

TÉCNICAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA PRODUÇÃO DE TRANSGÊNICOS

JENNIFER GOMES FERREIRA ^{1*}

¹ FUNDAÇÃO HELENA ANTIPOFF, Av. São Paulo, nº 3.996, Vila Rosário, Ibirité / MG - CEP: 32400-000 * jennifergf@gmail.com

RESUMO

Desde seu surgimento em 1973, as manipulações genéticas não cessaram em suas descobertas e aplicabilidades, dentre elas, podemos citar a inserção de genes de uma espécie para outra, que passou a ser designada como organismos geneticamente modificados ou transgênicos. A produção desses organismos possibilitou novas perspectivas tanto para agricultura, através do uso de plantas mais resistentes, como uso laboratorial devido à redução de animais usados em pesquisas. Apesar das questões éticas e ambientais que ainda são discutidas por ecologistas e empresas de biotecnologia, vários métodos já foram desenvolvidos para a produção de seres transgênicos, a metodologia utilizada varia de acordo com o tipo de modificação que se pretende obter: introdução, modificação ou inativação de um gene.

Palavras-chave: *transgênicos, métodos, produção.*

GENETIC ENGINEERING TECHNIQUES TO PRODUCE TRANSGENIC

ABSTRACT

Since its inception in 1973, genetic manipulation does not end on their findings and applicability, among them we can cite the insertion of genes from one species to another, which became known as genetically modified organisms or GMOs. The production of these bodies led to new perspectives both for agriculture, through the use of more resistant plants, such as laboratory use due to the reduction of animals used in research. Despite the ethical and environmental issues that are still discussed by ecologists and biotechnology companies, several methods have been developed for the production of transgenic humans, the methodology used varies with the type of change that is sought: introduction, modification or inactivation of a gene.

Keywords: *transgenic, methods, production.*

INTRODUÇÃO

Há muito tempo pesquisadores e cidadãos de todo mundo tem discutido a produção e comercialização de alimentos transgênicos, entretanto, a exceção de cientistas, pouco se conhece sobre os métodos para produção de tais organismos, sendo assim o presente trabalho tem por intuito, através de uma revisão bibliográfica, descrever tais mecanismos ressaltando sua importância e eficácia.

Duas décadas depois da descoberta do DNA por Watson e Crick, geneticistas começaram a desenvolver processos de laboratório para manipular e interferir nas sequências de DNA, dando origem ao que ficaria conhecido como engenharia genética. As possibilidades nas áreas de saúde humana e agropecuária logo ficaram evidentes: modificar genes para corrigir “defeitos”, como doenças, ou introduzir características desejadas, através da transferência de genes inteiros de um organismo para outro, quando então o Organismo Geneticamente Modificado é dito “transgênico”, pois adquire

uma característica que nunca fizera parte do repertório de sua espécie e, mais que isso, a capacidade de transmiti-la para seus descendentes, uma vez que o traço genético é definitivamente incorporado ao genoma do organismo alterado (LEITE, 1998).

Dessa forma nos últimos anos, os avanços na biotecnologia sucederam-se a um ritmo frenético. Graças a eles, foi possível dominar o processo de alteração genética, a ponto de alterar o genoma animal, ou seja, o material responsável pelas características hereditárias do ser vivo, e criar um organismo transgênico em laboratório que pode possuir genes de outras espécies em seu genoma. Isso aconteceu porque o DNA - que contém a informação genética - é uma molécula que pode ser transferida de uma espécie para outra. O maquinário celular responsável por sua transcrição e tradução em proteínas é semelhante em todos os organismos vivos. Com as técnicas descobertas nas últimas décadas, é possível manipular o DNA com o objetivo de alterar o genoma de forma controlada, criando diferentes espécies mutantes de camundongos, ratos,

coelhos, porcos, ovelhas, cabras, cães, galinhas, macacos e vacas, dentre outras (PESQUERO *et al.*, 2007).

Sendo assim durante o século XX o mundo passou pelo que se pode chamar de “revolução” biotecnológica. Vivenciamos a descoberta de remédios como a penicilina, o desenvolvimento das técnicas de transplantes, a manipulação genética vegetal e animal, até a realização do mapeamento do genoma dos seres vivos. As ciências biomédicas trouxeram para a realidade social, a possibilidade de fazer combinações de genes e espécies distintas, antes incompatíveis (MYSZCZUK, 2002).

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE TRANSGÊNICOS

Dentre as diferentes técnicas de manipulação genética, são empregadas na produção de Organismos Geneticamente Modificados duas metodologias principais: a) Adição de DNA e b) Modificação genética dirigida.

Adição de DNA

Nesta técnica, são adicionadas ao genoma do organismo uma ou mais cópias de um gene de interesse, sendo também denominada de adição gênica. O gene adicionado pode ser endógeno (já existente no genoma do animal) ou exógeno (genes pertencentes a outras espécies), sendo o primeiro caso utilizado para produção de grandes quantidades de determinada proteína, e o segundo caso utilizado para fazer um animal produzir uma nova proteína, ausente na forma desejada na espécie receptora (PESQUERO *et al.*, 2007).

O gene de interesse (também chamado de transgene) é transportado por um vetor e está contido em uma molécula de DNA ou RNA que carrega ainda outros elementos genéticos importantes para a sua manutenção e expressão. As formas de transferência desse vetor são muito variadas. Além da utilização de vetores existem outras formas de adição de DNA, como a transferência direta de DNA para protoplastos; transferência de genes por bombardeamento de partículas ou microinjeção pronuclear (TEIXEIRA; NARDI; SILVA, 2002).

1. Vetores não virais de transferência gênica

Um vetor pode definir-se como um agente capaz de promover uma ou mais etapas no processo global de transferência de material genético para plantas ou para suas partes qualquer que seja a sua

origem. A transferência de material genético exógeno engloba as seguintes etapas: integração, incorporação, transcrição, tradução, manutenção e transferência através de mitoses e meioses. Um vetor de genes permite a transferência de material genético entre plantas e também a transferência de informação genética de bactérias, fungos ou mesmo de animais para plantas (PINTO, 2003).

Muitos métodos podem ser utilizados, a partir de vetores, que por estarem associados à baixa imunogenicidade são considerados mais seguros, do que os métodos chamados de virais. Entretanto, podem não ser tão efetivos para transporte de genes quanto os métodos virais (COHEN, 2006).

1.1 Forma Plasmidial

O material a ser implantando pode ser encontrado na forma plasmidial, onde o gene de interesse é inserido em um plasmídeo (moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico, de origem bacteriana e eventualmente em eucarióticos unicelulares ou superiores), de expressão eucariota, promovendo assim a síntese da proteína desejada na célula alvo (MYSZCZUK, 2002).

Um dos exemplos da introdução de genes em plasmídeos é a produção de insulina (hormônio secretado pelo pâncreas que controla a utilização da glicose pela célula) por bactérias a partir da engenharia genética, esse método é muito utilizado para obtenção do hormônio em grande escala.

Com o auxílio de uma enzima de restrição (enzimas capazes de reconhecer e quebrar determinada sequência de DNA) é possível abrir o plasmídeo e introduzir nele um fragmento de DNA de outra espécie, que pode ser de uma célula humana, e responsável por determinada proteína. Depois que recebe o novo fragmento de DNA, o plasmídeo torna-se um DNA recombinante, isto é, uma molécula formada pela união de duas ou mais moléculas de DNA não encontradas juntas na natureza, e é introduzido na bactéria, que passa a produzir, uma proteína humana, como a insulina. Esse hormônio está ausente nos indivíduos portadores de diabetes, que, por isso, apresentam deficiência na utilização da glicose, com sérias consequências para a saúde. Quando a bactéria se reproduz, o DNA recombinante também se replica, passando para as novas bactérias (CARVALHO; SANTOS, 2006). Esse método é, portanto utilizado para a produção em massa desse hormônio, se tornando um aliado aos indivíduos portadores do diabetes.

1.2 Oligonucleotídeo antisense

Oligonucleotídeo são pequenas sequências de DNA ou RNA, que podem ser utilizadas para inibição de algum gene, estes têm a propriedade de localizar sequências de bases específicas e uma vez absorvidos pelas células, os oligonucleotídeos, funcionam no citoplasma bloqueando a tradução do RNA mensageiro, ou no núcleo, interferindo com o processamento nuclear (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

Os oligonucleotídeo possuem ainda a capacidade de associação com a dupla hélice da fita de DNA, formando uma fita tripla, não havendo assim a possibilidade de formação do RNA mensageiro, podem ainda impedir a passagem do RNA mensageiro pela membrana nuclear impedindo o transporte do núcleo para o citoplasma (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

Essas pequenas sequências de DNA, também se fixam em sítios específicos do RNA, impedindo a associação deste RNA com fatores de associação, ou a associação das subunidades do ribossomo sobre o códon de iniciação, ou ainda a tradução do RNA mensageiro (CRAVADOR, 1998).

Esse método é bastante vantajoso devido a sua especificidade e eficiência e tem sido utilizado para inibição de receptores de angiotensina (vasoconstritor que em grandes quantidades provoca aumento de pressão na filtração renal) em animais hipertensos (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

1.3 Lipossomo

Lipossomos são vesículas microscópicas formadas por uma bicamada de fosfolípidios, análoga à membrana celular (COHEN, 2006). Vetores de lipossomos consistem na mistura do DNA desejado com fosfolípidios, resultando na formação de complexos moleculares hidrofílicos envolvidos com moléculas hidrofóbicas, facilitando assim a passagem do material genético pela membrana celular e protegendo relativamente esse material do ataque enzimático intracelular (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

O método possui vantagens adicionais como a transferência de genes de vários tamanhos e a possibilidade de introdução gênica em diversos tecidos (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000), entretanto o uso de lipossomos ainda é pouco empregado devido à baixa taxa de implantação dos genes desejados e baixa expressão dos mesmos.

2. Vetores Virais

De todos os sistemas de transferência genética, os virais são os atualmente os mais utilizados na engenharia genética, devido principalmente a alta eficiência de transdução obtida com estes vetores. Todos os sistemas virais utilizados trabalham com vírus eficientes em replicação, que são capazes de transferir seu material genético para células-alvo, mas não conseguem replicar-se e continuar seu ciclo infeccioso (ROMANO, 2000).

Para isso, os segmentos do genoma viral responsáveis pela sua replicação na célula hospedeira são removidos e substituídos por um gene exógeno de interesse e respectivas sequências de função promotora e função acentuadora, tornando-o assim um vírus recombinante e também replicante incompetente (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

Os vetores virais podem ser divididos em duas categorias gerais – os que integram o seu material genético no genoma hospedeiro (integrantes) e aqueles que o não fazem (não integrantes). São três os tipos de vetores virais considerados integrantes (retrovírus, lentivírus e vírus adeno-associados) e um que se mantém como não integrante (adenovírus). Os vetores virais baseados em retrovírus foram os primeiros a serem testados, contribuindo assim para o desenvolvimento do estudo e aplicação deste tipo de vetor de uma forma geral (PEREIRA, 2002).

2.1 Retrovírus.

São vírus RNA encapsulados que, após infectar as células hospedeiras, transformam RNA em DNA e, então, integram o DNA no genoma da célula alvo (PEREIRA, 2002), o retrovírus utiliza uma transcriptase reversa para transformar o seu RNA em uma dupla fita de DNA, o qual se dirige para o núcleo e por ação da integrase viral o provírus se integra aleatoriamente a um cromossomo da célula desejada (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

Tais vírus possuem a capacidade de carregar sequências de tamanho médio e induzem resposta inflamatória mínima (NETO; ZATZ, 2006), e sua propriedade de integração ao genoma hospedeiro acentua a possibilidade de garantir a expressão estável do transgene (TEIXEIRA; NARDI; SILVA, 2002).

Nesta classe estão inclusos os lentivírus que constituem em outra forma de abordagem para o transporte de material genético. O vírus mais conhecido desta família é o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que possui a

capacidade invulgar de transfectar células que não estejam em fase de divisão (PEREIRA, 2002).

2.2 Adenoassociados

Representa um vírus DNA não encapsulado que causa certas doenças nos seres humanos. Esse vírus pode ser incorporado no cromossomo de células hospedeiras mantendo a expressão gênica, mesmo com a divisão celular. Originalmente, tais vírus infectavam apenas células em divisão, mas agora também são descritas infecções em células pós-mitóticas (COHEN, 2006).

Este vírus para se replicar necessita da presença de adenovírus (daí o nome de adenoassociado) ou herpes vírus, que lhe fornecem a maquinaria protéica em falta (NETO; ZATZ, 2006). O genoma viral integra-se com alta especificidade a um determinado cromossomo do genoma de células hospedeiras humanas. O vírus permanece latente na célula hospedeira e é por si só replicante-incompetente e só passa para uma fase lítica na presença do adenovírus, o qual irá viabilizar o processo expressando seus genes iniciais (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

Esses vírus possuem algumas vantagens em relação aos demais, devido a sua especificidade e ausência de patogenicidade, no entanto a necessidade de vírus auxiliares para a produção desses vetores tem limitado sua utilização (TEIXEIRA; NARDI; SILVA, 2002).

2.3 Adenovírus.

Os adenovírus constituem a família de vírus tumorais que possuem o genoma composto por mais de uma dúzia de genes, em DNA de fita dupla o que permite a inserção de grandes sequências de DNA exógeno, sendo a transfecção caracterizada pela manutenção do DNA episomal (sem integração no DNA genômico da célula hospedeira) no núcleo de células com capacidade ou não de divisão (PEREIRA, 2002).

Os adenovírus são bastante utilizados principalmente devido a pouca patogenicidade e pela produção e manipulação segura, além disso, podem infectar células em divisão ou não com muita eficiência (TEIXEIRA; NARDI; SILVA, 2002). No entanto ainda existem limitações em sua aplicação, em função do vírus ser episomal, o episomo pode ser perdido ou diluído quando a célula infectada se divide. Assim, muitos adenovírus podem perder-se, mas aqueles que permanecem expressam as proteínas desejadas. Isso também pode levar a resposta imune e destruir células hospedeiras (COHEN, 2006).

2.4 Vírus herpes simples

Trata-se de um vírus com DNA dupla fita, com um grande genoma capaz de se replicar em células hospedeiras que se dividem e aquelas que não se dividem, nas quais permanece no estado episomal (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

Esse tipo de vetor vêm ganhando um destaque grande pela sua alta capacidade de transferência gênica em células nervosas, assim acredita-se que a utilização desse vetor para a transferência genética em células do sistema nervoso seja uma alternativa no futuro (MYSZCZUK, 2002), dentre as maiores desvantagens destacam-se a dificuldade técnica em se obter preparações livres de vírus com capacidade replicativa, e pelo potencial de toxicidade na célula alvo (VASQUEZ; MEYRELLES, 2000).

3. Transferência de genes para protoplastos

Os protoplastos podem ser considerados um sistema experimental ideal para transferência de genes, e são definidos como células desprovidas de paredes celulares (EVANS, 1991). A integração de DNA nos protoplastos pode ser promovida através da utilização de agentes químicos (o mais popular é o polietileno glicol) ou utilizando equipamentos próprios – electroporadores – que através de correntes de alta voltagem induzem a formação reversível de poros na membrana plasmática através dos quais penetram as moléculas de DNA estranho.

A transformação genética de plantas por electroporação de protoplastos oferece a vantagem de não necessitar de um vetor biológico e de não haver barreira física para a introdução de DNA. É uma técnica rápida, simples e realizada sem agentes tóxicos às células (SANTARÉM, 2000). O maior obstáculo do método está na dificuldade de regeneração de plantas a partir de protoplastos transformados. Mesmo quando a regeneração é obtida, as plantas podem apresentar problemas de redução de fertilidade (RHODES; PIERCE; METTLER, 1989).

4. Transferência de genes por bombardeamento de partículas

Este sistema também chamado de biolística ou *gene gun* (do inglês, arma genética) baseia-se na capacidade que micropartículas pesadas (ouro ou tungstênio), cobertas com DNA, têm de integrar genes, virtualmente, em todos os tipos de células (PINTO, 2003). Dessa forma microesferas cobertas com DNA são aceleradas por um gás carreador, que projeta estas esferas contra as

células, promovendo a entrada do DNA no núcleo das células bombardeadas, o DNA é integrado no genoma da célula alvo e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução, durante a meiose, resultando na expressão estável do gene introduzido (FINER; FINER; SANTARÉM, 1996).

Essas células alvo podem ser desde micrósoros a células em cultura, células de tecidos diferenciados ou meristemas; elas podem estar à periferia ou no interior de tecidos; dependem apenas da otimização de parâmetros físicos (TEIXEIRA; NARDI; SILVA, 2002). Apesar de causar uma morte celular elevada, esse método é bastante eficiente, devido à facilidade de manusear e o grande número de genes implantados, podendo ser aplicado a uma grande variedade de células e tecidos (SANTARÉM, 2000).

5. Microinjeção Pronuclear

É um dos métodos mais antigos que são utilizados até hoje, é possível introduzir sequências longas de DNA de diferentes espécies no genoma de mamíferos, produzindo altos níveis de expressão e integração do transgene em células germinativas. Inicialmente, o DNA que se deseja inserir é isolado, quantificado, purificado, amplificado (ou seja, numerosas cópias da sequência são produzidas) e colocado em um tubo com uma solução apropriada. A seguir, com um micromanipulador acoplado a um microscópio de alta resolução, o DNA contendo centenas de cópias do transgene é injetado diretamente em um embrião recém-fertilizado (PESQUERO *et al.*, 2007).

Os ovócitos ou embriões modificados são implantados no oviduto ou no útero, respectivamente, de fêmeas com pseudogravidez (um estado semelhante ao da gravidez que ocorre em alguns mamíferos) induzida. Da primeira geração de animais mutantes, e de cada geração subsequente, são selecionados os animais homocigotos, ou seja, indivíduos que possuem um par de genes idênticos em determinado cromossomo, que são cruzados entre si, estabelecendo a linhagem transgênica (CARVALHO; SANTOS, 2006).

A primeira produção com sucesso de um rato transgênico com microinjeção pronuclear foi em 1980. O método de microinjeção pronuclear de produzir um animal transgênico resultou na introdução de sequências de DNA linear nos cromossomos dos ovos fertilizados. Se o material genético transferido estiver integrado num dos cromossomos embrionários, o animal irá nascer

com uma cópia desta nova informação em todas as células. O DNA estranho tem de ser previamente integrado no genoma para a duplicação do material genético que precede a primeira clivagem (PINTO, 2003).

Modificação Genética dirigida

A modificação genética dirigida ou controlada, inclui uma etapa a mais que a adição gênica: a cultura de células-tronco embrionárias. Essas células são modificadas *in vitro* (fora do organismo vivo, em tubo de ensaio) por um processo denominado recombinação homóloga - a troca de sequências de DNA correspondentes entre cromossomos, que ocorre naturalmente no núcleo das células - e dão origem a um animal com um gene inativado ou alterado. O princípio dessa técnica é a substituição de um gene-alvo por uma sequência mutada que, uma vez introduzida, irá inativá-lo ou modificá-lo (PESQUERO *et al.*, 2007).

Células embrionárias são derivadas de células de blastócitos normais. Estas células são totipotentes, o que significa que podem se desenvolver em qualquer tipo de tecido. Ao remover as células embrionárias da cultura e ao colocá-las novamente dentro do embrião (blastócito), ocorrem divisões nas células que se tornam partes do embrião. A transfusão permite inserir *in vitro* DNA estranho no genoma do indivíduo. As células dos clones identificados que mostraram a reação desejada são multiplicados *in vitro* e injetados em blastócitos e implantados em úteros de fêmeas pseudogravidas (PINTO, 2003).

Essa técnica possibilita substituir um gene funcional por uma sequência mutada que, uma vez introduzida, inativa o gene endógeno original, gerando um animal conhecido como modelo *knockout*. Da mesma forma, é possível alterar uma pequena sequência do gene, gerando um modelo *knockin* que produzirá uma proteína modificada em vez da proteína endógena intacta naturalmente presente no animal. O termo *knockin* se deve ao fato de, nessa técnica, o gene endógeno ser retirado do genoma e substituído por outro com uma pequena modificação (PESQUERO *et al.*, 2007).

PRÓS E CONTRAS DO USO DE TRANSGÊNICOS

O uso ou não de seres transgênicos ainda movimentam várias linhas de pensamento, ecologistas e empresas de engenharia genética ainda debatem os riscos da utilização desses seres para o consumo ou para pesquisas, cada qual

apresentando os pontos positivos e negativos na produção dos mesmos.

Pontos positivos

O principal ponto apresentado pelas empresas de engenharia genética é a possibilidade da incorporação de genes que não poderiam ser obtidos naturalmente, outra vantagem é a rapidez e eficiência com que esse gene é implantado, sem a necessidade de cruzamentos entre os seres envolvidos.

O uso de transgênicos também pode ser benéfico na agricultura devido às características que podem ser implantadas em plantas para o consumo humano, como a resistência a doenças e a pesticidas, maior valor nutricional, além disso, plantas mais resistentes a pragas necessitam menos agrotóxico, o que seria uma melhoria tanto para o meio ambiente como para a saúde humana (BLANC, 1986).

Pontos negativos

São vários os argumentos apresentados por pessoas contra o uso de transgênicos, dentre eles podemos citar: a complexidade dos genes que poderiam expressar características que não foram previstas prejudicando a saúde humana; o efeito competidor, por serem mais resistentes as plantas transgênicas poderiam inibir o crescimento de plantas nativas afetando assim a biodiversidade; o comportamento desses seres ao serem inseridos no meio, algumas espécies de plantas testadas se comportaram como “ervas daninhas”; além da possibilidade de cruzamento de organismos geneticamente modificados com organismos comuns produzindo assim mutantes (GREENPEACE, 2007).

Dentre os pontos citados vários outros são apresentados, em uma tentativa de inibir ou permitir a produção de seres alterados geneticamente, entretanto apesar dos debates cientistas especialistas em ecologia afirmam que os transgênicos não devem ser encarados como “seres diabólicos”, na imensa maioria das vezes sua introdução na natureza não causa grandes riscos ao meio, porém a alguns casos que deverão ser estudadas seriamente, a fim de definir as medidas de segurança a serem tomadas (ROBERTS, 1989).

CONCLUSÃO

As técnicas para a obtenção de transgênicos vêm evoluindo juntamente com a engenharia genética, com técnicas cada vez mais avançadas e eficazes. Podendo ser aplicadas desde técnicas simples e rápidas como a utilização de protoplastos, até técnicas mais complexas como a modificação genética dirigida, sendo ambas eficientes.

São também utilizadas técnicas antigas como a microinjeção pronuclear, que apesar de complexa demonstra ser bastante utilizada para a produção de organismos geneticamente modificados.

Os métodos desenvolvidos podem então ser divididos em duas metodologias, a adição de DNA que compreendem técnicas como a transferência direta de DNA para protoplastos; uso de vetores virais e não virais; transferência de genes por bombardeamento de partículas ou microinjeção pronuclear, e a modificação genética dirigida que se trata de uma metodologia bastante complexa que inclui a produção de células-tronco. Contudo mesmo com os inúmeros métodos desenvolvidos a maioria das pessoas ainda possui um pensamento pessimista em relação aos transgênicos a ponto de se considerarem “cobaias” para testes de engenharia genética, porém podemos perceber que mesmo perante a rejeição de sua produção, algumas empresas investem e comercializam tais alimentos, que já são liberados em alguns países como Estados Unidos.

Outro uso de transgenia que convivemos em nosso dia-a-dia é a produção da insulina, hormônio que não pode ser produzido naturalmente em indivíduos portadores de diabetes, através do uso de vetores é induzido à produção desse hormônio em bactérias, que posteriormente é injetado nos doentes para a correta degradação de glicose. A produção de insulina é hoje utilizada em grande escala, e possibilita uma qualidade de vida para os diabéticos.

Sendo assim o uso e desenvolvimento de transgênicos podem ser benéficos ou ainda discutíveis, sendo necessários grandes estudos e testes antes de sua produção e comercialização, além da necessidade de se comprovar sua verdadeira necessidade e impactos recorrentes de sua utilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLANC, M.; *L'Ere de la génétique La Découvert*, Paris, 1986.

CARVALHO, A.; SANTOS, R. *Utilização de Animais Transgênicos no Estudo da hipertensão Arterial*, Biologia Molecular, Belo Horizonte/MG, 2002.

COHEN, M. *et al*, *Terapia gênica em ortopedia*, Revista brasileira de ortopedia e Traumatologia, São Paulo/SP, 2006.

CRAVADOR, A. *Os DNA sintéticos anti-sentido*, Scielo, São Paulo/SP, 1998.

EVANS, D.A. *Use of Protoplast Fusion for Crop Improvement*, Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991.

FINER, J.J.; FINER, K.R.; SANTARÉM, E.R. *Plant Cell Transformation, physical methods for*. In., Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Weinheim: VCH Publishers, 1996.

GREENPEACE BRASIL, *O que há de errado com os transgênicos?*, acessado de <http://www.greenpeace.org.br>; São Paulo/ SP, 2007.

LEITE, M. *Os genes da discórdia – Alimentos transgênicos no Brasil*, Revista Política Externa, vol. 8, n° 2, 1998.

MYSZCZUK, A.P. *Manipulação Genética Humana*, Meio Ambiente Equilibrado e Desenvolvimento Sustentável, PUC/PR, 2002.

NETO, M.M.; ZATZ, M. *Terapia Gênica: Futuro tratamento para a Esclerose Lateral Amiotrófica?* Revista de Neurociência, vol. 14, São Paulo, 2006.

PEREIRA, P.N. *Vetores em Terapia Gênica: A boleia do Gene*, RNA Mensageiro o Jornal de Biociências, Coimbra – Portugal, 2002.

PESQUERO, J.B.; BAPTISTA, H.A.; MOTTA, F.L.; OLIVEIRA, S.M. *Aplicações dos Animais Transgênicos*, Scientific American Brasil, 56° ed., São Paulo/SP, 2007.

PINTO, P. *Seres Vivos Transgênicos*. Revista Ciências da Terra e da Vida, n° 14, 11° ed., 2003.

RHODES, C.A.; PIERCE, D.A.; METTLER, I.J.; *Genetically Transformed Maize Plants from Protoplasts*. Science, Washington/E.U.A., p. 204-207, 1989.

ROBERTS, L. *“Ecologists Wary About Environmental Releases”*, Science, Washington, 1989.

ROMANO, G. *et al*, *Latest development in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications*, Stem Cells, ed. 18, p. 19-39, 2000.

SANTARÉM, E. R. *Métodos Eficientes para a Transformação Genética de Plantas*. Revista de Ciência e Tecnologia; p. 81 – 90, 2000.

TEIXEIRA, L.; NARDI, N.; SILVA, E. *Terapia Gênica, Gene Therapy*, Scielo, Porto Alegre/RS, 2002.

VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S. *Manipulação da expressão gênica para o entendimento e tratamento de doenças cardiovasculares*, Revista Brasileira de Hipertensão, Vol. 8, p. 96 – 104, Vitória/ES, 2000.



Recebido em / Received: 2010-05-22

Aceito em / Accepted: 2010-07-13