avanços como o sequenciamento do DNA, identificação e uso de células-tronco, além de outros formidáveis avanços do conhecimento para o benefício da humanidade.

12- Considerando o conhecimento sobre técnicas básicas em biologia molecular podem ser incluídos os seguintes tópicos: quantificação de ácidos nucleicos e de proteínas por métodos espectrofotométricos, extração e purificação de DNA, principais enzimas modificadoras de ácidos nucleicos, amplificação de DNA por PCR, análise de DNA por eletroforese (técnica para a

separação de moléculas, principalmente proteínas e DNA, através de um campo elétrico) em gel de agarose, transformação bacteriana, extração de RNA total, análise de proteínas por eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante, aplicação dos diversos tipos de marcadores moleculares já desenvolvidos, aminoácidos, natureza do código genético e suas propriedades, técnica do DNA recombinante e geração de OGM.

13- No referente a aminoácidos existem mais de 300, mas somente 20 são utilizados no organismo humano, sendo denominados de aminoácidos primários ou padrões. São os seguintes: alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano e tirosina. Dentre estes se encontram oito aminoácidos essenciais, isto é, aqueles que não são produzidos pelo corpo humano. São os seguintes: fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, arginina, serina, valina e triptofano. Para evitar a deficiência alimentar é necessária a ingestão de alimentos que contenham as proteínas que possuam os citados aminoácidos, como certos vegetais e carne de animais.

14- O código genético é o conjunto de 64 trincas possíveis de bases nitrogenadas, com 4 nucleotídeos de mRNA que especificam os 20 aminoácidos que vão formar as proteínas. É a relação entre a sequência de bases no DNA e a sequência correspondente de aminoácidos na formação das proteínas.

15- As nove propriedades do código genético: três nucleotídeos por códon, um código em trincas, sem vírgula, não sobreposto, degeneração e oscilação, ambiguidade, tem ponto inicial, tem ponto final, universal (exceção: mitocôndrias do ser humano, leveduras e outras espécies).

16- Origem e evolução do material genético- os organismos atuais são sistemas compostos por macromoléculas que evoluíram de sistemas macromoleculares mais simples de eras passadas.

17- A origem do material genético foi precedida por três estádios: a origem dos aminoácidos e das bases orgânicas, dos polipeptídeos e nucleotídeos, além dos poli-nucleotídeos.

18- Há cerca de 4 bilhões de anos, a atmosfera da Terra era rica em hidrogênio, metano, amônia e água, mas pobre em oxigênio livre e gás carbônico. Pelo uso de fontes de energia tais como: descargas elétricas, calor, elétrons com alta energia, raios X, luz solar e luz ultravioleta, os seguintes aminoácidos foram sintetizados: glicina, alanina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Outros compostos formados incluem adenina, uracil, ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico, assim como alguns açúcares e ácidos graxos.

19- Há muito tempo, a luminosidade pode ter sido uma importante fonte de energia para a produção de tais moléculas. Os meteoritos fazendo com que algumas moléculas passassem muito rapidamente através de líquidos e gases, podem também ter promovido interações entre moléculas. À medida que ocorria mais síntese, especialmente nos oceanos, os produtos se acumulavam para formar uma “sopa orgânica”.

20- A atmosfera mudou quando o oxigênio foi libertado e convertido em ozona, formando a camada sobre a Terra. Uma vez que a ozona absorve a luz ultravioleta, essa camada impede que a luz de comprimento de onda (e energia) do UV alcance a Terra. Consequentemente, as principais fontes de energia solar, daí por diante, se transformaram em luz visível e calor.

21- Foi descoberto que, em presença de excesso de ácido aspártico e glutâmico, uma mistura de aminoácidos forma ligações peptídicas e polimeriza em proteínoides à temperatura de 200°C ou menos, em uma síntese a seco. Praticamente, todos os aminoácidos comuns às proteínas estão incluídos nesses proteínoides, que devem ter servido como catalizadores rudimentares na síntese de compostos orgânicos mais complexos a partir da “sopa orgânica”, tais como nucleotídeos, poli-fosfatos e pigmentos.

22- O material genético serve para manter e replicar os sistemas de proteínas- nos organismos atuais, o material genético está intimamente ligado às proteínas: sua síntese é dirigida por proteínas e sua informação é traduzida em proteínas. As primeiras interações entre proteína e ácido nucleico

foram muito provavelmente, o resultado de colisões ao acaso. Em face da especificidade entre partes do complexo, pode-se considerar a porção aminoácida como um molde para a porção nucleotídica, ou vice-versa. Pode mesmo ser afirmado que esses dois componentes codificam um ao outro de uma maneira primitiva.

23- A grande similaridade entre DNA e RNA sugere fortemente a presença de um precursor comum. Um processo especializado ocorreu de tal forma que o DNA (mais estável que o RNA) se tornou no molde de transcrição, enquanto que o RNA menos estável, no molde de tradução. Outro avanço evolucionário teve lugar quando o organismo se tornou apto a reproduzir-se. Subsequentemente, o sistema proteico inteiro poderia ser replicado através da informação do ácido nucleico.

24- O material genético sofreu uma evolução quantitativa- os organismos altamente complexos atuais formam sistemas super macromoleculares cuja organização está codificada no ácido nucleico. Uma vez que a complexidade dos organismos aumentou no decorrer da evolução, a quantidade de informação (portanto, a quantidade de material genético) necessária para especificar um organismo também aumentou.

25- Em algumas plantas, o aumento do grau de ploidia e subsequente diferenciação de genomas resultou em maiores níveis de complexidade, diversidade e adaptabilidade. Estima-se que cerca de um quarto das espécies atuais fanerógamas (produzem sementes) se originou de alopoliploides.

26- A autopoliploidia provavelmente não desempenhou um papel importante no aumento do número de genes de organismos de reprodução sexuada, uma vez que a ocorrência de multivalentes (ao invés de bivalentes) durante a meiose resulta em numerosos gametas aneuploides. Devido ao possível desequilíbrio genético que causa o ganho de cromossomos inteiros, do mesmo modo, não parece ser o melhor mecanismo para aumentar a quantidade do material genético. No entanto, em plantas de multiplicação vegetativa como a seringueira (*Hevea* spp), a obtenção de autopoliploides, como os tetraploides, pode ser um processo altamente valioso para a criação de genótipos com elevada produção de látex. Além disso são indivíduos com alta tolerância à seca, dentre outras excelentes características, em face do tamanho e estrutura dos seus estômatos.

27- O material genético sofreu uma evolução funcional- a mutação fornece a matéria-prima para o processo evolutivo, pois é a principal força que possibilita a produção de organismos de genótipos superiores (é o principal fator que cria a variabilidade genética). Por exemplo, se várias espécies de organismos tipo selvagem dependessem do mesmo aminoácido existente no meio ambiente, o suprimento daquele aminoácido determinaria o número de organismos que poderiam sobreviver. Assim, organismos anormais que pudessem sintetizar esse aminoácido poderiam ter maior probabilidade de sobreviver do que o tipo selvagem. Seriam favorecidos também aqueles organismos nos quais um erro permitisse a utilização de outro aminoácido em lugar do aminoácido raro. A mutação, portanto, permite ao organismo maior independência em relação ao seu meio. O número das diferentes mutações possíveis é infinito, sendo que a maioria é prejudicial ao organismo. Ela pode ocorrer no nível do citoplasma, gênico ou de ponto e cromossômico. Em conjunto com a migração, recombinação, seleção natural e oscilação genética, a mutação faz parte das forças evolucionárias!

28- Evolução de proteínas e populações- considerando as proteínas dos dias atuais, muito se pode dizer a respeito do seu material genético pela seguinte razão: tais proteínas são traduções da informação genética de acordo com um código que é essencialmente universal e cuja degenerescência é limitada. Além disso, considerando a ocorrência dessas proteínas entre grupos de organismos como também individualmente é possível inferir quanto ao processo da evolução de proteínas, seus genes e populações.

29- No referente à evolução das populações, aquelas de fertilização cruzada que obedecem ao princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p + q = 1$) têm um fundo gênico estático (equilíbrio de

ligação- ausência de mutação e migração- população panmítica).

30- Assim, um membro de uma população de fertilização cruzada geralmente tem a oportunidade de se cruzar com um grande número de outros indivíduos (ex: compostos sintéticos de plantas-princípio usado pelo Dr. Afonso Celso Candeira Valois para a síntese do composto de milho 'Manaus'). Os gametas de todos os genótipos constituem um fundo do qual são utilizados genes para a próxima geração.

31- Outro tema de relevância que pode ser destacado na aplicação da Biologia Molecular é quanto ao estudo da base molecular da interação *Rhizobium* – Leguminosa na realização do processo que é considerado, após a fotossíntese, o mais importante fenômeno biológico do Planeta, que é a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esse aproveitamento natural pode ser entendido como uma das tecnologias de sustentação do plano ABC (agricultura com baixa emissão de carbono).

32- Microrganismos como os Diazotróficos têm a capacidade de quebrar os dois átomos do nitrogênio atmosférico (N_2) e transformá-los em amônia (NH_4), prontamente assimilável pelas plantas através da simbiose entre bactérias *Rhizobiales* (Rizóbios) e plantas da Família Leguminosae (soja, feijão etc.). Trata-se de um macronutriente para as plantas, disponibilizado pela atmosfera de forma gratuita e limpa, pois é de elevado custo financeiro e ambiental quando retirado de rochas da natureza.

33- Assim, bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (referidas como *Rhizobium* ou simplesmente rizóbios) são capazes de induzir a formação de estruturas típicas (nódulos) em raízes e caules de plantas da Família Leguminosae. Para estabelecer essa simbiose são produzidos sinais anteriores à interação entre a planta e o rizóbio, provocando respostas discretas pelos dois simbiossantes.

34- Adicionalmente, outras bactérias também executam esse enorme benefício de FBN quando em simbiose com outras plantas, como gramíneas. Para o caso da cana-de-açúcar, a Embrapa Agrobiologia, sediada em Seropédica-RJ, desenvolveu um adubo biológico composto de estirpes de cinco bactérias endofíticas (vivem no interior da planta), que são as seguintes: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. Essa mistura de bactérias foi a que mais contribuiu para a fixação biológica de nitrogênio, considerando que a citada instituição possui uma coleção com mais de oito mil bactérias aptas para serem usadas em trabalhos de pesquisa quanto à FBN. Trata-se de uma tecnologia da maior importância para o Brasil, considerando que o País é o maior produtor mundial de açúcar, cultivando anualmente mais de seis milhões de hectare, com produção superior a 655 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2015-2016, segundo a CONAB. Esse composto é capaz de proporcionar uma economia anual de 50 mil toneladas de fertilizante nitrogenado por ano, sem queda de produtividade, além da vantagem adicional de ser uma tecnologia limpa, pois não agride o meio ambiente. Deve-se mencionar a criatividade científica da eminente pesquisadora Dra. Johanna Dobereiner que fundamentou na base esse excelente resultado de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica. A mesma foi dos quadros da Embrapa Agrobiologia, se integrando desde os primórdios da pesquisa agropecuária a partir do EPE e DNPEA, de onde se originou a Embrapa. A Dra. Johanna foi a principal responsável por esse verdadeiro "Breakthrough" de tecnologia apropriada da agricultura brasileira e mundial. Trata-se de uma sincera homenagem in memoriam à brilhante cientista!

35- Na interação leguminosa-rizóbio são citados mais de 40 genes bacterianos (nod) envolvidos em nodulação nas diferentes espécies de rizóbios, cuja transcrição é ativada por sinais específicos da planta (flavonoides). Em retorno, transcritos dos genes nod, envolvidos na síntese de lipo-oligossacarídeos induzem especificamente a organogênese dos nódulos em plantas.

36- A simbiose *Rhizobium*-Leguminosa é, portanto, um atrativo sistema para o entendimento da base molecular da especificidade hospedeira. Nos possíveis eventos de sinalização entre rizóbios e leguminosa, inicialmente a planta induz expressão dos genes nod na bactéria, conjuntamente com

a proteína ativadora do nod D, produzida constitutivamente. Tais moléculas são produtos do metabolismo fenilpropanoídico (flavonas e isoflavonas) vegetal. No rizóbio, os genes nod ativados produzem sinais identificados como lipo-oligossacarídeos, os quais provocam enrolamento do pêlo radicular e divisões das células meristemáticas. O nódulo é então desenvolvido e assim, estabelecida a formidável fixação biológica do N₂.

REFERÊNCIAS

VALOIS, A. C. C. Biologia Molecular e Aplicação. Nota Técnica. Curso de Licenciatura em Biologia. UEA/CEST: Tefé-Amazonas, 2010. 17 p. VALOIS, A. C. C. Biodiversidade, biotecnologia e organismos transgênicos. Brasília-DF: Embrapa, 2016. 217 p. (Texto para Discussão/Embrapa. Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento; 46).