

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

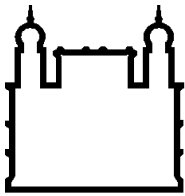
A PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS A PARTIR DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS: UM ESTUDO SOBRE A ERITROPOETINA ALFA HUMANA RECOMBINANTE

Por:

KARINA DE FIGUEIREDO FONSECA

(especialização em LAB)

RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO DE 2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

A produção de biofármacos a partir de animais transgênicos: Um estudo sobre a Eritropoetina Alfa Humana Recombinante

Por:

Karina de Figueiredo Fonseca
(especialização em LAB)

Monografia apresentada à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio como requisito obrigatório para conclusão do Curso Técnico de Ensino Médio em Saúde, com habilitação em Laboratório em Biotecnologia em Saúde.

Orientador: **Silvio Valle**

Rio de Janeiro
Dezembro de 2006

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha avozinha Isaura, ou minha estrela como eu costumava chamá-la, por ser meu anjinho da guarda e estar sempre me protegendo e me iluminando. Mesmo não estando mais entre nós você continua sempre viva em meu coração. Me ouvindo, me consolando, me dando força e motivação para seguir sempre em frente e lutar pelo que acredito. Você foi responsável pelos momentos mais felizes da minha vida. Mais que uma avó você foi uma verdadeira mãe para mim. Te amo muito vovó!!!

Agradecimentos

Primeiramente, como não poderia deixar de ser, agradeço a Deus por toda a força, luz e benção que tem me dado ao longo de minha vida para que pudesse tirar sempre algum aprendizado de todas as experiências que vivi – fossem elas boas ou ruins - e nunca desistir diante das dificuldades e dos obstáculos que enfrentei. Agradeço a ele também pela vida que me deu, por todas as pessoas especiais que colocou em meu caminho e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Em segundo lugar, agradeço à minha irmã Priscila, ou meu bebê, como preferir, por ser essa pessoa tão iluminada, inteligente, carinhosa, companheira, que foi um verdadeiro presente de Deus em minha vida. Mais que uma irmã, ela é minha amiga, confidente, cúmplice, uma luz no meu caminho, que torna minha vida cada dia mais feliz simplesmente pelo fato de existir. Obrigada por toda a ajuda que me deu sempre que precisei. Te amo, bebezinho!!!

Agradeço também aos meus pais pela educação que me deram e por buscarem sempre o que é melhor para mim – muitas vezes tirando deles para me dar. Obrigada por serem pais tão carinhosos, humildes, por me darem tanta força, da maneira de vocês, e por me amarem tanto, afinal sou a única caçula, não é!!! Como já disse um dia, se tivesse que escolher meus pais, com certeza escolheria vocês.

Não esqueço e nem poderia, é claro, esquecer de agradecer aos meus amigos que, muito mais do que isso, são uma segunda família para mim. Eles, que acompanharam minha trajetória ao longo desses três anos, que me viram rir e chorar, que estiveram ao meu lado nos momentos mais felizes e nos mais difíceis, são peças fundamentais na minha vida, sem as quais eu não conseguiria mais viver. Em especial, me perdoem os que não forem mencionados, quero agradecer a Deby (miga), Mila (minha filhota), Naty, Dan (meu filhote), Vitinho, Cintia, Enio, Kdu, Mylla, Vinny, Nessa (minha manitcha), Debinha, Pampam, Tatá, Diego, Vivi, Val, Ju e Paulinha.

Quero deixar meus agradecimentos a todas as pessoas especiais que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente na elaboração desta

monografia. Acredito que todo elogio, toda crítica, todo incentivo que recebi serviram como aprendizado e motivação para continuar meu trabalho. Mesmo aos que muitas vezes me magoaram com palavras ou atitudes (muitas vezes de descrença) agradeço por tudo, pois serviu para o meu fortalecimento, não só como profissional, mas principalmente como ser humano.

Agradeço a todos os meus familiares, ao meu orientador Silvio Valle por toda sabedoria e incentivo que me transmitiu ao longo de nossos encontros e à minha querida Carol que mais do que nossa estagiária (como o Silvio a chamava) foi uma verdadeira amiga pra mim.

Agradeço à Elezer por toda paciência e ensinamentos, à Etelcia pela qual tenho uma enorme admiração e cuja ajuda foi de grande importância para a construção e organização de meu pensamento. A minha supervisora de estágio Glorinha por saber me entender e por me apoiar durante todo esse segundo semestre e a todos os profissionais que conheci na Fiocruz que contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu amor, Diogo. Uma pessoa muito sábia, dedicada, carinhosa, companheira, persistente, com a qual tenho o prazer de dividir minha vida e de poder aprender sempre mais. Agradeço por todas as horas de conforto, pelos ensinamentos, por toda a paciência, calma e força que sempre me deu, por me amar do jeito que sou e por ter se tornado alguém tão importante na minha vida. Amor, NEOQEAV.

*“A tecnologia já existe e se não a
utilizarmos perderemos o bonde da história”.
(Reflexões sobre a Biotecnologia
na medicina veterinária).*

Resumo

Este trabalho trata da análise da produção de biofármacos a partir de animais transgênicos com foco na eritropoetina alfa humana recombinante..

Explicarei o conceito de transgênicos bem como darei um breve histórico deste termo. As aplicações dos transgênicos e as técnicas de transgenia também serão analisadas, tendo, entretanto, um foco especial naquelas utilizadas para a produção da eritropoetina humana recombinante.

No que diz respeito à eritropoetina, farei um estudo comparativo entre a eritropoetina humana e a eritropoetina humana recombinante bem como explicarei como é sua atuação, propriamente dita, no organismo humano.

A anemia, síndrome causada por diversos tipos de doenças, também será analisada com o objetivo de explicar os males causados por esse decréscimo de substância no corpo.

Por fim, encerrarei tratando da questão de biofármacos através de seu conceito, suas técnicas de produção e de sua situação no mercado mundial e no mercado brasileiro.

Sumário

1.	Lista de Ilustrações.....	09
2.	Introdução.....	10
3.	Animais Transgênicos.....	12
4.	Eritropoetina.....	36
5.	Anemia.....	40
6.	Biofármacos.....	44
7.	Considerações finais.....	54
8.	Referências.....	55

Lista de Ilustrações

- 1. Figura 1:** Micromanipulador acoplado ao microscópio invertido (em cima à esquerda); agulhas de sucção e injeção do sistema de micromanipulação (em cima á direita); oviduto retirado de uma fêmea doadora com massa de embriões (embaixo à esquerda); microinjeção de DNA em um embrião contendo os pronúcleos (embaixo à direita)..... 25
- 2. Figura 2:** Técnica de Microinjeção Pronuclear..... 27
- 3. Tabela 1:** Produtividade de leite mundial..... 32
- 4. Figura 3:** Etapas de um sistema de leite expandido..... 48
- 5. Figura 4:** Processo tradicional e processo de leite expandido para a purificação de proteínas..... 49

Introdução:

Devido ao seu elevado custo, a produção de animais transgênicos (animais geneticamente modificados) só se torna economicamente viável quando o produto final a ser produzido tem um alto valor no mercado, podendo oferecer um retorno aos investimentos aplicados. Na última década, surgiram diversas empresas de Biotecnologia cujo principal foco é a produção de animais transgênicos visando à síntese de biofármacos. Essas substâncias são de grande interesse para a indústria farmacêutica, uma vez que tratam anualmente com um mercado de bilhões de dólares.

O conceito de biofármaco está relacionado a moléculas geneticamente modificadas. Essa alteração genética se dá pela inserção de genes modificados em microorganismos ou células animais cultivadas em larga escala por laboratórios especializados de alta tecnologia. O foco dessa produção é a obtenção de novas proteínas com características específicas que se revelem mais vantajosas que as naturais para determinadas funções no organismo.

Com os avanços da biologia molecular, uma nova técnica vem sendo utilizada para a produção de biofármacos: a produção de biofármacos a partir de biorreatores vivos (animais transgênicos). Dentre os quais podemos citar a produção de eritropoetina alfa humana recombinante.

A eritropoetina alfa humana recombinante é um biofármaco que vem sendo desenvolvido há algum tempo por diversas empresas (GTC, Embrapa e tc) especializadas na produção de hormônios sintéticos. Assim como o próprio hormônio glicoprotéico endógeno, esse biofármaco tem como principal função a regulação da produção e diferenciação de eritrócitos no sangue.

O decréscimo de hemácias circulantes e alguns processos oxidativos dificultam a passagem de oxigênio para todo o corpo. Isso desencadeia a produção da eritropoetina realizada pelos rins, que irá acionar o mecanismo de produção de hemácias realizado pela medula óssea.

Indivíduos acometidos de insuficiência renal crônica, Aids ou sob tratamento de quimioterapia ou radioterapia acabam por desencadear processos anêmicos, de severidade variável, devido à redução da produção do hormônio

pelos rins. A eritropoetina alfa humana recombinante será administrada como uma molécula terapêutica no tratamento desta doença.

Esse medicamento é caracterizado pelo Ministério da Saúde como um medicamento excepcional (dentre os outros 216 fármacos) devido a seu alto custo para o governo. Isso se deve principalmente ao maquinário, de preços exorbitantes, utilizado para a fabricação dos mesmos.

Com o avanço e a difusão das técnicas para a produção deste através de OGMs os custos para o governo ficarão reduzidos mais do que pela metade o que acabará favorecendo a população que terá a sua disposição medicamentos mais baratos e com muito mais facilidades de obtenção.

A produção do biofármaco a partir de animais transgênicos terá um grande impacto governamental, em termos de redução de gastos com importações, e em termos de gastos durante a produção, quanto social uma vez que a população terá maior acessibilidade ao produto. Além disso, sua produção em animais transgênicos garante um produto com baixo custo e elevado grau de qualidade.

1. Animais Transgênicos

1.1 Introdução

Conta a mitologia grega que Poseidon fez sair do mar um touro belíssimo e Minos, rei de Creta, prometera sacrificá-lo ao deus das águas, mas ficou tão encantado com o animal que decidiu conservá-lo em seu rebanho. Poseidon, irado, inspirou então em Pasífae, esposa de Minos, uma avassaladora paixão pelo animal, que transtornada de desejo, convenceu o engenhoso Dédalo, ateniense exilado em Creta, a construir uma vaca oca de madeira, dentro da qual a rainha se escondeu. O modelo era tão perfeito e tão belo que enganou o touro, e assim Pasífae conseguiu unir-se a ele. Dessa estranha união, veio à luz uma criança com corpo de homem e cabeça de touro, o Minotauro, de extrema ferocidade e que se alimentava de carne humana. Minos, aterrado e envergonhado, mandou construir um intrincado labirinto, do qual ninguém conseguia sair, e nele prendeu o Minotauro.

Desde a antiguidade, a mistura de espécies vem fascinando e aterrorizando os homens (medicina veterinária – artigo). Contudo, embora na atualidade o termo transgênico ainda cause estranhamento e até certo receio no que diz respeito às suas aplicações, ele está cada vez mais inserido em nossa realidade. A Ciência, por sua vez, busca introduzir novas técnicas que viabilizem a produção de alimentos e medicamentos para atender a demanda da população no que diz respeito a continuar se beneficiando com os recursos naturais que dispõe o nosso planeta.

As técnicas para a geração de modelos transgênicos representam, portanto, uma das mais promissoras biotecnologias tanto para fins comerciais como para diversas áreas da pesquisa básica e clínica. (Pesquero, João Bosco). Novas características podem ser agregadas aos animais bastando somente identificá-las. No entanto, para que isso ocorra é necessário decifrar o código genético, ou seja, seqüenciar o genoma de tais animais. É a partir da genômica que poderemos identificar diferentes características ao mesmo tempo e definir com precisão os alvos a serem estudados.

1.2 Conceito

Os termos “Transgênicos” e “Organismos Geneticamente Modificados (OGMs)” são uns dos grandes marcos da Biotecnologia nos dias de hoje. A transgenese consiste em adicionar, inativar ou substituir genes nos genomas dos seres vivos. É a possibilidade de gerar novas características em determinado organismo sem alterar as já existentes.

Animais transgênicos podem ser definidos como produtos ou organismos cujo patrimônio (genoma) foi artificialmente manipulado pela introdução, modificação ou deleção de um gene (transformação gênica), alterando todas as células do organismo de tal forma que a modificação genética seja transmitida aos descendentes.

Em outras palavras, são aqueles animais que possuem no genoma de suas células germinativas ou somáticas, seqüências de DNA exógeno (de outra espécie ou não) introduzidas por intervenção humana ou cujo patrimônio genético tenha sofrido qualquer alteração engendrada e executada pelo homem. O gene transferido para animal denomina-se transgene.

Para ser considerado um animal transgênico, além de expressar a seqüência de DNA exógeno deve ser capaz de, quando acasalado com animais não-transgênicos, produzir progênes que herdarão o transgene de forma mendeliana, devido à incorporação deste nas células germinativas, e apresentar a expressão do mesmo em grande número de animais.

O termo transgênico refere-se a duas estratégias básicas de construção de modelos animais: “ganho de função” e “perda de função”:

- transgênicos por adição ou expressão exacerbada de um gene, onde várias cópias desse gene são adicionadas ao genoma;
- transgênicos por knock-out ou knockin;

1.3 Histórico

As proteínas são o verdadeiro “petróleo” da biotecnologia. Durante grande parte de sua história de 30 anos, o setor luta para conseguir um suprimento

regular, tirando o máximo dessas “commodities” de moléculas grandes de linhas de células extraídas do ovário de hamsters e fontes similares.

Antes do aparecimento das técnicas de Biologia molecular aplicadas à genética os únicos modelos animais disponíveis para se estudar a regulação, a função de genes e a compreensão dos sistemas biológicos de mamíferos eram os mutantes espontâneos (casual) ou os mutantes obtidos por agentes químicos (induzido).

Pouco antes da década de setenta, o termo transgênico começou a ser utilizado na literatura científica em inúmeros estudos mostrando a introdução de fragmentos de DNA *in vitro*¹ em células somáticas procarióticas (sem carioteca) e eucarióticas (com carioteca) e a indução da expressão de genes em vários tipos celulares (células do tecido nervoso e do sangue).

Em 1968, Richard L. Gardner isolou células de um embrião de camundongos, injetou em outros embriões e os transferiu para o útero de fêmeas prenhas, gerando camundongos com células vindas dos dois embriões, os chamados animais quimeras. A manipulação dos embriões *in vitro* foi indispensável para o sucesso de todas as técnicas transgênicas.

A introdução de material genético exógeno em embriões de camundongos ocorreu antes do aparecimento das técnicas de DNA recombinante, em 1974, quando Rudolf Jaenisch e Beatriz Mintz observaram a presença de DNA viral exógeno em diversos tecidos de camundongos após a microinjeção do vírus SV40 no interior da cavidade blastocística de embriões em estágio inicial de desenvolvimento. Este foi o primeiro experimento com transgenese animal. Em 1975, foram produzidos embriões infectados com retrovírus cuja seqüência de DNA viral foi integrada ao genoma (Jaenisch e col.).

Entretanto, nestes experimentos não foi observada integração do gene exógeno nas células germinativas uma vez que não houve transmissão aos descendentes. Estudos subseqüentes (1976/1977) demonstraram o sucesso na integração de DNA exógeno nas células germinativas quando embriões de camundongos foram microinjetados com o retrovírus² da leucemia murina de

¹ Todos os fenômenos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado de um laboratório;

² Vírus de RNA que contém a enzima transcriptase reversa que permite a sua propagação via integração de dupla cadeia, no genoma da célula hospedeira;

Moloney (M-MuLV) com transmissão da alteração genética aos descendentes gerando a primeira linhagem de camundongos transgênicos.

Em 1980, Gordon e cols introduziram a técnica de microinjeção pronuclear³ de uma construção viral em embriões recém fertilizados para a geração de um camundongo transgênico por adição, entretanto não foi observada transmissão aos descendentes.

Em 1982, a primeira linhagem de camundongos transgênicos produzida por adição pela técnica de microinjeção pronuclear foi caracterizada por Richard Palmiter, da Universidade da Pensilvânia, Ralph Brinster da Universidade de Washington e colaboradores. Nesse estudo inédito, os pesquisadores tinham como objetivo produzir animais com um fenótipo⁴ alterado com relação aos irmãos não-transgênicos, no caso, animais apresentando maior tamanho. Para isso, construíram um DNA (transgene) contendo uma cópia do gene do hormônio de crescimento de ratos sob o controle do promotor do gene de metalotioneína capaz de digerir a expressão do gene para vários tecidos do animal.

Centenas de cópias desta construção de DNA foram microinjetadas em pronúcleos de embriões de camundongos e, posteriormente, os mesmo foram transferidos para mães de aluguel. Dos vinte e um camundongos nascidos, sete carregavam a construção do gene exógeno, sendo que seis se desenvolveram mais rápido e atingiram um tamanho duas vezes maior que os irmãos não-transgênicos. Esse resultado foi um marco no desenvolvimento de animais transgênicos, despertando grande atenção na mídia em todo o mundo quando o camundongo “gigante” foi publicado na capa da revista científica Nature. (PESQUERO, João Bosco, Animais Transgênicos).

Enquanto os primeiros animais transgênicos eram desenvolvidos, outros pesquisadores, em 1981, isolaram pela primeira vez células embrionárias totipotentes capazes de gerar todos os tecidos do embrião. E, 1986, Gossler e colaboradores geraram os primeiros camundongos quiméricos obtidos a partir de células totipotentes, provando definitivamente que estas células eram capazes de gerar um indivíduo completo.

³ Núcleo dos gametas;

⁴ Características observáveis de um organismo;

Em 1987, dois grupos de pesquisadores obtiveram êxito na geração de mutações sítio específicas em células-tronco embrionárias por recombinação homóloga⁵. Isso possibilitou a geração dos primeiros modelos *knock-out*⁶ de camundongos por Schwartzberg e colaboradores, demonstrando a viabilidade de transmissão de uma mutação introduzida em um gene para as células germinativas por recombinação homóloga. Esses animais foram produzidos por mutação dirigida do gene da "hipoxantina fosforibosil transferase"⁷.

Esta mesma técnica possibilitou a geração dos primeiros modelos *knockin*⁸ em que um gene de interesse é modificado em células-tronco embrionárias em cultura e, posteriormente, integrado no genoma de camundongos.

A idéia de produzir drogas transgênicas ocorreu a muitos cientistas em meados da década de oitenta, quando esse novo setor começou a enfrentar o desafio de fabricar proteínas complexas: assegurar que essas grandes moléculas tivessem a forma adequada e com todos os açúcares nos locais corretos, na superfície dos aminoácidos das proteínas. Em busca de maior eficiência, os pesquisadores notaram que as glândulas mamárias de vacas, coelhas e cabras, entre outras, poderiam tornar-se "fábricas" ideais de proteínas, devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de proteínas complexas. (*Scientific American Brasil – artigo*).

1.4 Técnicas de transgenia

Com os avanços na área de biologia molecular (desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante) da engenharia genética capaz de desenvolver vetores e construir DNAs recombinantes como moldes que se encaixam perfeitamente aos anseios dos pesquisadores, assim como as demais biotecnologias (microinjeção pró-nuclear, transferência nuclear, cultivo de CTE⁹ e etc.) tem sido possível a geração , cada vez mais freqüente, de animais transgênicos.

⁵ Quando um gene específico pode ser modificado ou inativado no genoma;

⁶ Quando um gene endógeno é inativado;

⁷ Enzimas que participam do processo metabólico do ácido úrico;

⁸ Gene previamente modificado e substituído no genoma;

⁹ Células Tronco Embrionárias;

Durante os últimos anos, várias técnicas de transgenese têm sido utilizadas para a introdução de genes em células germinativas e células somáticas nas mais diversas espécies de animais. A transgenese consegue introduzir qualquer construção de DNA no genoma determinado. Ou seja, a manipulação realiza-se em genes individuais.

Nessa linha, estão as técnicas de transgene e knock-out - integração de cópias adicionais de genes mutados e troca de um gene endógeno específico por um gene mutado, respectivamente.

Dependendo da técnica aplicada, o animal produzido pode constituir-se somente de células que carregam o transgene (denominados animais transgênicos) ou de conjuntos de células com ou sem o transgene (animais quiméricos ou mosaicos).

Os animais quiméricos são constituídos de células derivadas de um único blastocisto original. As técnicas que envolvem a introdução de células transformadas em um embrião receptor darão origem a animais quiméricos.

Já as técnicas que transfectam diretamente as células do animal a ser transformado produzirão animais mosaicos. Nas duas situações, os animais transgênicos só serão obtidos após o cruzamento de indivíduos F1 com animais não-transgênicos.

Se as células transgênicas contribuem para a formação da linhagem da quimera, a progênie, após o acasalamento, deverá conter 25% de animais totalmente derivados das células transgênicas inseridas, sendo, portanto considerado um animal transgênico.

No total podemos distinguir nove técnicas diferentes para a produção de animais transgênicos:

- Infecção por retrovírus;
- Microinjeção pronuclear
- Injeção de Células Tronco Embrionárias e Células Germinativas Embrionárias previamente expostas a DNA exógeno, na cavidade de blastocistos;
- Transferência de genes mediada por espermatozóides (vetores);

- Introdução de complexos de Lipossomas¹⁰ para introduzir DNA clonado em células de embriões;
- Eletroporação¹¹;
- Biobalística¹² ou Bombardeamento de partículas;
- Transferência nuclear com células somáticas, tronco ou germinativas embrionárias transfectadas;
- Injeção de DNA em testículo para produzir células tronco espermatogênicas transgênicas;

(Manual de Biossegurança – Animais Geneticamente modificados e a Legislação brasileira de Biossegurança).

Todas as técnicas mencionadas possuem suas vantagens e suas desvantagens. Quanto à produção do animal transgênico propriamente dita, não há um protocolo único a ser seguido. Para cada espécie animal, genes de interesse e objetivos a serem alcançados com a produção há uma abordagem diferente. O domínio da transgenia em diferentes espécies animais é importante e cada espécie terá sua aplicação específica.

Neste estudo, estaremos abordando a produção da Eritropoetina alfa humana recombinante em animais transgênicos. Para este tipo de enfoque onde será expressa uma proteína de interesse comercial, o modelo de animal utilizado é o de superexpressão de um gene, e a técnica utilizada é a de microinjeção pronuclear.

Assim sendo, abordaremos mais a fundo somente este tipo de produção de animal transgênico (por adição) e está técnica de transgenia, em detrimento das demais técnicas de maneira a não tornar o trabalho extensivo e cansativo (por se tratar de um assunto complexo que exigiria maior enfoque em cada método de produção).

¹⁰ Estruturas pequenas, consistindo em camadas de lipídios semelhantes a lipídios de membrana capazes de proteger o DNS exógeno da digestão por proteases e DNAses;

¹¹ Pulso elétrico de alta voltagem e duração muito curta que provoca queda rápida da membrana células deixando os poros livres para que o gene de interesse penetre na célula e atinja o núcleo, se incorporando ao genoma;

¹² Método físico que utiliza microprojéteis acelerados para introduzir o DNA em tecidos e células;

1.4.1 Transgênicos por adição

Conceituam-se transgênicos por adição aqueles animais nos quais várias cópias de um gene (endógeno ou de uma outra espécie) foram adicionadas ao seu genoma. Na maioria das vezes esses animais apresentam superexpressão do gene adicionado e, conseqüentemente, aumento da produção da proteína por ele codificada provocando um ganho de função.

Uma característica importante deste modelo é que a integração do transgene ocorre aleatoriamente no genoma, ou seja, sua localização dentro do genoma não é pré-estabelecida no momento da inoculação do transgene podendo ser letal ao embrião ou até mesmo ao indivíduo depois de adulto caso haja inativação de algum gene importante por conseqüência da adição do novo gene.

Este fato pode levar ao aparecimento de um fenótipo independente do transgene, no animal transgênico, o que exige a necessidade da comparação do fenótipo alterado em diferentes linhagens mutantes. Além disso, o número de cópias do gene inserido no genoma não pode ser controlado, bem como o nível de expressão do mesmo, o qual é dependente do número e da posição de inserção do genoma. (PESQUERO, João Bosco – Animais Transgênicos).

Ao contrário das mutações espontâneas, na transgenese por adição é possível identificar o gene mutado, o que permite sua caracterização molecular e a determinação de sua função no desenvolvimento do organismo cujo genoma foi modificado.

A técnica de adição ou superexpressão é uma das estratégias básicas na produção de animais transgênicos, denominada transgenese de “ganho de função” que se divide em: nova expressão, expressão exacerbada, regulação alterada, RNA antisense¹³ e mutagênese por inserção.

¹³ Moléculas que modificam a expressão dos genes;

1.4.2 Microinjeção Pronuclear

Atualmente, a microinjeção pronuclear é a técnica utilizada pela grande maioria dos centros para a geração de animais transgênicos por adição. Esta técnica, denominada transgenese clássica ou convencional, permite a introdução de seqüências longas de DNA recombinante de diferentes espécies no genoma de mamíferos, produzindo altos níveis de expressão e integração do transgene nas células germinativas.

Utilizando-se um micromanipulador (agulha de diâmetro extremamente fino) acoplado a um microscópio invertido de alta resolução, centenas de cópias de uma construção de DNA (endógeno ou de outra espécie) são injetadas diretamente em um dos pronúcleos (masculino ou feminino) de embriões recém fecundados (oócitos) coletados do oviduto¹⁴ de fêmeas doadoras superovuladas¹⁵.

Os pronúcleos são os núcleos materno e paterno provindos do óvulo e do espermatozóide, respectivamente, antes que se unam para formar um único núcleo contendo o genoma do novo indivíduo. Normalmente, múltiplas moléculas de DNA tendem a integrar-se estavelmente no genoma do hospedeiro, em um único sítio de inserção.

Após a microinjeção os embriões permanecem em cultivo *in vitro* até serem transferidos para o oviduto de uma fêmea receptora pseudo grávida previamente acasalada com um macho vasectomizado¹⁶ que levará a termos o nascimento dos possíveis transgênicos posteriormente genotipados¹⁷ quanto à presença do gene exógeno. (GONSALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; *Biotécnicas aplicadas á reprodução animal, 2002*).

Essa técnica foi desenvolvida primeiramente em camundongos. A injeção pronuclear foi posteriormente responsável pela primeira tentativa bem sucedida de transgenia em animais de produção como coelhos, ovelhas e suínos contendo o gene do crescimento humano. Também foi por meio dessa

¹⁴ Local de “trânsito” para o óvulo e o espermatozóide;

¹⁵ Método de estimular diversos folículos terciários até o estágio de ovulação;

¹⁶ Método de esterilização cirúrgico masculino;

¹⁷ Constituição genética de um organismo em relação às características consideradas herdando-as dos seus progenitores;

técnica que surgiu o primeiro bovino transgênico contendo o gene da lactoferrina¹⁸ humana.

Todo o animal transgênico positivo originado de um embrião microinjetado é classificado como um fundador de uma linhagem transgênica única que difere de outro fundador quanto ao local de inserção e número de cópias do transgene no genoma. A porcentagem de embriões injetados que se desenvolveram em animais transgênicos varia 1 a 3% em caprinos; 0,3 a 4,0% em suínos; 0,1 a 4,4% em ovinos a 1,7 a 3,2% em bovinos.

- ❖ **Vantagens:** Eficiência relativamente alta para gerar linhagens de animais transgênicos que expressem o transgene de maneira correta, ou seja, em todas as suas células inclusive nas germinativas, o que garante a certeza de uma prole transgênica. O índice de animais que contém o gene inserido em seu genoma é maior que nos outros métodos. É a mais simples e com os melhores resultados. Permite um controle mais apurado além de permitir uma produção em série de animais transgênicos;

- ❖ **Desvantagens:** Esta técnica é limitada. O método não pode ser aplicado a embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento. A detecção do sítio de inserção no cromossomo hospedeiro é difícil, pois o DNA se integra em cópias múltiplas. Também ocorrem rearranjos causados no genoma da célula microinjetada e introdução de várias cópias do transgene, originando animais com expressão variável do transgene. Além disso, a técnica é mais cara e exige profissionais especializados.

(PESQUERO, João Bosco – Animais Transgênico).

¹⁸ Proteína globular muito abundante em fluídos mucosos (lágrimas, saliva e etc);

1.4.3 Etapas da Microinjeção Pronuclear

➤ Construção do DNA

O sucesso da técnica de microinjeção pronuclear irá depender, principalmente, da qualidade do DNA que será construído e, posteriormente, injetado nos embriões. Inicialmente, o gene que se pretende adicionar ao organismo do animal é clonado e a seqüência de nucleotídeos (compostos por base nitrogenada, pentose e fosfato) da região codificadora¹⁹ deve ser conhecida, pois esta seqüência será responsável pela formação da proteína a ser produzida pelo animal transgênico.

O DNA construído deve conter algumas seqüências para que possa ocorrer a ativação do gene, como a seqüência promotora (sequimentos especiais de DNA que controlam a ativação dos genes), uma região codificadora do gene (no caso deste estudo, uma proteína) de interesse e uma seqüência da região 3' do gene não traduzida.

A especificidade da expressão do gene integrado é obtida mediante o uso de promotores que dirigem a expressão do gene, podendo ser para todos os tecidos ou para tecidos específicos (cardíaco, nervoso e ect.).

Quando se cria um transgene, é comum ter que substituir a seqüência promotora do gene a ser transferido para outro organismo. No lugar dessa seqüência promotora que foi retirada, coloca-se uma outra seqüência capaz de regular e comandar a correta expressão desse gene no organismo que receberá o transgene.

No primeiro caso, a expressão do gene acontece em uma grande variedade de tecidos do organismo e o objetivo é conhecer o efeito da superexpressão geral do gene, ou seja, em todo o animal. Um exemplo disto é o promotor do gene da metalotioneína²⁰ utilizado na geração do camundongo transgênico gigante produzido em 1982, na Universidade da Pensilvânia.

No segundo caso, o promotor dirige a expressão do transgene para determinados tecidos ou células (mais específico), como por exemplo o

¹⁹ Consiste na porção de um genoma que é traduzido para RMA que posteriormente vai proporcionar codificação das proteínas;

²⁰ Proteína de baixo peso molecular com alto conteúdo de cisteína;

promotor da cadeia leve de miosina²¹ que dirige a superexpressão do gene do receptor B2 de cininas²² especificamente para o tecido cardíaco do animal estudado. (*PESQUERO, João Bosco – Animais Transgênicos*).

O DNA utilizado para a microinjeção pronuclear deve ser construído em tampão²³ específico e depois purificado para eliminar qualquer resíduo e garantir a ausência total de contaminantes como fenol²⁴, etanol²⁵ e algumas enzimas, as quais poderiam vir a danificar o embrião. As moléculas de DNA utilizadas para a microinjeção devem estar na forma linear e o tamanho do transgene não deve exceder 50kb.

Como já vimos anteriormente, uma das desvantagens da técnica de microinjeção pronuclear é o fato de ser muito difícil controlar o volume de DNA injetado no pronúcleo. Contudo, estima-se que são introduzidos cerca de 1-2 picolitros²⁶/injeção por pronúcleo. A única variável a ser controlada é a concentração de DNA para injeção que deve ser de 1-2 ng/μL, o que corresponde a 200-400 moléculas de DNA/pL para um fragmento de 5kb. (*GONSALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; Biotécnicas aplicadas á reprodução animal, 2002*).

➤ **Superovulação de fêmeas doadoras**

A microinjeção precisa de uma grande quantidade de óvulos sendo produzida, uma vez que, para cada tentativa de geração de animal transgênico, pelo menos 100 embriões recém fertilizados são injetados. A administração intraperitoneal de gonadotrofinas em fêmeas pré-púberes (estágio antecedente a puberdade) com idade entre 3 e 5 semanas leva à superovulação, com uma média de 30 óvulos produzidos por cada fêmea.

A técnica de superovulação é responsável por estimular diversos folículos terciários, também conhecidos como folículos ovarianos, (responsáveis pela produção de estrógeno e progesterona, quando no estágio final) até o estágio

²¹ Miofibrila que quando se combina com a actina em presença de ATP produz movimentos celulares;

²² São proteínas do plasma sanguíneo que influenciam as contrações dos músculos lisos;

²³ Substância que resiste a variações bruscas de pH;

²⁴ Função orgânica obtida principalmente através da extração de óleos;

²⁵ Pertence à classe dos álcoois e é solúvel em água;

²⁶ Um trilionésimo de litro;

de pré-ovulação-ovulação. Seu objetivo final é obter um grande número de embriões que possuam um elevado potencial de prenhes.

As gonadotrofinas são hormônios glicoprotéicos secretados pelas células da placenta cuja função primária é manter o corpo produzindo hormônios que serão necessários para dar suporte ao primeiro trimestre da gravidez. Estas são produzidas pelo organismo logo após a fecundação e implantação do óvulo no útero. A produção de hCG (Gonadotrofina Cariônica humana) é o sinal que o embrião manda para a circulação para que o organismo materno reconheça a gestação.

Inicialmente cada fêmea recebe 5UI²⁷ de gonadotrofina cariônica obtida de éguas prenas que mimetiza o hormônio estimulante dos folículos e, após 42 a 48 horas, 5UI de gonadotrofina cariônica humana (hCG) são administradas mimetizando o pico do hormônio luteinizante (LH), ou seja, controla-se o momento da ovulação com a aplicação exógena de LH, que amadurece os folículos e induz a liberação dos óvulos para o oviduto.

No mesmo dia, após a aplicação do hCG, cada fêmea é colocada separadamente com um macho fértil (não-transgênico) e, no dia seguinte, faz-se a verificação da presença de tampão vaginal decorrente da cristalização do sêmem após a copulação.

Em geral, a técnica de superovulação obtém resultados satisfatórios. Mais de 80% das fêmeas apresentam tampão positivo, após a copulação, as quais são sacrificadas por deslocamento cervical e procede-se a abertura da cavidade abdominal com a retirada dos ovidutos e dos embriões que são lavados em meio de cultura e transferidos para uma estufa, onde ficam mantidos até o momento da microinjeção nos pronúcleos. (*PESQUERO, João Bosco – Animais Transgênicos*).

➤ **Microinjeção de pronúcleos**

Durante o estágio de embriões os pronúcleos (masculino e feminino) são visíveis. Entretanto, o pronúcleo masculino é geralmente escolhido para

²⁷ Unidade Internacional;

receber o transgene por ser maior e localizar-se mais próximo à membrana citoplasmática do embrião, o que facilita a microinjeção.

O micromanipulador acoplado a uma micropipeta mantém o embrião fixo através de sucção contínua e controlada. Com o auxílio do micromanipulador, uma microagulha contendo o DNA é introduzida em um dos pronúcleos e um volume de cerca de 2 picolitros é injetado provocando um aumento do pronúcleo de cerca de 30%. (*Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n°26).

Os embriões microinjetados são transferidos para o oviduto de receptoras ou “mães de aluguel” pseudo-grávidas que são preparadas acasalando-se fêmeas em estro natural com idade mínima de seis semanas com machos vasectomizados ou geneticamente estéreis. Depois é feita uma análise do DNA para comprovar se a transgene foi alcançada com sucesso.

Várias linhagens podem ser utilizadas, entretanto, normalmente são usadas fêmeas albinas que apresentam cor de pelagem distinta das doadoras, o que garante que qualquer animal nascido seja realmente derivado dos embriões doados.

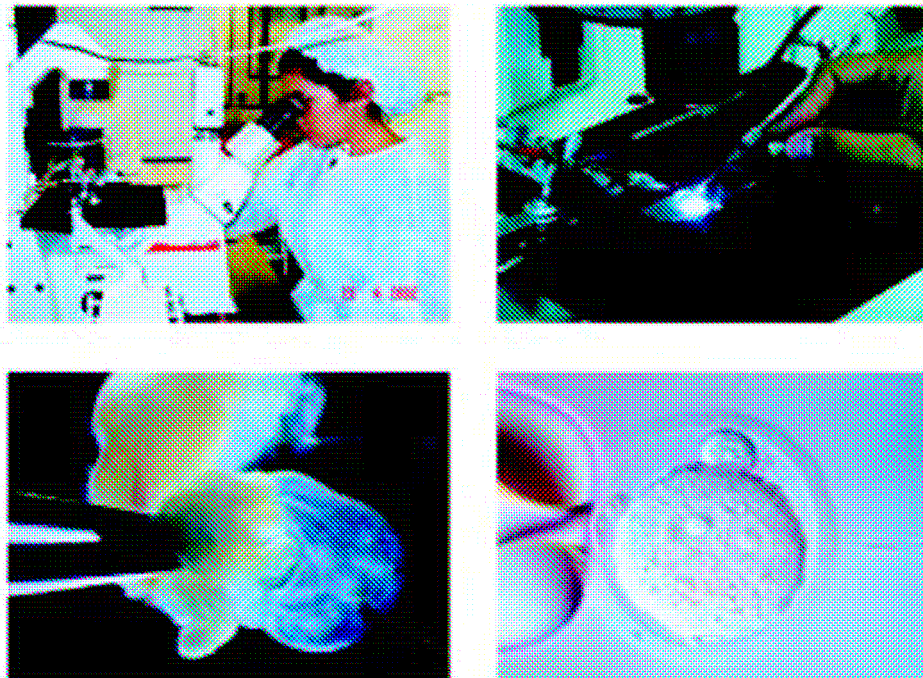


Figura 1: Micromanipulador acoplado ao microscópio invertido (em cima à esquerda); agulhas de sucção e injeção do sistema de micro-manipulação (em cima à direita); oviduto retirado de uma fêmea

doadora contendo massa de embriões (embaixo à esquerda); micro-injeção de DNA em um embrião contendo os pronúcleos (embaixo a esquerda);

Fonte: Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – m° 26 – julho/agosto 2002.

➤ **Transferência de embriões para o oviduto**

Os embriões podem ser transferidos para fêmeas receptoras pseudo grávidas de 0,5 até 3,5 dias após o acasalamento desde que estas estejam prontas para levar a gestação adiante. Tanto a idade embrionária como as condições uterinas da fêmea receptora devem ser analisadas e cuidadosamente sincronizadas.

Embriões de uma célula até o estágio da mórula²⁸ (16 células) são transferidos para o oviduto de fêmeas pseudo grávidas após 0,5 dias do acasalamento. A transferência embrionária pode ser realizada no mesmo dia da microinjeção ou no dia seguinte, quando os embriões já se dividiram atingindo o estágio de duas células.

Antes da transferência da célula embrionária para o oviduto é realizada uma avaliação do embrião de forma quantitativa, baseada no número de células na qual este já se dividiu (uma vez que o limite é até o estágio da mórula) e qualitativa, baseada na qualidade morfológica do embrião que deve apresentar citoplasma claro, zona pelúcida²⁹ intacta e ausência de fragmentos citoplasmáticos. (*Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n° 26).

A transferência é feita inserindo-se uma pipeta, que contém os embriões, na porção inicial do oviduto e depositando-os lentamente. Aproximadamente 10 dias após o nascimento, a ponta da cauda dos filhotes é cortada, o DNA é extraído e a análise do transgene no genoma dos filhotes é realizada por diversas técnicas, dentre elas as técnicas de *Southern blot* ou de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

A técnica de *Southern blot* requer fragmentos de DNA conhecidos como sondas hibridizadoras porque se ligam em regiões do DNA cujas seqüências

²⁸ Grupo de células agregadas que corresponde ao primeiro estágio de vida do embrião;

²⁹ Estrutura glicoprotéica que envolve o óvulo protegendo-o da penetração de mais de um espermatozóide;

fazem parte exclusivamente do transgene. Já na técnica de PCR são necessários pequenos oligonucleotídeos³⁰ específicos para dar início à amplificação (de quase todos os pedaços do DNA) de múltiplas cópias do transgene.

Em ambas as técnicas, as amostras de DNA resultantes são submetidas à eletroforese³¹ em gel de agarose, produzindo bandas visíveis sob a luz ultravioleta ou em filmes de raio X. Conforme o êxito de todo o procedimento de transgenese, aparecerá no gel uma banda de migração correspondente à construção do DNA integrado no genoma.

O primeiro animal nascido contendo o transgene é chamado de Fundador e é heterozigoto uma vez que a integração do DNA exógeno se dá em apenas um dos alelos cromossômicos. (*PESQUERO, João Bosco – Animais Transgênicos*).

³⁰ Fragmento curto de uma cadeia simples de ácido nucléico responsável pelo início dos processos que geram cópias da molécula original de ácido nucléico;

³¹ Migração de partículas em determinado gel de acordo com o seu tamanho e a sua carga elétrica;

Figura 2: Técnica de Microinjeção Pronuclear;

Fonte: Jornal da paulista – pesquisa <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed165/pesq1.htm>

➤ **Obtenção de linhagem homozigótica**

Para que seja estabelecida uma linhagem transgênica é necessária a identificação de indivíduos homozigotos eliminando assim a necessidade de genotipar cada geração nascida posteriormente. Existem vários métodos de identificação disponíveis, entre eles a quantificação do número de cópias do

transgene integradas, a quantificação do produto transgênico ou fenótipo, hibridação³² *in situ* no núcleo, cruzamento-teste e etc.

O cruzamento-teste é um método definitivo, pois a transmissão do transgene para os descendentes é de 100%; entretanto é um método caro e trabalhoso uma vez que a quantidade de indivíduos genotipados é grande.

Depois de atingir três semanas após o seu nascimento, o Fundador é colocado para acasalar com indivíduos não-transgênicos e seus descendentes F1 heterozigotos são analisados quanto à presença do transgene por PCR ou *Southern blot*. Em geral, de 10 a 50% da ninhada apresentam DNA exógeno.

Assim, após três semanas, os irmãos heterozigotos são acasalados entre si gerando 25% de animais F2 homozigotos. Após o nascimento, estes animais F2 são testados quanto a sua homozigose através do acasalamento com animais não-transgênicos e a análise posterior de seus descendentes.

Sempre um casal fundador deverá ser mantido para a manutenção da linhagem transgênica. (GONSALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; *Biotécnicas aplicadas á reprodução animal*, 2002).

1.5 Utilizações de animais transgênicos

A biotecnologia apresenta múltiplas aplicações em diferentes etapas de desenvolvimento e em diversos campos de atuação. Com o desenvolvimento das técnicas de transgenia, tornou-se possível a introdução dessa ciência na pecuária, a partir da produção dos animais transgênicos.

As aplicações das técnicas de biotecnologia moderna na área animal movimentam um mercado potencial de bilhões de dólares por ano. A competição pelo domínio de tal mercado exige que as empresas façam investimentos significativos nas linhas de pesquisa para desenvolver produtos, que incrementem a produção e gerem animais que atendam seus interesses. Essas principais linhas dividem-se em:

- Estudo da regulação e expressão gênica³³;

³² Cruzamento de indivíduos com genótipos diferentes;

³³ Estudo dos mecanismos moleculares que controlam a expressão e a regulação de diversos genes durante o desenvolvimento fetal e já no próprio tecido adulto;

- Utilização de animais transgênicos como biorreatores para a produção de biofármacos e bioprodutos;
- Produção de modelos animais para aplicações biomédicas³⁴;
- Incrementos de novas características genéticas de produção importantes economicamente;
- Xenotransplantes³⁵;

(Manual de Biossegurança- Animais Geneticamente Modificados e a Legislação brasileira de Biossegurança).

Analisaremos mais detalhadamente a aplicação dos animais transgênicos na indústria farmacêutica através dos biorreatores vivos para a produção de biofármacos e bioprodutos.

❖ Biorreatores vivos

Na indústria farmacêutica, os animais transgênicos são normalmente animais domésticos de grande porte que são produzidos com o intuito de atuarem como biorreatores para a expressão de proteínas recombinantes humanas, para fins terapêuticos, em determinados órgãos de interesse biomédico (enzimas, hormônios, fatores coagulantes e etc.).

Existem dois tipos de biorreatores: os biorreatores industriais que são equipamentos utilizados para o cultivo de células, tecidos, órgãos ou substâncias em meio de cultura líquido em frascos, tanques e etc. e os biorreatores vivos que são aqueles que utilizam animais para alcançar tais objetivos. Nesta pesquisa enfocaremos a produção de proteínas utilizando-se este segundo tipo de biorreatores.

Biorreatores vivos são animais modificados geneticamente a partir da introdução de uma proteína específica (que pode ser endógena ou exógena) utilizando-se promotores tecido-específicos para que estes animais

³⁴ Animais que apresentam doenças semelhantes as que atingem os seres humanos de maneira que se possa compreender como se estrutura a doença (causas,estágios, sintomas) e buscar formas de tratamento;

³⁵ Produção de animais transgênicos como futuros doadores de órgãos para os seres humanos que expressem fatores de inibição á rejeição;

posteriormente venham a atuar como biofábricas produzindo essa proteína de interesse em larga escala e com um alto valor farmacológico.

Para que um animal transgênico possa atuar como um biorreator ele deve obedecer algumas características, tais como: capacidade de produzir a proteína de interesse em grandes quantidades sem comprometer o funcionamento normal de suas células, capacidade de passar esta nova característica para as próximas gerações e capacidade de produzir a proteína em um órgão específico.

Além disso, outros critérios devem ser atendidos para a utilização das biofábricas através de animais transgênicos como a eficiente expressão da proteína recombinante no leite, a aceitabilidade do organismo do animal quanto à inserção do transgene, a garantia de recuperação considerável da proteína quanto a sua pureza e etc.

Normalmente, essa produção de proteínas é direcionada para vários fluidos biológicos como a urina, plasma sanguíneo e o leite das glândulas mamárias. O isolamento de proteínas nos fluidos apresenta grande vantagem em relação à sua produção nos tecidos, uma vez que os fluidos são constantemente produzidos e as proteínas são fáceis de serem recuperadas.

Ao longo dos anos, desde que a técnica de produção de biorreatores vivos começou a ser posta em prática, vários experimentos já foram feitos introduzindo-se as proteínas recombinantes de interesse nos fluidos já mencionados. Contudo, a expressão da maioria delas mostrou-se prejudicial para a saúde dos animais. *(RUMPF, Rodolfo e MELO, Eduardo O. Produção de animais transgênicos: Metodologias e aplicações).*

Somente nas glândulas mamárias a manipulação de proteínas recombinantes não apresentou nenhum problema para o animal. Além disso, o fato destas estarem constantemente produzindo leite faz com que se tornem uma fonte inesgotável para a produção das proteínas de interesses medicinais.

Em relação aos demais fluidos produzidos pelo corpo, o leite apresenta uma série de vantagens que fizeram com que ele fosse escolhido como fonte principal para essa produção de proteínas recombinantes.

O fato das proteínas do leite não circularem pelo corpo do animal (o que tornaria mais difícil sua purificação), a produção freqüente deste fazendo com

que possa ser coletado em grandes quantidades além dos custos reduzidos para a produção, são algumas das características que fazem com que a glândula mamária seja considerada como o melhor biorreator disponível atualmente.

A produção destas proteínas já se dá em laboratórios por meio de células em cultura (CHO³⁶, por exemplo) ou sendo sintetizadas por bactérias. Contudo, algumas proteínas humanas são muito complexas para serem produzidas por microrganismos e sua produção em células em cultura não se dá em larga escala. Assim, a produção delas em biorreatores vivos torna-se mais vantajosa do que em laboratórios.

Além disso, foi constatado que o leite é capaz de produzir proteínas recombinantes com uma densidade celular de até 1000 vezes maior do que aquela produzida em células em cultura em biorreatores industriais.

Falando em termos quantitativos, a glândula mamária é capaz de gerar dezenas de gramas de proteínas recombinantes por litro de leite a cada dia. Ao passo que através de sistemas de produção em células em cultura pode-se produzir no máximo 1-2 gramas (100-200mg) por litro a cada dia. Com isso, observamos que um animal transgênicos pode produzir mais gramas de proteínas recombinantes por litro de leite do que um biorreator industrial de 1000 litros. (*Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, nº20).

<i>Organismos</i>	<i>Produção anual de leite (litros)</i>	<i>Proteína Recombinante estimada por fêmea (kg/L)</i>
<i>Coelho</i>	5	0,02
<i>Porco</i>	300	1,5
<i>Ovelha</i>	500	2,5
<i>Cabra</i>	900	4
<i>Vaca</i>	10,000	60

Fonte: SINOGAS, Carlos – Animais Transgênicos 2005/06.

A partir desta constatação, diversos animais como coelhos, cabras, porcos, vacas, ovelhas têm sido utilizados como biofábricas para a produção de

³⁶ Células de ovário de hamster chinês;

fármacos. Entretanto, as espécies de ovinos, caprinos e bovinos têm sido as mais utilizadas para a produção destes, devido ao alto nível de produção de leite e proteínas segregadas por eles.

Uma vez produzida no leite, a proteína será posteriormente isolada (extraída e purificada) de modo a que possa ser utilizada como fármaco para o tratamento de doenças.

“A Utilização de animais transgênicos como biofábricas constitui uma rota efetiva para a produção de biomoléculas de alto valor agregado em larga escala e baixo custo. Existe um mercado global em crescimento para as diferentes classes de proteínas recombinantes produzidas principalmente na glândula mamária de animais de grande porte”. (*Rech, Elíbio Engenheiro agrônomo e mestre em fitopatologia – EMBRAPA*).

1.6 Biossegurança para animais transgênicos

Com o desenvolver das técnicas de transgenia tornou-se necessária a elaboração de normas para que se fizesse possível o trabalho com animais geneticamente modificados. As leis de Biossegurança aplicam-se não somente no que diz respeito à liberação de produtos transgênicos para a sociedade, mas também ao manuseio destes durante sua fase de produção.

Os transgênicos movimentam um mercado de bilhões de dólares. Esse mercado é constituído através de lucros altíssimos, mas também de gastos milionários envolvendo todo o seu processo de produção. Dentre estes gastos encontram-se as despesas com a biossegurança, que embora “consuma” muito dinheiro é de extrema importância para o funcionamento de uma indústria que vise trabalhar com AnGMs³⁷.

No manuseio de animais transgênicos, existem pelo menos três tipos de riscos que devem ser evitados: Contaminação do pesquisador ou tratador durante o manuseio do animal, liberação dos AnGMs para o meio ambiente podendo se tornar danoso para as demais espécies do ecossistema e contaminação de outros animais (geneticamente modificados ou não) por contato com o transgênico.

³⁷ Animais Geneticamente Modificados;

Os AnGMs devem ser criados em locais apropriados (biotérios) onde devem permanecer protegidos para evitar qualquer tipo de contaminação. Entretanto, é importante esclarecer que quando tratamos de contaminação não estamos nos referindo apenas a contaminação externa (de outros animais, do meio ambiente ou da sociedade) mas também da contaminação interna do próprio animal a ser utilizado nas pesquisas.

Os animais não podem estar contaminados com vírus, bactérias e/ou parasitas. Isto implicaria no objetivo final da produção do transgênico, inutilizando as pesquisas. Assim sendo, é preciso que o biotério onde são mantidos tenha toda infra-estrutura, como filtragem do ar com filtros especiais, barreiras de contenção sofisticadas, como microisoladores³⁸, autoclaves e diversos outros equipamentos que garantam a manutenção de um ambiente estéril. (*Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*).

Os riscos na manipulação de AnGMs varia de animal para animal de acordo com as características de cada um. Essa variação se dá de acordo com o risco de transmissão de doenças, de produção de substâncias tóxicas, da susceptibilidade do animal em adquirir infecções que não ocorrem na espécie não transgênica e de apresentar maior condição de sobrevivência em relação aos demais organismos de sua espécie.

Visando a segurança tanto dos AnGMs quanto do meio ambiente, tornou-se necessária a divisão destes em quatro níveis de biossegurança. Essa divisão aumenta gradualmente de acordo com o risco apresentado por cada tipo de AnGMs.

Contudo essa classificação é direcionada apenas para os AnGMs utilizados como modelos animais. Assim, torna-se desnecessário que a mencionemos aqui, uma vez que estamos dando foco aos AnGMs como biorreatores.

Todas as normas para contenção de animais geneticamente modificados foram estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) de maneira a viabilizar o manuseio destes animais sem prejuízos futuros para estes e para o sucesso das pesquisas. Estas envolvem diversos

³⁸ Gaiolas com filtro de barragem para microrganismos;

critérios que vão desde a estrutura do biotério até a manipulação, propriamente dita dos animais.

Os critérios mínimos necessários para a manutenção de biotérios são simples. No que diz respeito aos animais, basicamente, estes devem ser mantidos em áreas separadas das demais dependências, alojados somente com animais de mesma espécie e não podem estar envolvidos em um mesmo experimento.

Além disso, a construção dos biotérios deve ser de tal modo que facilite a limpeza e a desinfecção destes, evitando o acúmulo de poeira. Devem conter também barreiras físicas contra insetos, microorganismos e outros animais presentes em todas as áreas e que permitam a ventilação no local.

Os biotérios devem possuir um controle sanitário (para detectar a presença de parasitas, e de infecções por parasitas ou vírus), genético (para eventuais mudanças na estrutura dos animais), nutricional (para garantir a qualidade dos alimentos e da saúde do animal) e ambiental (para controlar alterações de temperatura, pressão, umidade, luz e etc.).

Quanto ao pessoal que trabalha com os AnGMs (sejam os pesquisadores ou os tratadores dos animais) todos eles devem ser especializados para esse tipo de trabalho. Somente deve ser permitida a entrada de pessoas credenciadas que devem seguir determinadas regras de vestimenta (como roupas adequadas, máscaras, luvas, sapatos apropriados e etc.) bem como de conduta para com os animais e os demais trabalhadores do biotério e do laboratório.

Não entrarei em detalhes no que diz respeito às normas gerais de Biossegurança para qualquer laboratório por tornar extensivo de mais a pesquisa aqui realizada. Simplesmente quero ressaltar que assim como em qualquer laboratório existem regras de biossegurança a serem cumpridas tanto na construção do local de trabalho como pelas pessoas que ali trabalham.

No entanto, acho importante salientar, mesmo que no geral, aquelas normas específicas para a instalação de biotérios e para o manuseio de animais geneticamente modificados, por se tratar de uma parte importante do foco desta pesquisa.

2. Eritropoetina (EPO)

2.1 Eritropoetina Humana

A eritropoetina é um hormônio glicoprotéico produzida nas células renais peritubulares que regula a proliferação e a diferenciação de células hematopoiéticas, como os eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), conhecida como Eritropoiese e realizada pela medula óssea.

Os eritrócitos são células anucleadas, que possuem a forma de disco bicôncavo e são constituídos basicamente por hemoglobina. São consideradas células lábeis, pois apresentam um período de vida muito curto - aproximadamente 120 dias. (*Apostila de Hematologia da EPSJV*).

A hemoglobina é uma proteína que confere a cor avermelhada aos glóbulos vermelhos e é a responsável pela distribuição do oxigênio dos pulmões para todo o organismo e pelo transporte do dióxido de carbono dos tecidos para ser eliminado pelos pulmões.

2.2 Produção de Eritropoetina humana

Certas células renais possuem sensores de oxigênio que detectam quando a quantidade de oxigênio circulante no sangue é relativamente pequena (hipóxia). Com isso, elas aumentam a produção da Eritropoetina. Essa substância “viaja” através do sangue os osso longos e chatos, onde estimula a produção de eritroblastos. Estes sofrem um processo de multiplicação e diferenciação no interior da medula óssea até atingirem o estado de maturação, quando caem na corrente sanguínea já sobre a forma definitiva de eritrócitos.

No interior dos ossos longos encontramos a medula óssea (ou medula vermelha) responsável pela hematopoiese que é a produção dos elementos do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). Lá, a eritropoetina estimula a produção de eritropoese induzindo a divisão e diferenciação das células progenitoras eritróides, aumentando a quantidade disponível no sangue

circulante. Assim, o oxigênio encontra maior facilidade para circular pelo organismo, chegando até todos os tecidos.

Contudo, não só em casos de menor quantidade de eritrócitos no sangue é que a EPO estimula a produção destes. Pessoas que moram em lugares de grande altitude, por exemplo, normalmente acabam por apresentar um teor maior de eritrócitos em seu sangue. Isso se deve ao fato da concentração de oxigênio presente no ar em grandes altitudes ser menor do que aquela presente em lugares ao nível do mar. Com isso, o organismo é induzido pela eritropoetina a produzir mais glóbulos vermelhos de maneira a suprir essa “falta” de oxigênio e permitir a circulação normal deste pelo corpo. (*Wikipédia – definição de EPO*).

2.3 Eritropoetina humana recombinante

Com o desenvolvimento contínuo das pesquisas na área da Biotecnologia, foi possível realizar a produção em laboratório do hormônio glicoprotéico conhecido como Eritropoetina.

Esse hormônio agora conhecido como Eritropoetina Recombinante tem a mesma função do hormônio natural produzido pelo corpo – estimular a produção e diferenciação de eritrócitos – com o diferencial de que agora pode ser administrado através de tratamentos clínicos de maneira a suprir a deficiência de sua produção no organismo causada por alguns tipos de enfermidades.

No tratamento da anemia por insuficiência renal crônica, a utilização dessa substância hematopoética tem seus benefícios definidos e comprovados. Entretanto, outros estudos e experimentos têm sido feito de modo a aplicá-la em outros tratamentos (com benefício provável) tais como: anemia associada à artrite reumatóide³⁹, anemia em pacientes em pré-diálise, redução da necessidade de transfusões sanguíneas, transfusão autóloga⁴⁰ e etc.

A eritropoetina humana recombinante é um antianêmico que se apresenta em duas formas: eritropoetina alfa humana recombinante e eritropoetina beta humana recombinante. Essas duas formas diferem entre si tanto na sua composição como nas funções que desempenham.

³⁹ Doença crônica de causa desconhecida, tendo como característica principal a inflamação articular persistente;

⁴⁰ Designação do processo de reinfusão do sangue do próprio indivíduo (doente);

A eritropoetina alfa humana recombinante é uma glicoproteína de peso molecular igual a 34.400 dáltons⁴¹, produzida através da tecnologia de DNA recombinante contendo 165 aminoácidos que se apresentam em seqüência idêntica a da EPO endógena. (MELLO, Elza Daniel de - *Fármacos Utilizados em Nutrição e Anemia*).

Sua atividade biológica é a mesma e corresponde a 129.000 UI/mg do hormônio natural. Ela induz a liberação de reticulócitos⁴² da medula óssea na corrente sanguínea, onde ocorre sua maturação em eritrócitos; o que faz com que a resposta ao tratamento seja quase imediata.

Em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), por exemplo, pode ocorrer redução na produção de eritropoetina, diminuição do tempo de sobrevivência das hemácias e presença de inibidores da eritropoese na circulação. Ela também estimula a produção de hemácias em pacientes que não apresentam essa deficiência na produção da EPO.

Atualmente, a eritropoetina alfa humana recombinante é utilizada no tratamento de anemias relacionadas à quimioterapia em pacientes com tumores malignos não mielóides⁴³, insuficiência renal crônica (com ou sem diálise), terapia com zidovudina⁴⁴ em pacientes infectados por HIV (nível de eritropoetina endógena < 500 um/mL), casos de cirurgia não cardíaca e não vascular, reduzindo a necessidade de transfusões sanguíneas em pacientes com hemoglobina > 10 e ≤ 13 g/dL. ((MELLO, Elza Daniel de - *Fármacos Utilizados em Nutrição e Anemia*).

Possui contra indicação para pacientes com hipertensão, hipersensibilidade a eritropoetina humana recombinante, soro-albumina humano e produtos derivados de células de mamíferos ou aos componentes da fórmula.

A eritropoetina beta humana recombinante também é um antianêmico, contudo é menos específico que a alfa humana recombinante. Ela age estimulando a formação de glóbulos vermelhos e é indicada para o tratamento de alguns tipos de anemia. Como contra indicação possui apenas o fato do paciente

⁴¹ Pequena unidade de massa usada para expressar massas atômicas e moleculares. Não é uma massa do SI;

⁴² Células eritrocitárias imaturas;

⁴³ São células que incluem os monócitos e os granulócitos;

⁴⁴ Análogo sintético de um composto da Timina que bloqueia a incorporação de novos nucleotídeos a cadeia de DNA o que leva a interrupção da síntese do DNA viral complementar;

não poder utilizar caso seja alérgico a alguma das substâncias presentes em sua composição.

No que diz respeito à produção da eritropoetina recombinante, em especial da alfa humana, esta é feita a partir de técnicas de biologia molecular para a produção dos biofármacos. Contudo, deixarei para discutir sobre este assunto no último capítulo, no qual estarei tratando exclusivamente da produção destes bioprodutos. (*Bulatório eletrônico da Anvisa*).

Como já mencionando anteriormente, alguns tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia (tratamento para pessoas acometidas por algum tipo de neoplasia), além de algumas doenças como a AIDS, a Insuficiência Renal Crônica e a deficiência do organismo de algumas vitaminas e minerais (vitamina B12 e ferro, por exemplo) acabam por diminuir o número de eritrócitos presentes no organismo. Isso leva à ocorrência de uma das principais doenças sanguíneas que atingem a população mundial: a Anemia.

Existem diversos tipos de anemia além de outras doenças sanguíneas que também são caracterizadas pela menor circulação de oxigênio no organismo. Neste estudo daremos uma visão geral sobre o que vem a ser, a anemia e mencionaremos os tipos mais comuns existentes desta enfermidade.

3. Anemia

3.1 Conceito

A palavra anemia vem do grego *an* = privação e *haima* = sangue. Essa enfermidade é caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina no interior das hemácias (intraeritrocitária) e pela redução da quantidade de hemácias no sangue. A quantidade de concentração normal de hemoglobina estipulada pela Organização Mundial de Saúde é de 13g/dl para homens, 12g/dl para mulheres e 11g/dl para gestantes e crianças entre seis meses e seis anos de vida. (*ABC da Saúde – artigo*)

A análise do volume das hemácias é feita através de um exame de sangue denominado hematócrito/microematócrito (htc) – contido no hemograma - que fornece a relação entre o plasma e os elementos celulares do volume total de uma amostra de sangue. Esses resultados são expressos em percentual: 40 a 50% para homens, 37 a 45% para mulheres e 35 a 45% para crianças (considerados índices normais).

Atualmente, a anemia é considerada como sendo a síndrome crônica de maior ocorrência em quadros clínicos. (*ABC da Saúde – artigo*) Ela é classificada em dois tipos: anemia aguda e anemia crônica. A anemia aguda é caracterizada pela perda súbita de sangue (principalmente por hemorragias). Nela a diminuição do volume de sangue total é mais importante que a falta de eritrócitos e de hemoglobina.

Já na anemia crônica, o volume sanguíneo total está normal (pois é compensado pelo aumento do volume plasmático), mas ocorre uma diminuição da quantidade de eritrócitos e da hemoglobina. Esta normalmente é desenvolvida através de alguma enfermidade adquirida pelo paciente (já mencionadas anteriormente).

3.2 Sintomas

Em muitas pessoas a anemia pode não ser detectada (assintomática), ou apresentar sintomas muito vagos. Contudo na maioria dos casos os sintomas mais freqüentes são: fadiga, fraqueza, palidez, dificuldades de concentração, falta de ar, vertigem, astenia (fraqueza orgânica) e extremidades frias. Nos casos mais severos podem ocorrer desmaios, taquicardia, palpitações, hipotensão e por fim choque que pode levar a um quadro irreversível e letal. (*Wikipédia – definição de anemia*).

Esses são alguns dos sintomas mais comuns provenientes da anemia. Contudo, é importante ressaltar que os sintomas podem variar de acordo com a severidade da anemia (aguda ou crônica), de acordo com a causa e com o tipo de anemia adquirida. Afinal, não se deve esquecer de cada organismo é diferente um do outro. Assim sendo, cada caso merece um enfoque especial e deve ser analisado separadamente.

3.3 Tipos de anemia

Como foi dito anteriormente, além de apresentar diversos graus de severidade, existem diversos tipos de anemia todas de particular importância e interesses médicos e/ou sociais. Podemos encontrar desde as mais freqüentes até as mais raras. Os principais tipos de anemia e suas causas são: (*Wikipédia – artigo anemia*)

- Anemia de carência de ferro (anemia ferropriva);
- Anemia de carência de vitamina B12 (anemia perniciosa ou anemia megaloblástica⁴⁵) e de carência de ácido fólico;
- Anemia das doenças crônicas - Uremia⁴⁶, Hipotireoidismo⁴⁷, Hepatite, Insuficiência Renal, Neoplasias, Infecções bacterianas, virais (em especial a AIDS) e por parasitas;

⁴⁵ Síntese comprometida do DNA;

⁴⁶ Excesso de uréia na corrente sanguínea;

⁴⁷ Diminuição do funcionamento da glândula Tireóide;

- Anemia por anomalias genéticas – Hemoglobinopatias⁴⁸, sendo as mais comuns hemoglobinopatias S (anemia falciforme), síndromes talassêmicas (talassemia⁴⁹ alfa ou beta), esferocitose e eliptocitose, deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e Anemia de Fanconi⁵⁰;
- Anemia por destruição periférica dos eritrócitos - malária, anemias hemolíticas auto-imunes⁵¹, anemia por fragmentação dos eritrócitos;
- Anemia decorrente de doenças da medula óssea – anemia aplásica⁵², leucemias e tumores na medula;
- Anemia por perda de sangue – hemorragia excessiva (acidentes, parto e etc.) sangramento crônico devido a úlceras, câncer intestinal, ciclo menstrual excessivo, sangramento nasal, sangramento por hemorróidas e etc;

3.4 Diagnóstico

O exame mais comum para diagnosticar a anemia é o hemograma (exame de sangue). A partir do volume de células sanguíneas e do nível de hemoglobina detectado na amostra coletada, pode-se detectar se o paciente possui, ou não, anemia. Além disso, esse exame também pode detectar as anisocitoses⁵³ que irão determinar de qual tipo de anemia o paciente está acometido. (*Apostila de Hematologia da EPSJV*).

⁴⁸ Distúrbios da hemoglobina;

⁴⁹ Característica do sangue transmitida de pais para filhos. Ela reduz a quantidade de hemoglobina que o corpo pode fabricar;

⁵⁰ Doença hereditária que afeta principalmente a medula óssea gerando uma redução na produção de todos os tipos de células sanguíneas do organismo;

⁵¹ Destruição precoce das hemácias devido à fixação de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária;

⁵² Déficit (de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) no sangue periférico, secundária a uma medula óssea marcadamente hipocelular, afetando as três linhas celulares granulocítica, eritróide e megacariocítica;

⁵³ Alterações morfológicas quanto ao tamanho das hemácias;

- **Microcitose:** Eritrócitos menores que o normal (pois falta-lhes conteúdo) devido à produção inadequada de hemoglobina. Representam os primeiros e os últimos sinais de insuficiência por parte da medula óssea. Medem em torno de 4 a 6 micra. É comum nas anemias por deficiência de ferro, doenças crônicas e talassemias.
- **Normocitose:** As hemácias apresentam tamanho normal (diâmetro médio) em torno de 7,2 micra.
- **Macrocitose:** Eritrócitos com volume médio superior ao normal. Medem em torno de 9 a 11 micra. É associada principalmente a deficiência, falta de absorção ou armazenamento de vitamina B12 e de ácido fólico.

Entretanto, no caso das doenças crônicas, infecciosas assim como em outras doenças, o hemograma torna-se ineficiente como diagnóstico, assim torna-se necessária a observação de sinais clínicos e a análise de exames próprios de cada doença.

4. Biofármacos

4.1 Histórico e conceitos

A idéia de produzir drogas transgênicas ocorreu a muitos cientistas em meados da década de 80, quando esse novo setor começou a enfrentar o desafio de fabricar proteínas complexas: assegurar que estas grandes moléculas tivessem a forma adequada, e com todos os açúcares nos locais corretos, na superfície dos aminoácidos das proteínas. (*Scientific American Brasil*, nº 43).

A partir disso, começaram-se a buscar meios de se isolar essas proteínas humanas em quantidades significativas, de maneira que tornassem possível a extração para a posterior purificação e produção das drogas de interesse. Contudo, havia muitas etapas ainda a serem alcançadas para que se pudessem obter as tais drogas transgênicas.

A princípio, era necessário arrumar uma maneira de produzir essas proteínas de modo que nada interferisse na estruturação delas (fatores externos como microorganismos ou fatores internos como enzimas, por exemplo). Além disso, precisava-se de um mecanismo que as produzissem de maneira pura e em grandes quantidades.

Com isso, surgiu a idéia de realizar essa produção em bactérias e leveduras. As proteínas modificadas eram inoculadas nesses organismos de maneira que, uma vez fazendo parte da estrutura deles, passaria a ser produzidas como qualquer outra substância que estes já produzissem.

O primeiro medicamento fabricado desta maneira foi a insulina recombinante humana, que foi aprovada para sua comercialização nos Estados Unidos em 1982. Depois, houve o lançamento da primeira terapia de anticorpos monoclonais, em 1986. Contudo, com o passar do tempo, notou-se que algumas proteínas possuíam estruturas muito complexas que dificultavam sua produção por meio destes microorganismos.

Em busca de uma solução para esse problema, surgiu a idéia de realizar essa produção em células animais cultivadas em larga escala em laboratórios (como células CHO, por exemplo). O resultado foi positivo. Por volta de 2004,

nos EUA os biofármacos produzidos em laboratórios começaram a ser divulgados. No entanto, como não poderia deixar de ser, esse método de produção se deparou com um novo problema: a quantidade que poderia ser produzida por essas células era muito pequena o que fez com que novas alternativas fossem pensadas.

Por fim, após inúmeras tentativas, ocorreu a idéia de se utilizar animais e plantas modificados geneticamente como “vetores” para essa produção. Estes foram chamados de biorreatores vivos. Que nada mais eram do que verdadeiras “fábricas” de produzir moléculas terapêuticas, processo esse conhecido como ‘pharming’.

Mas afinal, o que são drogas transgênicas, ou como são mais comumente conhecidas, biofármacos? Estes nada mais são do que moléculas modificadas geneticamente (através da inserção de genes) com o objetivo de serem mais vantajosas que as naturais para determinadas funções por apresentarem, por exemplo, maior atividade biológica, maior tempo de vida, menos efeitos colaterais e etc. Elas agem para neutralizar o mal quando determinada proteína está ausente ou em número insuficiente (*Revista de Manguinhos / Outubro de 2005*).

São na verdade medicamentos biológicos de primeira qualidade construídos a base de substâncias idênticas ou muito parecidas com as humanas, que atuam com mais eficácia e menos efeitos colaterais que os produtos químicos. “Por serem substâncias feitas de proteínas muito similares as que temos no corpo, seu mecanismo de ação e benefícios são melhores”. (*Rafael Gual, diretor executivo da AMIIF⁵⁴*).

No caso dos animais (foco deste estudo), estas moléculas modificadas seriam introduzidas em seus genomas (transgenia) e a produção se daria nos fluídos destes animais, principalmente nas glândulas mamárias – por motivos já explicitados anteriormente - por constatar-se que atendiam rigorosamente a todas as exigências feitas para a produção destas drogas de interesse.

Com o desenvolvimento desta técnica, tornou-se possível a produção de proteínas muito complexas e em grandes quantidades o que chamou a atenção das indústrias farmacêuticas. Estas, vendo diante de si um mercado

⁵⁴ Associação Mexicana de Indústrias de Investigação Farmacêutica;

promissor de milhões de dólares, passaram a investir nas pesquisas com animais transgênicos para a produção de biofármacos.

Embora algumas rejeições devido à utilização de animais como biofábricas (mesmo que para a produção de medicamentos), a utilização de AnGMs para estes fins tem sido muito bem aceita, se compararmos com a tentativa de introdução de transgênicos na alimentação, uma vez que estão sendo produzidos para serem utilizados como remédios e não como alimento.

4.2 Etapas da produção de Biofármacos

A produção de biofármacos divide-se em algumas etapas para que se possa chegar ao produto final, que será utilizado como forma de tratamento para as mais diversas doenças possíveis. Estas etapas iniciam-se pela obtenção da linhagem celular recombinante, produção dos animais transgênicos, cultivo das células nestes biorreatores e finalmente purificação da proteína obtida.

Grande parte destas etapas já foi mencionada, anteriormente, nos outros capítulos. A obtenção da linhagem celular recombinante se dá pela inserção das novas características na proteína a ser expressa. No nosso caso, com a eritropoetina são administradas alterações que reduzam os efeitos colaterais, minimizando o grau de rejeição do organismo para essa substância.

Obtidas essas linhagens celulares de proteínas recombinantes, é necessária a produção dos animais transgênicos a partir da introdução destas mesmas proteínas no genoma do animal escolhido. No caso da eritropoetina, os animais mais utilizados para pesquisas e estudos, até hoje, são os camundongos e os coelhos. (*Como Purificar Proteínas – Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*).

Após toda a técnica de microinjeção – mencionada no capítulo 1 – finalmente está produzido o animal transgênico pela introdução da proteína recombinante produzida. A partir daí, é necessário que se faça um acompanhamento minucioso do desenvolvimento e da produção desta nova substância inoculada no animal.

Depois de verificada que sua produção no organismo do animal foi feita com sucesso, ela será extraída dele (pelas glândulas mamárias) e estará pronta para o seu último e mais complexo processo de produção: a purificação da proteína. Só depois desta etapa o medicamento finalmente estará pronto para passar pelos processos de industrialização a fim de ser comercializado no mercado.

4.3 Purificação de proteínas

A purificação de proteínas é a etapa final do processo de produção de biofármacos. Sua necessidade se dá pelo fato de que todas as células do organismo contêm milhares de proteínas, diferentes, dispersas em seu interior e que apresentam uma ampla faixa de atividade biológica. Assim sendo, é necessário realizar essa purificação de maneira a isolar somente a proteína de interesse.

O processo de purificação de uma proteína dependerá de suas características físico-químicas, de suas propriedades biológicas, da fonte da qual a proteína será purificada e da tecnologia de purificação disponível (<http://www.biotechnologia.com.br/pesq.asp>). Este é dividido em etapas que visam distinguir as proteínas umas das outras de acordo com suas respectivas seqüências de aminoácidos, com o conteúdo de carboidratos e lipídios-estrutura tridimensionais e com suas atividades biológicas.

As cromatografias⁵⁵ em colunas de gel, filtração ou adsorção são os sistemas mais utilizados para a separação das proteínas. Contudo, ao longo do processo de purificação pode haver mudanças nas estruturas das proteínas. Isso transforma esse processo num desafio para os cientistas, que buscam minimizar os fatores que possam causar essas alterações (controle de variação de temperatura, oxidação e etc.) de maneira a garantir que o produto final tenha todas as características necessárias para seu uso.

Para que seja iniciado o processo é necessário que a proteína seja extraída de sua fonte natural. Os tecidos onde ela se encontra são triturados e os microorganismos ou as células animais provenientes de cultura são lisadas

⁵⁵ Técnica bioquímica na qual uma mistura de substância pode ser separada pela carga, tamanho, ou alguma outra propriedade de seus componentes, através da sua partição entre uma fase móvel e outra estacionária;

por sonificação⁵⁶. Se esta estiver restrita a uma organela em particular, uma purificação substancial é obtida a partir do isolamento dessas estruturas celulares, geralmente por centrifugação diferencial em gradiente de sacarose (*Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - n° 24 -janeiro/fevereiro 2002*).

Em seguida, temos a clarificação da amostra. Na maioria das vezes utilizam-se técnicas de precipitação por centrifugação ou de filtração. Contudo, por terem se mostrado ineficientes em alguns momentos (às vezes até chegando a causar prejuízos para o material), foram desenvolvidas resinas cromatográficas que garantem com segurança a adsorção da amostra - sistema de leito expandido. Este sistema é caracterizado pelas etapas descritas na figura a abaixo;

Figura 3: Etapas de um sistema de leito expandido;

Fonte: Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – n° 13 – março/abril 2000.

- 1) Fase estacionária do leito expandido é equilibrada com o tampão de equilíbrio;
- 2) A amostra contendo as células é inserida, de baixo para cima, no leito expandido. A proteína de interesse e alguns contaminantes aderem na resina, enquanto que as células saem atravessando a tela na parte superior da coluna;
- 3) Lavagem, de baixo para cima, com o tampão de lavagem;

⁵⁶ Variações repentinas de pressão e osmolaridade, forte agitação na presença de esferas de vidro ou por enzimas citolíticas;

- 4) Eluição⁵⁷ da proteína feita de cima para baixo após a sedimentação do leite;
- 5) Regeneração (limpeza) da coluna para ser utilizada novamente;

(A Arte de purificar Proteínas. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento).

Através do sistema de leite expandido foi possível pular a etapa prévia de clarificação, concentração e a fase inicial da purificação, passando direto para a fase intermediária. O fato desse sistema ser de alta capacidade de adsorção e a capacidade de realizar a cromatografia sem a clarificação da amostra elimina algumas etapas de trabalho desse processo, tornando o leite expandido uma forma de ser obter a proteína de interesse por um custo menor, em grandes quantidades de produção e com um tempo reduzido.



Figura 4: Processo tradicional e processo de leite Expandido para a purificação de proteínas;

Fonte: Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – n° 13 – março/abril 2000.

A figura mostra a técnica clássica de purificação de proteínas e a técnica a partir da introdução do sistema de leite expandido. Notamos que essa técnica reduz quase que pela metade as etapas de trabalho. De acordo com a pureza final requerida pela amostra as etapas de purificação intermediária e final tornam-se dispensáveis.

⁵⁷ Processo de passagem através da fase estacionária (por ação da fase móvel);

Contudo, mesmo após todas essas fases é possível que algum resíduo ainda tenha restado na proteína purificada. Para isso, são realizados testes com o objetivo de avaliar o resultado de pureza final da amostra. Estes apresentam sensibilidades, custos e complexidades variadas. Dentre as diferentes técnicas podemos citar: o seqüenciamento peptídico automático, espectrometria de massa⁵⁸, ressonância magnética⁵⁹ de alta resolução, eletroforese⁶⁰ em gel de poliacrilamida e eletroforese bidimensional.

Todas essas etapas, antes mesmo de serem iniciadas, devem se ater a alguns critérios que irão determinar quais técnicas, métodos e equipamentos serão utilizados ao longo de todo esse processo de purificação.

De acordo com as estratégias planejadas, pode-se saber se a proteína exige um grau mais complexo de purificação (conforme a aplicação final do produto: humano, veterinário ou diagnóstico), quais técnicas serão utilizadas (conforme a viabilidade econômica), qual a escala de manufatura para atender a demanda do produto dentre outras. “Um passo de purificação eficiente proporciona um aumento no enriquecimento da proteína sem diminuir muito sua recuperação” (*Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – n° 24 – janeiro/fevereiro 2002*).

No caso da eritropoetina humana recombinante a técnica utilizada para a avaliação do grau de pureza é a cromatografia em coluna realizada em sistemas de HPLC (alta performance de cromatografia líquida) que dispõem de diversos detectores altamente sensíveis. Esse método é o passo final da purificação da amostra.

Contudo, antes de ser utilizada na aplicação medicinal ainda serão realizados testes e experimentos científicos, além da substância passar por uma rigorosa avaliação de biossegurança, segundo a legislação específica nessa área, para que só assim possa ser utilizada como uma molécula terapêutica e possa circular no mercado.

A arte de purificação de proteínas varia de acordo com as características estruturais e físico-químicas de cada uma delas. Portanto, é importante

⁵⁸ Análise a partir do espectrômetro, instrumento ótico que serve para medir as propriedades da luz em uma determinada porção do espectro eletromagnético;

⁵⁹ Técnica de fazer radiografias computadorizadas mais complexas para a identificação de alterações no organismo;

⁶⁰ Técnica laboratorial de fracionamento de proteínas, enzimas, DNA e RNA;

salientar que não existe um protocolo específico. Cada proteína deve ser analisada separadamente de maneira a se adequar a melhor técnica ao processo garantindo que o produto final tenha todas as características desejadas no princípio.

4.4 Importância dos biofármacos

Os fármacos produzidos em biorreatores vivos fazem parte da lista de medicamentos tidos pelo Ministério da Saúde como excepcionais (constituída por 216 itens, dentre os quais encontramos a eritropoetina). Essa classificação se deve ao alto custo de produção ou importação e a dificuldade de acessibilidade destes por parte da população.

Todo ano, milhões de dólares são gastos seja com a importação ou com a produção destes medicamentos em células em cultura ou em bactérias. A idéia de se produzir os biofármacos veio como uma tentativa de garantir uma maior disponibilidade destes produtos no mercado e, conseqüentemente, reduzir o custo final para o consumidor.

Proteínas como a eritropoetina, o interferon⁶¹, os anticorpos monoclonais⁶², os anticoagulantes dentre outros estão na lista dos medicamentos mais caros e que possuem uma maior demanda de produção. Daí a idéia de fabricá-los em animais vivos que teriam um custo muito reduzido (uma vez que seriam produzidos pelos próprios animais) e poderiam corresponder a essas demandas uma vez que produziriam as proteínas de interesse em grandes quantidades e com segurança garantida.

Em resumo, vemos que os biofármacos a partir de biorreatores vivos são técnicas com baixo investimento de capital que resultam em produtos seguros para o consumidor. Além disso, possuem uma grande facilidade de estocagem e transporte, além é claro, de serem medicamentos mais baratos (tanto para o governo como para a população) e de produção em larga escala.

⁶¹ Substância de origem celular, produzida por todos os animais vertebrados ou invertebrados, capaz de inibir a multiplicação de células cancerígenas e de certos vírus;

⁶² Produzidos em laboratórios pela fusão de células e não estão presentes na natureza. São resultantes da multiplicação de um único clone híbrido de duas células;

4.5 Biofármacos no mercado

Algumas pesquisas mostram que a utilização de biorreatores vivos poderia reduzir os custos de produção de proteínas recombinantes em até 50 vezes quando comparados aos custos com os produtos convencionais. (<http://www.cenargen.embrapa.br/folders/fold2006-013.pdf>). Em se tratando de termos econômicos, existe um mercado global em expansão para todas as classes de proteínas recombinantes expressas nesses animais.

Ao contrário do que se possa pensar, as pessoas não irão ingerir o leite para se curarem ou se prevenirem das doenças. O intuito da produção de biofármacos não é introduzir alimentos mais saudáveis ou com características medicinais na alimentação. As proteínas serão produzidas no leite, como é o caso da eritropoetina, e após sua extração e purificação é que serão transformadas em substâncias de uso terapêutico.

Mas não são só esses meios que irão garantir a segurança dessas moléculas no mercado. De maneira a evitar futuros riscos biológicos, os biofármacos ainda passaram por extensivas análises de suas atividades além de comprovações de segurança alimentar e ambiental (regulamentadas pelas instituições competentes).

No mundo, as técnicas de produção de biofármacos a partir de biorreatores vivos já são uma realidade. Inúmeras empresas nos Estados Unidos (GTC Biotherapeutics, Hematech), na Europa (PPL Therapeutics, Pharming Group) e no Japão já trabalham com a produção desses medicamentos há muito tempo.

A GTC, por exemplo, é uma das maiores empresas de Biotecnologia existentes na atualidade. Ela está para lançar no mercado em 2007 o primeiro medicamento produzido em animais transgênicos (cabras transgênicas), o Atryn, um agente anticoagulante para o tratamento de pacientes acometidos de antitrombina⁶³ hereditária – já aprovado pela Agência Européia de Medicina.

⁶³ Pequena molécula que inativa várias enzimas que possibilitam a coagulação;

As demais empresas ainda estão em fase de estudos e de produção de outros medicamentos, contudo, sem previsões no momento para lançar no mercado. No caso da Eritropoetina, algumas empresas japonesas estão enfocando seus estudos na produção dessa proteína recombinante utilizando camundongos e coelhos como biorreatores. Contudo, assim com as outras, sem previsão para o lançamento dessas moléculas recombinantes no mercado.

No Brasil, algumas instituições como a Embrapa, o Instituto Butantan, Biomanguinhos, e algumas Universidades espalhadas pelos estados brasileiros, já adentraram nesse mercado de biofármacos. Contudo, sua técnica é voltada ainda para a produção de biofármacos em células em cultivo (CHO dentre outras) ou em bactérias (*Escherichia Coli*).

Embora alguns institutos como a Embrapa e a UECE (Universidade Estadual do Ceará) já estejam começando a produzir em seus laboratórios animais transgênicos e a tentar utiliza-los como biofábricas, a introdução destas técnicas de biorreatores vivos no Brasil ainda é muito incipiente.

Essa problemática se deve a inúmeros fatores de ordem econômica, devido aos altos custos para a compra e manutenção dos equipamentos necessários para as técnicas de transgenia, educacional, no que diz respeito a especialização de profissionais para atuarem nessa área e legislativa, uma vez que o Brasil é um dos países com mais regras e questões burocráticas com relação a área da saúde e da biotecnologia.

Considerações finais:

A anemia é uma das síndromes que mais atinge a população mundial nos dias de hoje. Trata-se de uma doença muito comum que apresenta sintomas claros (na maioria das vezes), o que facilita seu diagnóstico. Qualquer alteração ou sensação de mal estar deve ser informado imediatamente a um médico competente para que este possa avaliar o caso e diagnosticar se existe algum problema a ser tratado (independente de estar relacionado, ou não com a anemia).

Embora caro, já existe no mercado um medicamento a base de eritropoetina recombinante para o tratamento da anemia por deficiência desse hormônio glicoprotéico. Por estar na lista de medicamentos excepcionais, seu requerimento deve ser feito ao Ministério da Saúde para que só então o paciente possa ter acesso a este. Todas essas etapas que dificultam o acesso por parte da população.

Foi como forma de amenizar esses problemas que começou-se a estudar uma forma de produção mais barata destes e de outros fármacos. Ao longo dos anos, a engenharia genética, em especial no ramo das pesquisas com animais e dos biofármacos, veio ganhando seu espaço na sociedade e aprimorando suas técnicas.

Assim, hoje, está cada vez mais próxima essa realidade de se obter medicamentos com grande demanda por um baixo preço. Os produtos biotecnológicos estão em pleno desenvolvimento e hoje alcançam mais de 10% dos novos produtos atualmente inseridos no mercado.

Os biofármacos a partir de animais transgênicos são a mais nova promessa em termos de produção de fármacos, com um baixo custo e em larga escala. A introdução dessas técnicas no Brasil, embora ainda incipiente, acompanha a tendência mundial onde a genética se faz base de todos os antigos conhecimentos e das novas descobertas.

Consultas e referências:

- Unifesp produz animais transgênicos – Jornal da Paulista – Disponível em: <http://www.unifesp.br/comunicacao/jptaed165/pesq1.htm>. Acesso em: 16/10/2006.
- A arte de purificar proteínas. Revista Biotecnologia Ciência & desenvolvimento. Ano 2, número 13 – Março/Abril 2000.
- Pesquisa: Animais Transgênicos. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Ano 5, número 27 – Julho/Agosto 2002.
- Programa de Engenharia Química. COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Laboratório do PEQ/COPPE ajudará o país a produzir biofármacos e vacinas. PEQ inaugura o LECC. Disponível em: <http://www.peq.coppe.ufrj.br/lecc.html> Acesso em: 26/02/2006.
- Os OGM's como biofábricas de medicamentos. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Ano 4, número 20 – Maio/Junho 2001.
- Pesquisa: Como purificar proteínas? Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Ano 4 – número 24 – Janeiro/Fevereiro 2002.
- A revolução dos biofármacos. Revista de Manguinhos | Outubro de 2005. Imunobiológicos. Biomanguinhos/ Fiocruz.
- RUMPF, Rodolfo e MELO, Eduardo O. Produção de animais transgênicos: Metodologias e aplicações. Brasília. DF. Embrapa, 2005. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc145.pdf> Acesso em: 26/02/2006.

- Cabra transgênica gera 1º remédio. Jornal da Ciência. O Estado de São Paulo, 19/09/2005. Disponível em:
<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=40822> Acesso em: 14/10/2006.

- Apostila de Noções Básicas de Técnicas em Hematologia. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Curso Técnica de Laboratório em Biodagnóstico em Saúde.

- Reflexões sobre a Biotecnologia na Medicina Veterinária. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Revista CFMV. Ano 11 Nº. 35 Biotecnologia. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br> Acesso em: 14/10/2006.

- Estratégia nacional de biotecnologia. Notícias. Rede de Bioindústria – Biotecnologia para uma vida melhor. Disponível em: <http://www.fiemg.org.br/Default.aspx?tabid=1643&mid=4192&newsType=Detail&P>. Acesso em: 14/10/2006.

- Biotécnicas para a produção de animais transgênicos. Disponível em: http://lbm.fmvz.usp.br/disciplinas/vpt333/2006/seminarios/2002/Biotecnicas_Animalis_trangenicos.doc . Acesso em: 08/10/2006.

- Íntegra de BioChat realizado em 11/03/2004. Tema: Plantas e animais transgênicos como biofábricas. Coordenador: Elibio Rech, pesquisador da Embrapa. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/biochat/viewchat1_imp.asp?id=72&data=11/03/2004. Acesso em: 14/10/2006.

- Plantas e animais transgênicos serão usados como biofábricas para produção de medicamentos, unindo o agronegócio ao setor. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/folders/fold2006-013.pdf> Acesso em: 15/10/2006.

- SINOGLAS, Carlos. Biotecnologia 2005/06. Animais Transgênicos. Disponível em: <http://www.ensino.uevora.pt/biotec/AnimTransg.pdf>
Acesso em: 07/11/2006.
- Biotecnologia e produção animal. Coluna Agronegócios. Artigo. Disponível em: <http://www.faepe.com.br/boletim/bi876/bi876pag16.htm>
Acesso em: 14/10/2006.
- USP lança animal transgênico no Brasil. Projeto Ghente: Clippings. Disponível em: <http://www.ghente.org/clippings/clipping.php?Chave=339>
Acesso em: 14/10/2006.
- Apostila de Hematologia da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Professor: Marcos Antônio P. Marques.
- Íntegra do BioChat realizado em 09/10/2003. Tema: Animais Transgênicos. Coordenador: João Bosco Pesquero, PhD. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/biochat/viewchat1_imp.asp?id=&&data=09/10/2003. Acesso em: 14/10/2006.
- Algodão da Embrapa terá gene de aranha. Jornal da Ciência. Notícias. Disponível em: <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=21388>. Acesso em: 14/10/2006.
- O medicamento que veio do leite. Inovação – biotecnologia Edição Nº. 43 – dezembro de 2005. Scientific American Brasil. Artigo. Disponível em: http://www2.uol.com.br/sciam/conteudo/editorial/editorial_27.html. Acesso em: 14/10/2006.
- Medicamentos serão produzidos no Brasil em 2008. O Povo – CE, 16/01/2006.

- Camundongos na linha de montagem – entrevista com a Dra. Eliana Abdelhay. Vox Scientiae. - Janeiro/fevereiro de 2002. Disponível em: <http://www.eca.usp.br/nucleos/njr/voxscientiae/ricardo6a.html>. Acesso em: 14/10/2006.
- Laboratório especial de biofármacos em célula animal. Instituto Butantan. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/biofarmacos.htm>. Acesso em: 26/02/2006.
- PESQUERO, João Bosco & BAPTISTA, Heloísa Allegro. Animais Transgênicos.
- RIBEIRO, Luciana de Andréia & AZEVEDO, Vasco. Animais Geneticamente Modificados (Transgênicos) e a Legislação Brasileira de Biossegurança. Manual de Biossegurança, Parte IV. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/divisa/arquivos/mat-publico/manual-biosseguranca.pdf>. Acesso em: 02/11/2006.
- Biossegurança: Biossegurança no manejo de modelos animais. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Ano 3, Número 18 – Janeiro?Fevereiro de 2001.
- Cabras viram fábricas de proteínas, 21/07/2006. Disponível em: http://www.lagoinha.com/noticias/ver_materia.asp/codnoticia=22047. Acesso em: 16/08/2006.
- Canadian regulatory requirements for veterinary biologics produced by biotechnology. AgbiotechNet. Proceedings 002. Available at: <http://www.agbiotechnet.com>. Acesso em: 04/05/2006.
- GONSALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; 2002; Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Ed. Varela.

- MELLO, Elza Daniel de. Fármacos Utilizados em Nutrição e Anemia.
Disponível em:
http://www.usoracional.com.br/index_arquivos/nutricao.html Acesso em:
18/10/2006.

- Definições: Wikipédia. Disponível em:
http://pt.wikipedia.org/wiki/P%C3%A1gina_principal.

- Artigo sobre anemia. ABC da Saúde. Disponível em:
<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?24> Acesso em: 02/11/2006.