

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Biologia Molecular Aplicada a Medicina Veterinária

Camila Moraes Alves

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Biologia Molecular Aplicada a Medicina Veterinária

Camila Morais Alves
Graduanda

Professora Dra. Marcia Almeida de Melo
Orientadora

Patos
Dezembro de 2009

Dedico esta vitória a minha filha Mariana,
aos meus pais, meus avós, minhas irmãs e ao meu
esposo pelo apoio e confiança durante este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força que sempre me proporcionou para que continuasse minha jornada.

A toda minha família, que sempre acreditaram em mim e me deram força para continuar.

A minha orientadora e Márcia por acreditar que eu seria capaz de aprender em tão pouco tempo a fascinante Biologia Molecular.

Ao Professor e amigo Paulo Paes de Andrade pelas aulas e ajuda em tudo inclusive com palavras amigas.

As minhas amigas Inês, Emily, Angélica, Cristiane, Iana, Aline Guedes, Annielle, a todos que sempre acreditaram que eu conseguiria concluir o curso mesmo com todas as dificuldades.

Ao casal mais lindo do mundo Kamila e Felício pela força e por terem sido sempre meus anjos da guarda.

Ao meu amigo e irmão (de coração) Iácome pelo companheirismo e apoio sempre.

Ao Bicho Fau pelas diversões nas horas de desespero, mesmo sendo raros os nossos encontros.

A Tereza Emmanuelle pela ajuda e ensinamentos.

Ao professor Almir pelas palavras de apoio e força.

A Fátima pelas palavras amigas sempre que precisei.

A todos do laboratório de Biologia Molecular da UFCG pela amizade e apoio.

Ao professor Fernando Borja, pela frase que me dava força, sempre que pensava que não aguentaria mais: você ainda rende mais 30% !

RESUMO

ALVES, Camila Morais. *Biologia molecular aplicada à Medicina Veterinária*.
Patos, UFCG. 2009, 43p. (Monografia de Graduação em Medicina Veterinária).

O Projeto Político Pedagógico do Curso de Medicina Veterinária da UFCG foi implantado em 04 de novembro de 2002, após aprovação em reunião ordinária do Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão (CONSEPE). Com o crescente avanço da biologia molecular, a introdução deste tema no curso a partir do componente obrigatório “Introdução à Biologia Molecular Celular” e a capacitação de professores nesta área, faz-se necessário que seja dada uma maior ênfase à um tema que poderá trazer benefícios ao CSTR por meio de fomento à pesquisa, publicações e qualificação profissionais. Desta forma, o objetivo desta monografia foi fazer uma revisão de literatura em técnicas de biologia molecular que estão sendo aplicadas em algumas áreas da Medicina Veterinária, na perspectiva de que professores, estudantes e funcionários, despertem para um tema que pode contribuir ainda mais para a formação profissional.

Palavras chave: Medicina Veterinária, biologia molecular, técnicas, capacitação profissional.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Griffith evidenciou que o princípio transformante (que fazia com que uma bactéria não virulenta assumisse uma forma letal para o rato) era termoestável e possivelmente formado por ácido nucléico (com maior probabilidade de ser o DNA).....12
- FIGURA 2** Três formas possíveis de dupla hélice do DNA. As formas A e B são dextrógiras e a Z é levógira.....13
- FIGURA 3** - Pares de base do DNA, com duas pontes de hidrogênio entre A-T e três entre C-G.....14
- FIGURA 4** - Três figuras retiradas do artigo original de Meselson e Stahl (1958). As duas figuras à esquerda e centro apóiam experimentalmente o modelo apresentado à direita.....15
- FIGURA 5** - Principais enzimas e proteínas envolvidas na forquilha de replicação eucariota.....17
- FIGURA 6** - Sinopse dos vários passos da síntese protéica eucariota, desde a ligação do mRNA ao ribossomo (iniciação), passando pela extensão do polipeptídeo (elongação) até o desligamento do ribossomo ao mRNA, no fim da síntese do polipeptídeo (terminação).....19
- FIGURA 7** - Sinopse das várias etapas necessárias à produção de uma proteína a partir da ativação de um gene. O núcleo está representado na parte inferior da figura e o citoplasma e o meio externo na parte superior.....20
- FIGURA 8** - Produção de novas fitas a partir de um DNA alvo pela PCR.....22
- FIGURA 9** - Esquema representativo de uma eletroforese em gel de agarose.....23
- FIGURA 10** - As várias etapas necessárias à visualização dos polimorfismos de DNA pela técnica de RFLP.....25
- FIGURA 11** - Resultado da investigação da presença de mutação no sítio EcoRI por PCR (PCR/RFLP).....26
- FIGURA 12** -. Visualização do resultado de um RAPD.....27
- FIGURA 13a-13b** - Geração de fragmentos de DNA fita simples por termociclagem e interrupção da extensão das fitas pela incorporação de um didesoxinucleotídeo.....29
- FIGURA 14** - Representação esquemática da clonagem de um segmento de DNA contendo um gene de interesse de um organismo doador num vetor plasmidial, pelo emprego de enzimas de restrição.....31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Funções das várias proteínas da forquilha de replicação.....	15
TABELA 2 - Tipos de RNA polimerase encontradas simultaneamente num eucarioto.....	18
TABELA 3 - Sinopse dos vetores empregados para clonagem de fragmentos de DNA.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 DNA.....	11
2.1.1 Estrutura química.....	11
2.1.2 Replicação.....	14
2.1.3 Transcrição.....	17
2.1.4 Tradução.....	19
2.2 TÉCNICAS DA BIOLOGIA MOLECULAR.....	21
2.2.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	21
2.2.2 Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP).....	24
2.2.3 DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD).....	26
2.2.4 Sequenciamento de DNA.....	27
2.2.5 Clonagem.....	30
2.3 APLICAÇÕES DA BIOLOGIA MOLECULAR NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	32
2.3.1 Epidemiologia.....	32
2.3.2 Clínica Médica / Diagnóstico.....	33
2.3.3 Vacinas.....	34
2.3.5 Imunologia.....	35
2.3.6 Produção de alimentos.....	36
2.3.7 Genética de Populações / Pedigree.....	36
3 CONCLUSÃO.....	38
4 REFERÊNCIAS.....	39

1. Introdução

A Biologia Molecular é o estudo da estrutura, função e interação entre as moléculas que compõem a célula, tais como: DNA, RNA, proteína, carboidratos e lipídeos. No século XX, houve um crescente avanço nesta área do conhecimento, inicialmente em espécies modelo como camundongo, rato e hamsters, e posterior aplicação para a espécie humana.

No início, como o conhecimento era dominado por poucos, os custos eram extremamente elevados, o que direcionava os estudos para centros de excelência. Com o advento da genômica, a dispersão do conhecimento (facilitado pela globalização e uso da internet), um maior aporte de fomento e a busca por técnicas mais rápidas, sensíveis, quantitativas e de alta repetibilidade tem estimulado pesquisas na área e o retorno à comunidade em forma de produtos biotecnológicos que são fornecidos por inúmeras empresas, consequentemente barateando os custos.

Várias técnicas de biologia molecular já estão estabelecidas em diversas áreas da saúde humana, entretanto, pela diversidade dos animais domésticos e silvestres, em várias situações os procedimentos laboratoriais não possuem repetibilidade entre espécies distintas.

No Curso de Medicina Veterinária da UFCG, a disciplina de Introdução à Biologia Molecular só foi acrescentada ao Projeto Pedagógico na reformulação curricular de 2002, sendo ainda incipientes as atividades nesta área por parte dos professores, funcionários e alunos. Com isto, objetivou-se com esta monografia apresentar aplicabilidades das técnicas de biologia molecular em Medicina Veterinária, longe de ser um documento completo pela própria complexidade do tema, como estímulo para que a mesma seja mais difundida no CSTR.

2. REVISÃO

2.1 DNA

2.1.1 Estrutura química

O conceito moderno da transmissão de características físicas de um indivíduo a outro através de genes não surgiu senão com os trabalhos de Mendel. Entretanto, muito antes dele, Guy de Maupertuis especulou sobre a forma como pai e mãe contribuíam para as características do filho. Também como Darwin, embora de forma puramente conjectural, Maupertuis imaginou que uma adaptação ao ambiente poderia ser uma força motriz para a modificação das espécies. Entretanto apenas com Mendel, em 1865, as bases da genética foram lançadas.

Durante mais de 50 anos, contudo, ninguém sabia de que eram constituídos os genes. Pela sua complexidade, as proteínas eram candidatas naturais a codificar as características de um indivíduo, ficando o DNA, com sua simplicidade composicional (apenas um açúcar, um fosfato e quatro bases nitrogenadas) relegado à posição de organizador das proteínas no núcleo.

Esta concepção foi inicialmente posta em dúvida por Griffith em 1928, quando estudava um novo sistema de sorotipagem de *Streptococcus pneumoniae* (naquela época conhecidos como pneumococos). Na ocasião Griffith não podia imaginar quanta pesquisa seria iniciada por causa de seus resultados 25 anos depois. O núcleo deste “bomba de efeito retardado”, como chamou Kornberg (1976), foi a observação de que bactérias virulentas (que apresentavam cápsula), se mortas pelo calor, continham ainda assim uma substância que podia não apenas converter uma bactéria avirulenta da mesma linhagem numa forma patogênica, como também fazia o mesmo com bactérias de outras linhagens, sem cápsula. A conversão ficou conhecida como transformação. A figura 1 mostra o experimento de Griffith.

Foi somente em 1944, contudo, que Oswald Avery e seus colaboradores (Avery et al, 1944) identificaram o ácido nucléico como o componente responsável pela transformação das bactérias. Neste novo experimento, a forma da colônia (lias ou rugosa) era alterada durante a transformação, o que podia ser observado em placas de Petri. Por outro lado, as bactérias virulentas foram mortas e delas purificados DNA, RNA e proteínas, e subsequentemente tratados com DNase, RNase e proteases. Apenas o DNA não tratado com DNase era capaz de transformar as bactérias. As bactérias avirulentas podiam ser transformadas (isto é, podiam produzir colônias com o formato característico das formas virulentas) a partir de uma quantidade muito pequena de DNA (cerca de 1 ng/ml). Se o princípio transformante fosse tratado com RNase ou proteases (tripsina ou quimiotripsina), ele continuava ativo, mas era totalmente inativado com diminutas concentrações de DNase. Estes resultados provavam cabalmente que o DNA era o mensageiro genético de algum fator de virulência, que estava ligado à cápsula bacteriana.

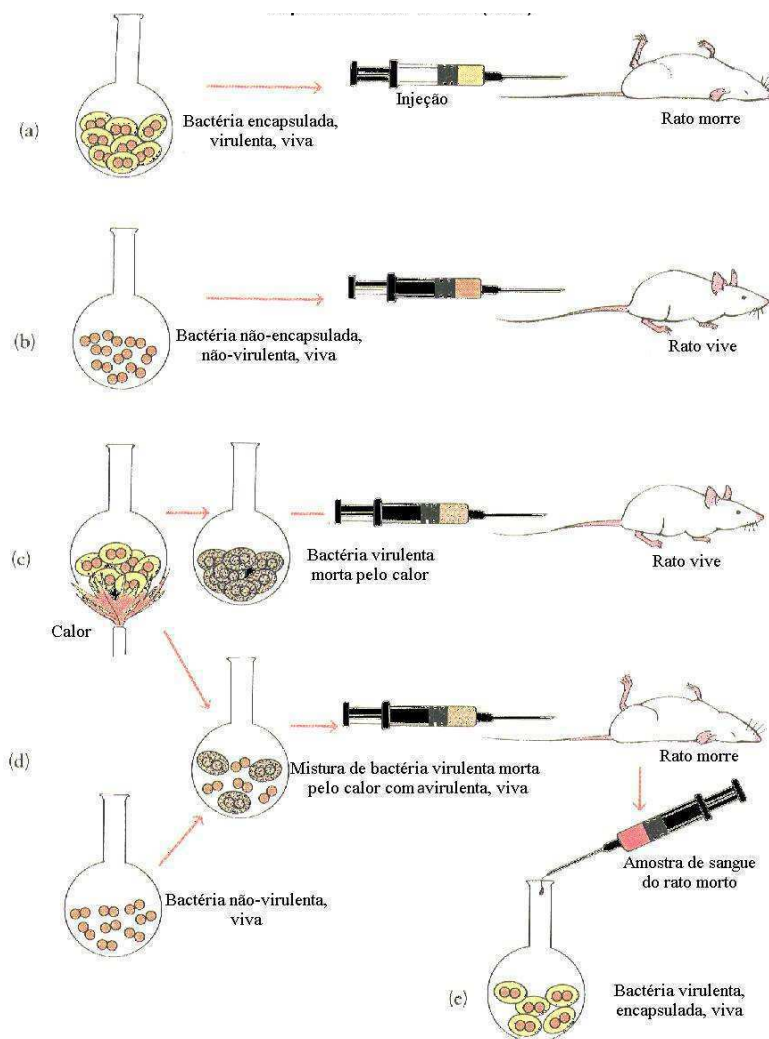


FIGURA 1: Griffith evidenciou que o princípio transformante (que fazia com que uma bactéria não virulenta assumisse uma forma letal para o rato) era termostável e possivelmente formado por ácido nucléico (com maior probabilidade de ser o DNA).

Embora estivesse então bastante claro que o DNA era a substância da qual eram formados os genes, a estrutura o DNA permanecia, contudo, desconhecida. Uma verdadeira corrida então se iniciou para a descoberta desta estrutura, tendo grandes nomes, como Linus Pauling, entre os competidores. Coube a Watson e Crick, em 1953, provar que o DNA é constituído por uma dupla hélice de nucleotídeos (Watson & Crick, 1953). A estrutura originalmente proposta é chamada hoje de forma B do DNA: uma hélice dupla dextrógira, com as bases voltadas para dentro e os açúcares (desoxirriboses) e fosfatos voltados para fora. A denominação DNA (ácido desoxirribonucléico) é dada pelo açúcar que está presente em sua molécula, a desoxirribose, formada por um anel de átomos de carbono e oxigênio (FARAH, 2007). Mais tarde outras formas de hélice foram identificadas, como o DNA Z, levógiro (isto é, retorcido na direção oposta ao DNA B) e o DNA A. Apenas as formas B e Z parecem existir na Natureza. A figura 2 mostra as 3 formas da dupla hélice de DNA. Nos organismos a forma B costuma ser

transcricionalmente ativa, isto é, transcritos de RNA podem ser produzidos tendo como molde uma das fitas do DNA. A forma Z não pode ser transcrita. Um mesmo cromossomo pode ter trechos na forma B e outros na forma Z e permutar as conformações de acordo com as necessidades da célula.

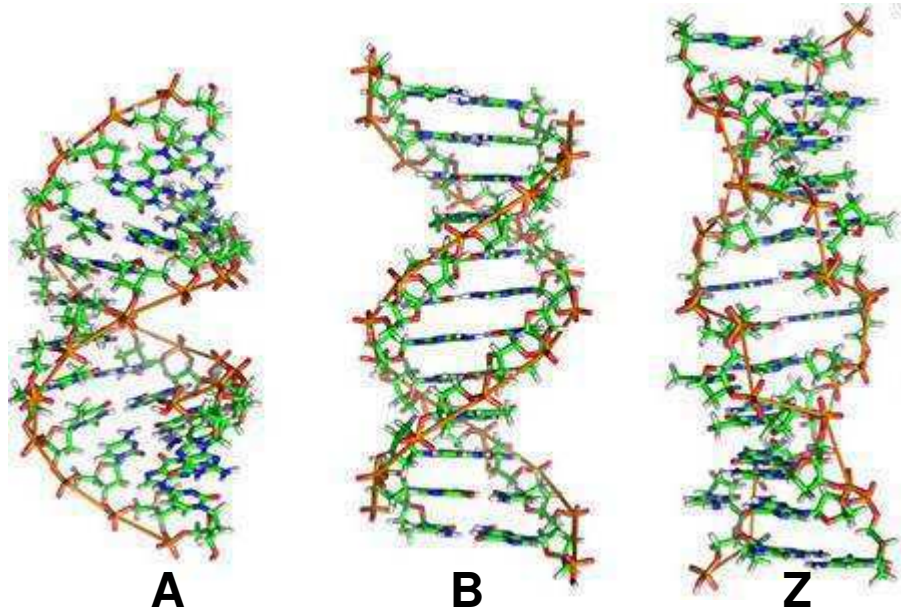


FIGURA 2: Três formas possíveis de dupla hélice do DNA. As formas A e B são dextrógiras e a Z é levógira.

O conhecimento da estrutura do DNA foi uma mola propulsora para muitas descobertas fundamentais que logo se seguiram, entre elas o código genético e a forma como os genes são regulados e transcritos.

O ácido desoxirribonucléico (DNA) contém todas as informações necessárias para a construção das células e tecidos de um organismo (LODISH et al., 2002). Um segmento de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biológico funcional, seja proteína ou RNA, é referido como um gene (NELSON e COX, 2002), que representa, na visão mendeliana, a unidade de hereditariedade que controla os traços ou as peculiaridades de um organismo (LODISH et al., 2002).

A molécula de DNA, na sua forma nativa, é composta por duas fitas ou cadeias de nucleotídios unidas por pontes de hidrogênio estabelecidas entre as bases complementares de cada fita. Adenina sempre está pareada com a timina (A-T) e a citosina com a guanina (C-G). Cada fita tem uma extremidade 5' e uma extremidade 3' dadas pelos carbonos disponíveis das últimas moléculas de açúcar (fig. 3). As duas cadeias de uma molécula correm em direções opostas (antiparalelas), formando uma dupla hélice com uma volta completa a cada 10 nucleotídios (3,4 nm), na forma B do DNA (EÇA et al., 2004).

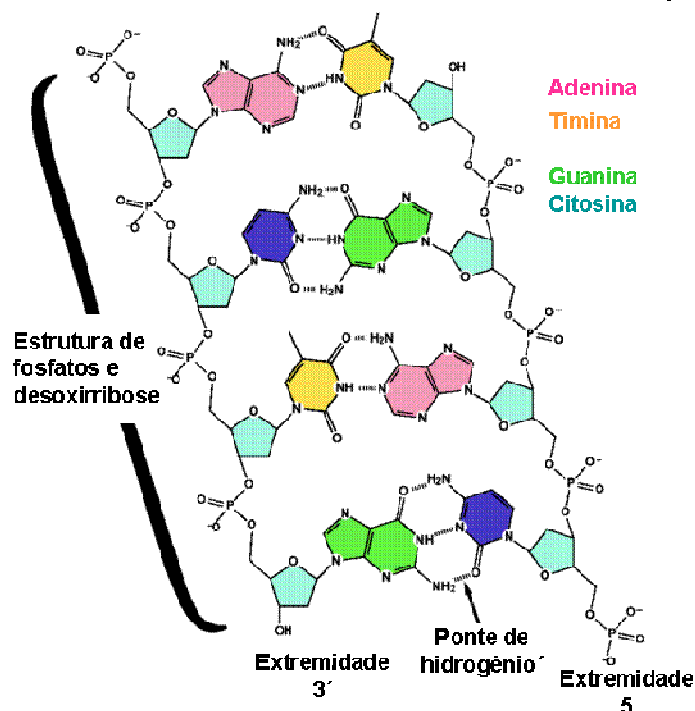


FIGURA 3. Pares de base do DNA, com duas pontes de hidrogênio entre A-T e três entre C-G. Fonte: <http://faculty.ksu.edu.sa>

2.1.2 Replicação

O DNA tem a capacidade de se auto duplicar, esse processo é chamado de replicação. Para que ocorra a replicação, a molécula de DNA se desenrola, as cadeias se separam e são sintetizadas duas novas fitas, usando como modelo cada uma das cadeias originais. (EÇA et al., 2004). O processo de replicação começou a ser desventado ainda na década de 50, quando Max Delbrück apresentou na Academia de Ciências dos EUA os resultados de Meselsohn e Stahl (1958). Os autores esclareceram uma dúvida central sobre a forma como o DNA se replica: as duas fitas velhas permanecem juntas ou cada fita velha sai pareada com uma fita nova?

O experimento baseou-se na diferença esperada de peso entre fitas de DNA de *E. coli* que fossem sintetizadas em presença de N^{15} (isótopo pesado) ou na presença do nitrogênio normal (N^{14}). Como as bases de DNA são nitrogenadas, a incorporação de um isótopo ou outro poderia dar uma pequena diferença na densidade do DNA. Os autores cultivaram então por algum tempo a *E. coli* em presença de precursores de DNA (os trifosfatos de desoxiadenina, desoxiguanina, desoxicitosina ou desoxitimina), recuperaram as bactérias da cultura e passaram a acompanhar a densidade do DNA fita dupla do organismo (que tem um DNA circular) por várias gerações. A densidade era avaliada pela posição da banda de DNA (ou das bandas) em tubos de centrífuga que continha cloreto de cério. Ao centrifugar em alta velocidade este material, forma-se um gradiente de densidade e isso separa moléculas com densidades diferentes. Três figuras do artigo original estão abaixo e demonstram como a incorporação do isótopo pesado altera a sedimentação no gradiente de $CsCl_2$, após ultra-centrifugação (esquerda) e como o padrão “pesado” vai se alterando em gerações subsequentes em direção ao padrão leve quando os precursores marcados

com isótopo pesado são retirados da cultura (meio). Por fim o modelo de replicação semi-conservativa, hoje clássico, é apresentado (direita).

TABELA 1 - Funções das várias proteínas da forquilha de replicação

* A função mais provável da Pol ϵ é a replicação de uma das fitas na forquilha de replicação, tendo como parceira a Pol δ . (BURGERS, 2009).

Proteína	Função
RPA	Proteína ligadora de fita simples, também conhecida como SSB; estimula ação das DNA polimerases; facilita a entrada da helicase na forquilha de replicação
PCNA	Estimula a ação da DNA polimerase e da RFC ATPase
RFC	ATPase DNA-dependente; media a ligação entre primer e DNA molde; estimula a ação das DNA polimerases; carrega a PCNA no replicossomo.
Pol α /primase	Síntese de primer de RNA a partir do molde de DNA
Pol δ/ϵ *	DNA polimerase; tem também ação exonucleásica 5'-3'.
FEN1	Nuclease que auxilia a retirada dos primers pela Pol δ
RNase H1	Nuclease que auxilia na retirada os primers
DNA ligase I	Ligação dos fragmentos de DNA, especialmente na fita descontínua
Antígeno T **	DNA helicase; montagem do primossomo (complexo de enzimas que é responsável pelo início da replicação do DNA)

** .O equivalente do antígeno T viral (SV40) em eucariotos ainda não foi descrito

Fonte: adaptado de Waga & Stillman (1998).

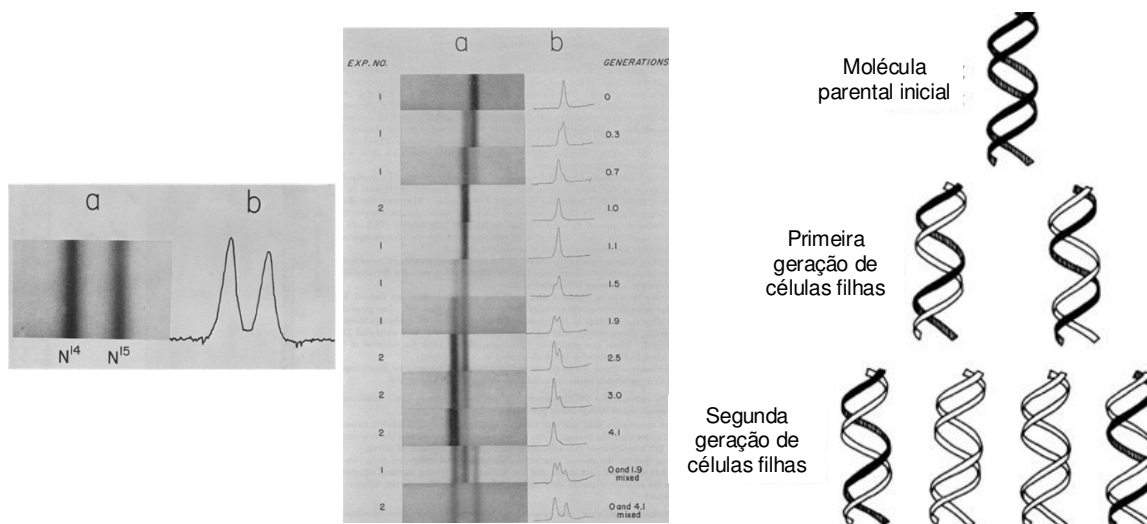


FIGURA 4 - Três figuras retiradas do artigo original de Meselson e Stahl (1958). As duas figuras à esquerda e centro apóiam experimentalmente o modelo apresentado á direita (veja texto acima).

A compreensão da replicação do DNA foi avançada com estudos “in vitro” do sistema de replicação do vírus de macaco SV40, um poliomavírus, que causa cancer em humanos e macacos, cuja molécula de DNA apenas codifica o iniciador da replicação e a helicase,

dependendo o vírus das demais polimerases do hospedeiro. *In vitro*, apenas uma molécula do vírus é necessária, o iniciador da replicação, ou antígeno tumoral maior (antígeno T), que é responsável pelo desenovelamento do DNA na origem de replicação (DEAN et al, 1987) sendo todas as outras moléculas de origem eucariota, provenientes de qualquer célula que se deseja investigar.

Muitas enzimas estão envolvidas na replicação do DNA, tais como primases, helicases, polimerases e ligases. Uma lista bastante completa daquelas que agem diretamente na forquilha de replicação nos eucariotos, formando o replicossomo, está mostrada na tabela 1.

Um esquema representativo da forquilha de replicação eucariota está mostrado na figura 5. As duas fitas de DNA se separam e uma delas forma uma alça, de maneira tal que duas moléculas de DNA Pol δ e ϵ possam sintetizar as novas fitas no mesmo sentido. Deve-se ressaltar aqui que todas as DNA- e RNA-polimerases só sintetizam no sentido 5' - 3'. A helicase (com o auxílio da girase, que trabalha mais à frente da forquilha de replicação) desfaz a hélice à medida que a forquilha avança. Trechos de DNA fita simples são protegidos de quebras mecânicas e ataques de DNAses pelas proteínas ligadores de fita simples RPA. A Pol α e primase (que com outras proteínas forma o primossomo) são as principais responsáveis pela síntese dos primers.

Para a síntese de uma nova fita de DNA, a DNA polimerase necessita de um primer pareado com a fita molde, isto é, um RNA (na Natureza) ou um DNA (na síntese *in vitro*) pareado com a fita simples que vai servir de molde para a síntese de novos nucleotídeos. O primer fornece a extremidade 3'-OH essencial para que a enzima se ancore no DNA molde e inicie a síntese de uma nova fita. A polimerase também necessita de precursores de DNA trifosfatados, que vão fornecer as bases nitrogenadas, o açúcar e o fosfato previamente ligados entre si, e a energia para a síntese. Por isso, tanto para a síntese da fita contínua como para a descontínua, há a necessidade da adição de primers. No primeiro caso um único primer é necessário, mas na fita descontínua os primers têm que ser adicionados à medida que a forquilha de replicação avança.

Os primers, contudo, devem ser retirados à medida que as fitas de DNA vão sendo sintetizadas, e isso é feito pela DNA Pol δ (ou ela DNA Pol I, na *Escherichia coli*). Ao final, a ligase junta todos os fragmentos de Okasaki (em homenagem ao seu descobridor), criando uma fita única contínua.

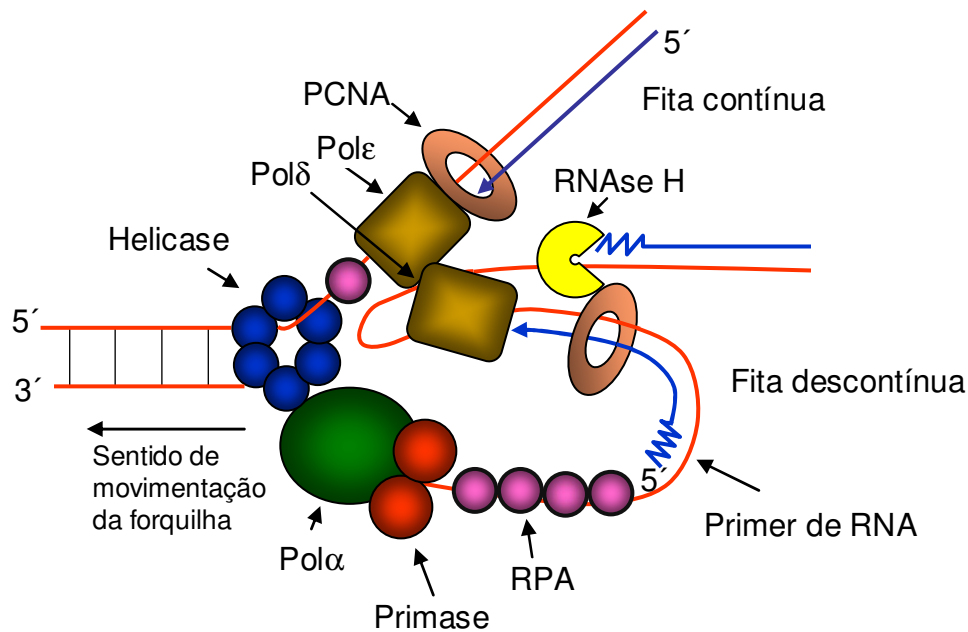


FIGURA 5 - Principais enzimas e proteínas envolvidas na forquilha de replicação eucariota. As fitas velhas de DNA, que servirão de molde, estão representadas em vermelho, e as recém sintetizadas, em azul. Primers estão representados como uma linha em zig-zag (adaptado de BURGERS, 1998, 2009).

A enzima transcriptase reversa, também uma DNA polimerase, é encontrada em vírus cujo genoma é composto por RNA e tem a notável propriedade de converter o RNA do genoma viral (e, em vitro, qualquer RNA, em uma cópia de DNA, antes de sua integração no genoma da célula hospedeira (FARAH, 2002). Entretanto, deve-se ter em mente que ela também necessita de um primer para fornecer a extremidade 3'-OH livre para sua ancoragem ao RNA molde. A transcriptase reversa é muito empregada na biologia molecular, em especial para a síntese de cDNA, ou DNA complementar ao mRNA eucarioto.

2.1.3 Transcrição

Recebe o nome de transcrição a síntese de molécula de RNA a partir de moléculas de DNA, que servem como modelo. A síntese é produzida pela união entre si dos nucleotídeos A, U, C e G, que se alinham de acordo com a ordem marcada pelos nucleotídeos complementares presentes no DNA. O pareamento é obtido pelo estabelecimento de ligações transitórias das bases do DNA com as bases do RNA em formação (DE ROBERTIS et al., 2008). A síntese de RNA é realizada pelas RNA polimerases, que também empregam precursores trifosfatados, como as DNA polimerases. Ao contrário destas, contudo, não necessitam de um *primer* ou iniciador para que a nova fita seja sintetizada. Nos procarionotes há apenas uma RNA polimerase, mas nos eucariotes costuma haver três, com funções distintas, conforme mostrado na tabela 2 a seguir. As RNA polimerases são compostas de muitas sub-unidades, até 14 diferentes moléculas, no que são muito mais complexas que as RNA polimerases procarionotas (tipicamente têm apenas 5 sub-unidades catalíticas e o fator sigma, responsável pela ligação da RNA pol ao promotor).

TABELA 2 - Os três tipos de RNA polimerase encontrados simultaneamente num eucarioto. Cada um é responsável por uma determinada atividade ou função. O tipo mais estudado é a RNA pol II, que transcreve mRNAs.

Tipo da polimerase	Localização	Tipo de RNA transcrito
I	Núcleo/ nucléolo	rRNA (exceto o 5S RNA)
II	núcleo	hnRNA (isto é. pré-mRNA)
III	núcleo	pequenos RNAs tais como tRNA e 5S rRNA

(fonte: http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Lectures/Topics/euk_transcription.html)

Tanto em procariotos como em eucariotos a transcrição se inicia pelo reconhecimento de um sítio específico do DNA pela RNA polimerase. Este sítio é chamado promotor. Nas bactérias ele tem uma estrutura bastante conservada, composta de duas caixas de 6 nucleotídeos, afastadas entre si cerca de 15 bases. Uma sub-unidade da RNAPolimerase reconhece esta estrutura e abre a fita dupla neste ponto. A síntese da fita de RNA se inicia logo abaixo deste ponto (no sentido 3' da fita codante ou no sentido 5' da fita molde) e procede em interrupção até que a RNA polimerase ultrapasse um sinal de terminação. Nas bactérias, mais uma vez, este sinal é relativamente conservado e é composto por uma sequência diádica (contendo duas sequências idênticas, voltadas uma a outra em fitas opostas e afastadas de poucos pares de bases), seguida de um trecho poli-T (na fita codante),

Nos eucariotos, sobretudo nos vertebrados e plantas, os promotores são muito menos conservados e por vezes muito difíceis de serem identificados. Da mesma forma, os sinais de terminação da transcrição são frequentemente desconhecidos.

O RNA possui três funções na síntese protéica, desempenhadas por três tipos de moléculas distintas. O RNA mensageiro (RNAm) carrega as instruções do DNA que especificam a ordem correta dos aminoácidos durante a síntese protéica (LODISH et al., 2002). O RNA transportador, carregado com seu aminoácido pela aminoacil-tRNA sintetase, acopla-se ao mRNA na cavidade do ribossoma e permite que o aminoácido adequado se ligue à cadeia polipeptídica nascente. E os RNAs ribossomais formam, com dezenas de proteínas específicas, as duas sub-unidades do ribossomo.

Há ainda outros RNAs na célula eucariota, como os pequenos RNAs nucleares e o RNA de interferência, descoberto há menos de uma década, que são responsáveis pelo silenciamento pós-transcricional de genes por um mecanismo mediado pelas enzimas Droscha, Dicer e Argonauta. Este mecanismo é também responsável pela inativação de muitos vírus no interior das células e começa a ser empregado na geração de plantas transgênicas resistentes a vírus.

2.1.4 Tradução

Tradução é o processo em que a informação no RNAm é interpretada por um segundo tipo de RNA chamado RNA transportador (RNAt) com a ajuda de um terceiro tipo de RNA, o RNA ribossômico (RNAr), e suas proteínas associadas. Ela ocorre no ribossomo e se inicia, nos procariontos, numa sequência específica de ligação da subunidade menor do ribossomo presente à frente de cada gene no mRNA procarionto. Nos eucariotos, a subunidade menor se liga diretamente à extremidade 5' do mRNA, que geralmente só contém o transcrito de um gene. A figura 6 representa os vários passos da tradução num eucarioto.

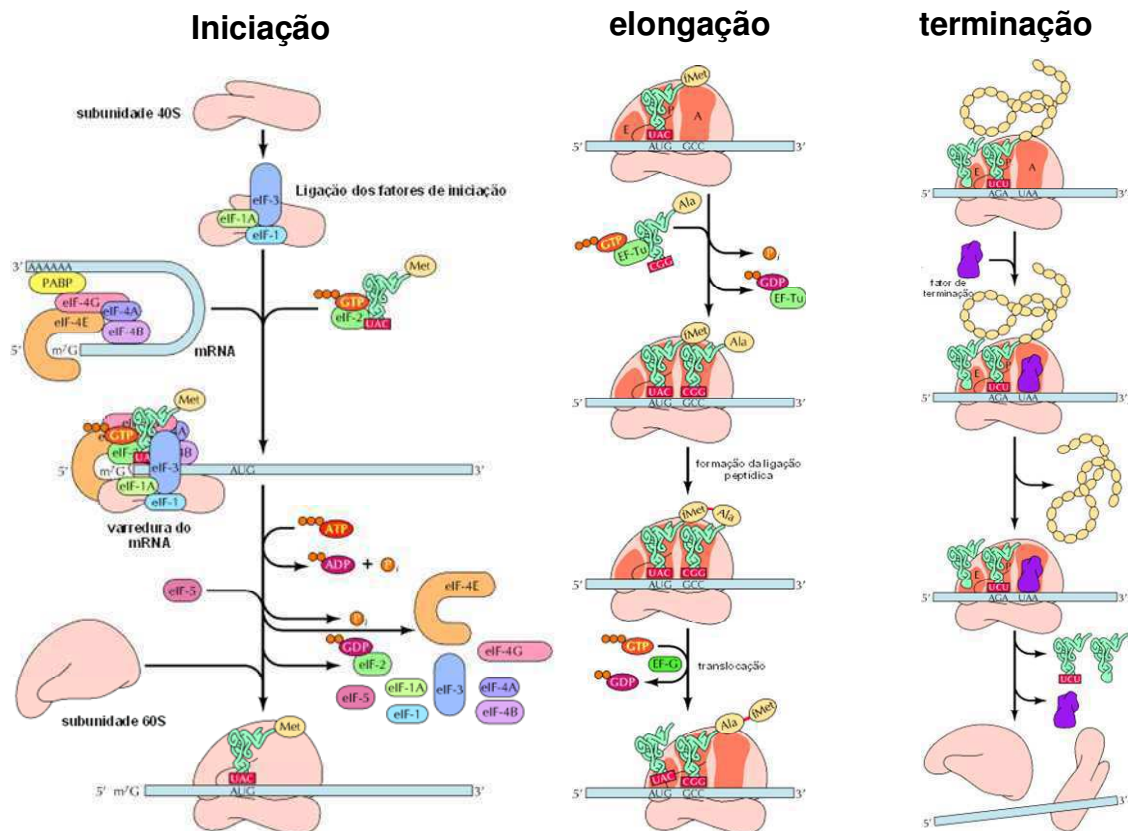


FIGURA 6 - Sinopse dos vários passos da síntese proteica eucariota, desde a ligação do mRNA ao ribossomo (iniciação), passando pela extensão do polipeptídeo (elongação) até o desligamento do ribossomo ao mRNA, no fim da síntese do polipeptídeo (terminação). (Fonte: COOPER, 2000)

Nos procariontos a tradução é realizada no mesmo compartimento da transcrição, isto é, no citosol. Daí os dois processos estarem, em geral acoplados: quando um mRNA começa a ser sintetizado, ele é imediatamente ligado (na sua sequência ligadora de ribossomos) pela sub-unidade leve do ribossomo e depois pela sub-unidade pesada, iniciando-se então a síntese proteica. Nos eucariotos, contudo, a síntese de RNA é realizado no núcleo e o mRNA, além de ter que ser inicialmente processado para a retirada de introns e a adição do cap 5' (ou boné) (constituído de 7-metil-guanosina) e da cauda poliA na extremidade 3', ainda precisa ser transportado para o citoplasma. A figura 7, a seguir mostra o atual estado de conhecimento das vias de sinalização e ativação da transcrição de um gene eucarioto e os vários passos que leva até a síntese da proteína, ou seja, à expressão do gene. Todo o processo começa quando um receptor de superfície é dimerizado pela

ligação com uma molécula que indica à célula a necessidade da expressão de um ou mais genes. O receptor dimerizado dispara uma cascata de sinais que leva à ativação de fatores de transcrição. Estes passam ao núcleo e sinalizam à RNAPol II a presença do promotor, o que leva à produção de um pré-mRNA. Nesta etapa a alteração da configuração da cromatina também é importante. Ao transcrito primário (pré-mRNA) é adicionado o *cap* e a cauda poliA e dele são retirados os introns (no processo conhecido como *splicing* ou encadeamento), o mRNA é empacotado para exportação ao citoplasma, onde vai ser traduzido. Na síntese da proteína os ribossomos poderão ficar livres no citoplasma (no caso da síntese de proteínas solúveis) ou ligados ao retículo endoplasmático, no caso das proteínas de membrana ou de exportação. Nos dois casos a proteína sofrerá um dobramento, adquirindo sua forma tri-dimensional final (estrutura terciária).

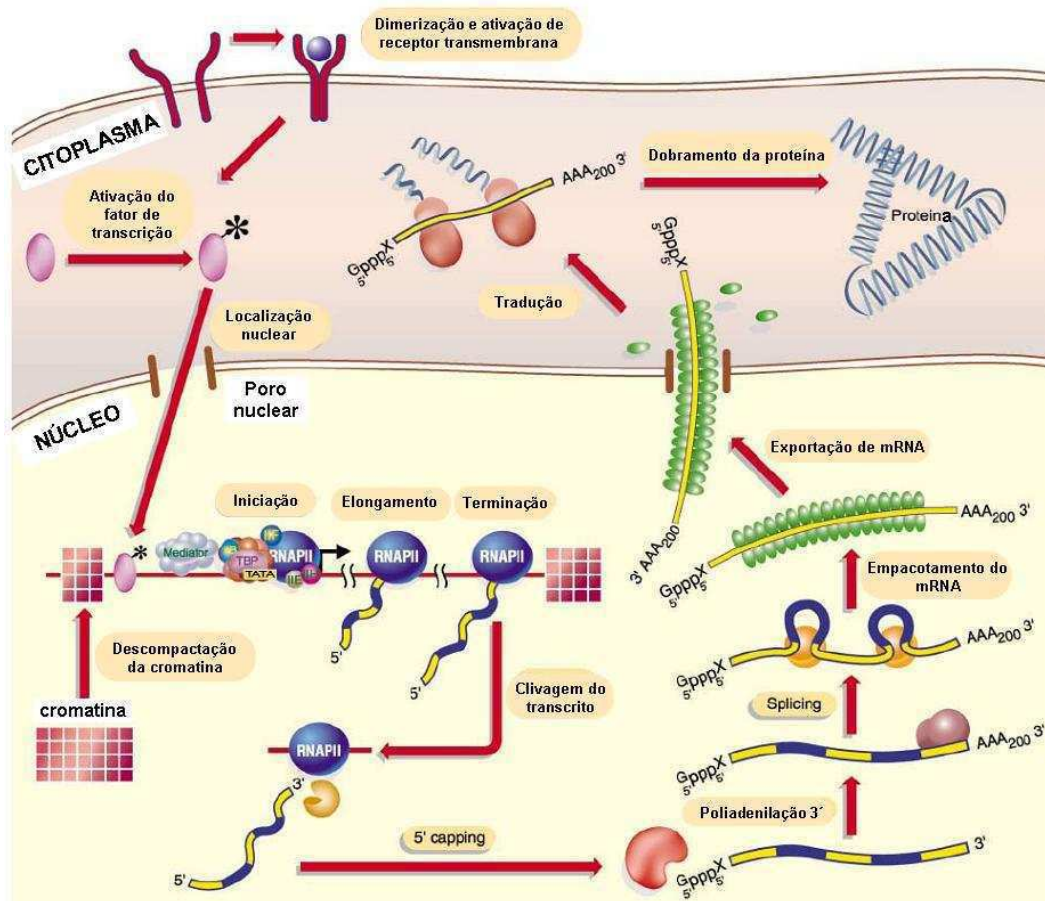


FIGURA 7 - Sinopse das várias etapas necessárias à produção de uma proteína a partir da ativação de um gene. O núcleo está representado na parte inferior da figura e o citoplasma e o meio externo na parte superior. (Fonte: ORPHANIDES & REINBERG, 2002).

2.2 TÉCNICAS DA BIOLOGIA MOLECULAR

A maior parte das técnicas que envolvem a biologia molecular derivou do conhecimento aprofundado da estrutura dos ácidos nucleicos e dos mecanismos de replicação, transcrição e tradução, brevemente revistos na parte inicial deste texto. O uso destas técnicas é muito variado, e inclui desde tipagem genética de organismos até a expressão heteróloga de proteínas, a construção de genomas e a obtenção de perfis de expressão gênica em mRNA ou em proteínas. A seguir serão apresentadas algumas das técnicas mais usuais baseadas na biologia molecular e discutidas aplicações na área veterinária.

2.2.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

É uma técnica rápida e simples de ser realizada que faz a amplificação de uma sequência de nucleotídeo desejada contida em uma amostra complexa de DNA (MIR et al., 2004). Foi proposta por Kary Mullis, em 1985, com a simples idéia de que para obter uma sequência de DNA em quantidade, basta amplificá-la através de uma DNA polimerase *in vitro*. Mullis ganhou Prêmio Nobel em Química em 1993 por sua descoberta, embora H. Gobind Khorana (também laureado com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, em 1968, pela interpretação do código genético e de sua importância na síntese protéica) e Kjell Kleppe tivesse proposto as bases para a PCR anteriormente a ele. Entretanto, a inovação de empregar a ciclagem térmica no processo de amplificação foi decisiva para que Mullis recebesse os créditos do desenvolvimento do PCR.

A reação se baseia em ciclos repetidos de replicação *in vitro* da molécula de DNA. Cada nova molécula sintetizada em um ciclo é utilizada como molde no ciclo seguinte, resultando no aumento exponencial do número de moléculas. Isso ocorre porque, com o aumento de temperatura para a desnaturação da molécula sintetizada no ciclo anterior, esta agora funciona como molde de replicação (MIR et al.; 2004). Na técnica de PCR, o fragmento de DNA a ser amplificado deve apresentar dois sítios complementares aos iniciadores (*primers*) utilizados na reação. Todas as DNA polimerases requerem uma pequena porção do DNA de fita dupla para o início de sua síntese (WATSON et al.; 2009). Estes sítios devem estar presentes em fitas opostas do DNA a uma distância compatível com a capacidade de extensão da polimerase, que em geral não excede 1500 pb (BORÉM e CAIXETA.; 2009).

A figura 8 mostra como a PCR leva a um aumento exponencial do número de cópias da molécula. Todos os componentes da reação são colocados juntos no tubo, que é então selado para evitar a evaporação. Os componentes são:

- a) a DNA polimerase termoestável, conhecida como Taq polimerase.
- b) o DNA alvo (que pode estar em mistura com muitos outros DNAs e mesmo com proteínas, açúcares e lipídeos).
- c) o par de primers
- d) os precursores de síntese de DNA, ou desoxirribonucleotídeos trifosfatados, geralmente designados como dNTPs.
- e) tampão de reação e sais de magnésio e potássio.

A desnaturação da fita dupla de DNA original (proveniente do organismo do qual se quer amplificar um pequeno segmento de DNA) é feita em geral pela elevação da temperatura do tubo a 94 °C. Assim que a temperatura baixar para 56 °C (a temperatura exata dependerá de muitas variáveis ou objetivos do experimento), os primers irão parear com suas regiões de complementaridade. A temperatura deve então ser elevada para 72°C, que é a ideal para a

atividade polimerásica da Taq. Duas fitas novas de DNA são então sintetizadas, de moldes complementares e em sentidos opostos. O processo então se reinicia e os primers poderão parear agora em 4 fitas molde, gerando quatro outros DNAs fita simples, sendo dois deles de comprimento definido (indo da extremidade de um primer à do outro). Repetindo o processo pelo menos 20 vezes há um aumento teórico de 1 milhão no número de cópias. Em geral o PCR se prolonga por 30 a 35 ciclos, para garantir que os fragmentos amplificados se acumulem exponencialmente na reação com um elevado número de cópias atingido. Como cada temperatura é mantida por cerca de 1 minuto, a reação toda leva de 2 a 3 horas. O resultado (isto é, a banda de DNA amplificada) deve ser observado em eletroforese em gel de agarose (em geral) ou poliacrilamida, mais raramente, quando fragmentos pequenos são gerados na reação. Na eletroforese a posição das bandas é relativa à sua massa molecular, representada figura 9. As bandas não têm distinção de coloração, aparecendo em geral esverdeadas ou alaranjadas, dependendo do corante empregado para visualizar o DNA.

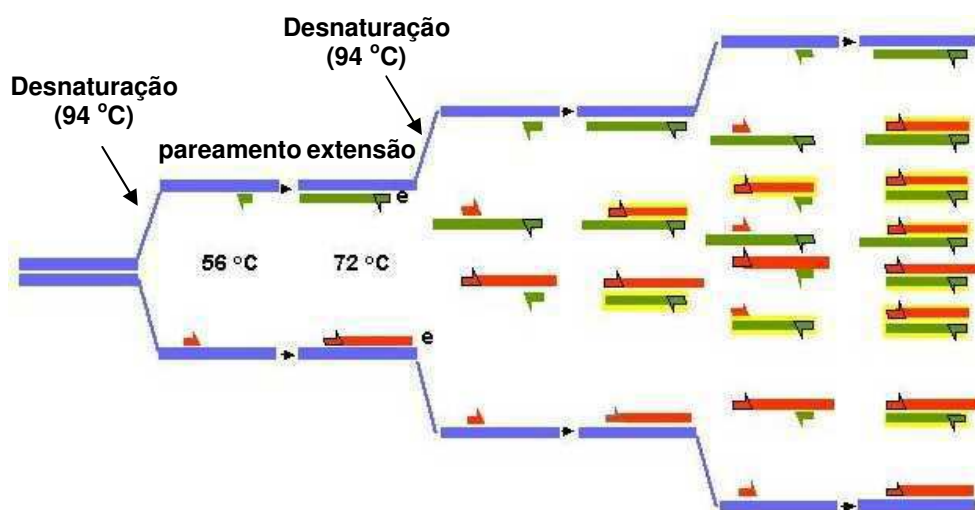


FIGURA 8. Produção de novas fitas a partir de um DNA alvo pela PCR, dando origem a fragmentos estendidos (indicados no primeiro ciclo pela letra e) e fragmentos amplificados (contornados em amarelo). (Adaptado de www.ufpe.br/biolmol).

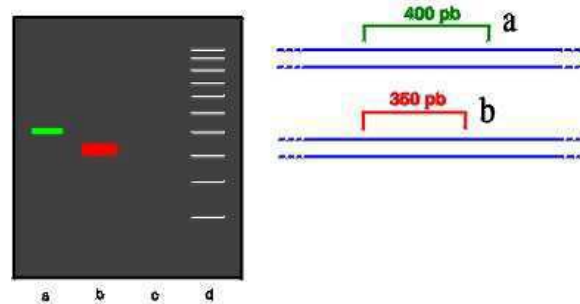


FIGURA 9. Esquema representativo de uma eletroforese em gel de agarose. Colunas a e b representam produtos de PCR correspondentes às amplificações dos alvos mostrados à direita na figura. A coluna c é a reação controle negativa, em que todos os componentes estão presentes no tubo, menos o DNA alvo. A coluna d mostra os marcadores de peso molecular, em geral pré-determinados pelo fabricante, e que auxiliam no cálculo estimado da massa molecular das bandas (em termos de pares de bases).

O desenho dos iniciadores é uma etapa fundamental para garantir a eficiência e especificidade da reação de amplificação. O objetivo principal de desenhar iniciadores é obter especificidade, pois cada membro do par pareia de forma estável a sua sequência-alvo no DNA-molde. Como regra geral, quanto maior um oligonucleotídeo, mais alta é a sua especificidade para determinado fragmento-alvo. (BORÉM e CAIXETA, 2009). Há hoje excelentes programas gratuitos, disponíveis online, para o desenho de primers, que garantem boa amplificação e testam a especificidade dos primers, sendo um dos mais empregados o PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

O uso da transcriptase reversa para iniciar a amplificação de sequências de RNA (produzindo o cDNA intermediário), a automação em aparelhos específicos e a descoberta de novas enzimas fizeram da PCR uma técnica muito difundida e essencial em laboratórios de biologia molecular (MIR et al.; 2004). A técnica tem sido usada para clonar fragmentos de DNA originário de humanos que permaneceram mumificados e animais em extinção, criando novos campos de arqueologia e paleontologia moleculares. Epidemiologistas podem usar a PCR em DNA de amostras de restos humanos para traçar a evolução de viroses patogênicas humanas. (NELSON e COX; 2002). Fontes de DNA para PCR incluem biópsias embebidas em parafina por mais de 40 anos, amostras de sangue coletadas de calcanhares de recém-nascidos e estocadas como gotas seca em cartão para a detecção neonatal da fenilcetonúria; e mesmo o dente de uma criança de Neanderthal de 10 a 11 anos de idade, datando de 100 mil anos atrás (WATSON et al.; 2009)

Uma das desvantagens da PCR é que a menor contaminação do material inicial com produtos de amplificação previamente obtidos de um DNA semelhante pode ter sérias consequências. Um controle essencial é a condução da amplificação da PCR sem DNA-molde para testar contaminantes nos reagentes das reações. Uma maneira simples e muito eficiente de redução da contaminação é a separação física das etapas de pré e pós-amplificação, que nunca deverão estar na mesma área usada no preparo das reações (WATSON et al, 2009).

2.2.2 Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

No início dos anos 70 surgiu o primeiro tipo de marcador molecular, que permitiu detectar as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA (GRODZICKER et al., 1974). O desenvolvimento deste tipo de marcadores dependeu de outra descoberta importante, o sistema de restrição e modificação bacteriano, descrito por Linn e Arber (1968) e Meselson e Yuan (1968). Inicialmente os RFLPs eram identificados a partir de Southern blots dos digestos resultantes da ação de uma enzima de restrição sobre o DNA a testar e de sua hibridação com sondas marcadas radiativamente. A técnica, embora muito informativa, era muito rebuscada e cara. Com o desenvolvimento do PCR, a sequência que contém o sítio de restrição variável é previamente amplificada, o produto de PCR é incubado com a enzima de restrição adequada e as bandas formadas pela digestão do fragmento de DNA identificadas no gel de agarose (STRACHAN e READ, 2002). Esta técnica é frequentemente chamada de PCR-RFLP.

Em virtude das variações naturais que ocorrem no material genético de indivíduos de uma mesma espécie, principalmente causadas por mutações e recombinações, é possível detectar variações genéticas entre indivíduos por meio da técnica de PCR-RFLP (VIANA et al., 2009). As variações ou polimorfismos detectados decorrem da criação ou eliminação de sítios de restrição, devido à substituição ou modificação de bases (mutação), ou ainda em razão do rearranjo dos segmentos de DNA por efeito de deleções, inserções ou translocações ocorridas nas fitas de DNA, alterando a distância entre dois sítios de restrição adjacentes (BORÉM e CAIXETA, 2009; WYMAN e WHITE, 1980).

Na técnica de RFLP original, o DNA das amostras a serem analisadas deve inicialmente ser extraído e purificado; após a purificação, o DNA é tratado com enzimas de restrição e clivado em vários fragmentos de diferentes comprimentos, de acordo com a distribuição dos sítios de restrição ao longo da dupla fita de DNA. Os fragmentos são então separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para uma membrana de náilon ou de nitrocelulose (carregada positivamente); esta técnica é a chamada *Southern blot*, que recebeu esse nome por causa do seu criador Edwin Southern em 1975. Posteriormente, o DNA das amostras imobilizadas na membrana é desnaturado, hibridizado com uma sonda radioativa (ou marcada de forma a permitir uma revelação da sonda por um método cromogênico) que seja complementar ao fragmento de interesse. A última etapa do processo, conhecida como auto-radiografia, consiste na exposição da membrana hibridizada com a sonda radioativa a um filme sensível aos raios X, revelando a presença de bandas escuras, que constituem os marcadores RFLP. Alternativamente, se a sonda for “fria”, isto é, sem radiação, a revelação será feita com uma substância cromogênica. Em função da sonda só hibridizar com fragmentos complementares, a técnica possui elevada precisão. As membranas de hibridização podem ser utilizadas várias vezes, diminuindo o custo da técnica. A figura 10 ilustra o procedimento.

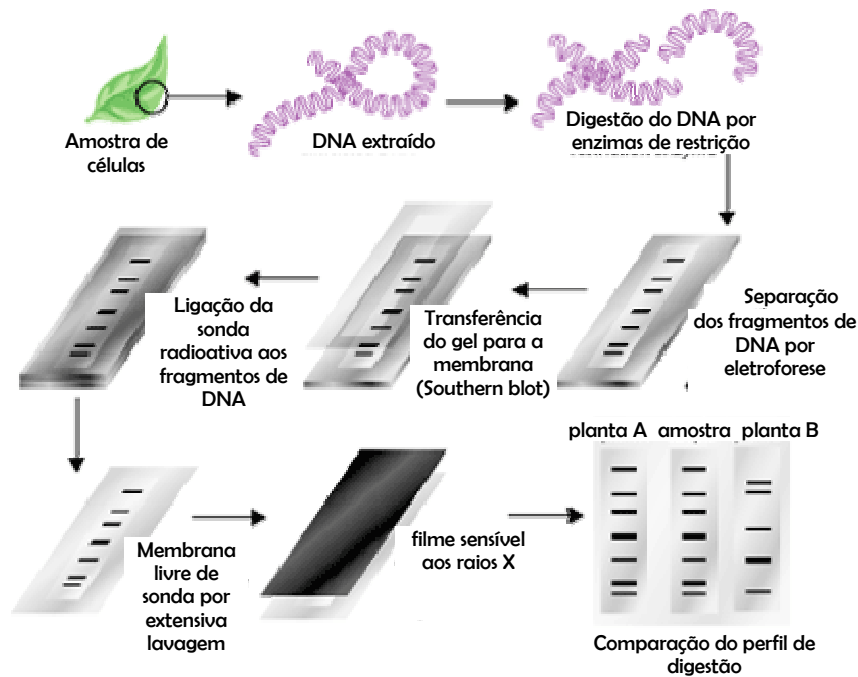


FIGURA 10. As várias etapas necessárias à visualização dos polimorfismos de DNA pela técnica de RFLP (Fonte: [www.scq.ubc.ca/...](http://www.scq.ubc.ca/)).

Com esse marcador, pode-se distinguir os indivíduos heterozigotos dos homozigotos e os resultados não são afetados pelas variações ambientais, epistasia ou pleiotropia. Pode extrair DNA de qualquer parte do organismo e em qualquer estágio de desenvolvimento, e pode-se utilizar sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre espécies. (BORÈM e CAIXETA, 2009). Como desvantagem possui o fato de ser muito trabalhoso, precisa de pessoal treinado, é uma técnica cara, pois se devem ter investimentos em pessoal, equipamentos e produtos químicos e ter cuidado quando forem utilizadas sondas radioativas (BORÈM e CAIXETA, 2009).

Boa parte das limitações da técnica foram superadas pela introdução do PCR-RFLP, que identifica os polimorfismos simplesmente em gel de agarose. A figura 11 ilustra a técnica de PCR-RFLP. A amplificação dos dois alelos produz fragmentos de mesmo comprimento. Entretanto, a digestão destes fragmentos com a enzima gera um polimorfismo de comprimentos, com o alelo mutante permanecendo não cortado, enquanto o alelo selvagem é clivado em dois pedaços de tamanho distinto.

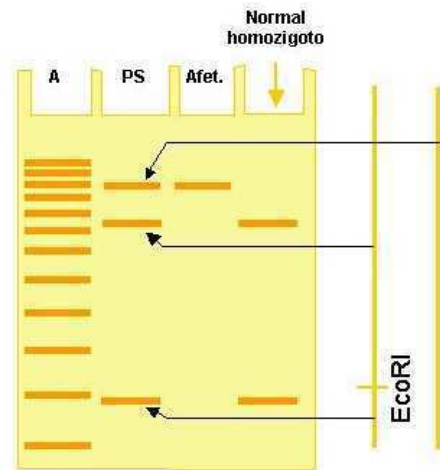


FIGURA 11. Resultado da investigação da presença de mutação no sítio EcoRI por PCR (PCR/RFLP). A figura representa o caso de um indivíduo heterozigoto para a marca estudada (coluna b), um indivíduo afetado e um normal homozigoto. A mutação elimina um sítio EcoRI existente no alelo selvagem (wt).

2.2.3 DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*)

Este é um tipo de marcador baseado em PCR, utilizando apenas um primer mais curto, de dez nucleotídeos, e de seqüência arbitrária, para realizar a amplificação, não necessitando assim, conhecer antes os fragmentos a serem amplificados. Foi desenvolvido em 1990 pelos pesquisadores Williams et. al., a qual deram o nome de RAPD.

Para que um fragmento de DNA seja amplificado por essa técnica, duas regiões do genoma complementares ao primer devem estar separadas por até 4.000 pb e em orientações opostas. A detecção dos produtos de amplificação é feita, normalmente, em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (BORÉM e CAIXETA, 2009). Pelo fato de o primer utilizado no RAPD ser mais curto, a sua interação com o seu sítio de pareamento não é muito forte. Por isso os iniciadores normalmente apresentam 50% de G + C, pois esses dois tipos de bases estabelecem três pontes de hidrogênio na dupla fita de DNA, enquanto adenina e timina estabelecem apenas duas pontes. Além disso, para permitir o pareamento de um primer tão pequeno, a temperatura de pareamento é reduzida para menos de 45 °C (VIANA et al., 2009).

Podem ocorrer polimorfismos, gerados por esse tipo de marcador molecular, devido a mutações de ponto no sítio de pareamento do primer e deleções ou inserções entre dois sítios de pareamento de iniciadores. Esta é uma técnica simples, rápida, de custo reduzido, fácil utilização, podendo ser utilizada para qualquer tipo de organismo. Por ser um marcador baseado em PCR, quantidade mínima de DNA é exigida na análise genômica.

Uma das principais limitações é o baixo conteúdo de informação genética em cada loco, pois apenas um alelo é detectado pelo fragmento amplificado, sendo as demais variações alélicas classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Em razão da técnica de RAPD ser bastante sensível a pequenas modificações na concentração dos componentes da reação, é recomendável a otimização cuidadosa das condições experimentais, para que os resultados sejam mais confiáveis e reprodutíveis, isto é, utilizando-se DNA de alta pureza e reagentes de

boa procedência e padronizando-se rigorosamente as condições de trabalho (BORÉM e CAIXETA, 2009; VIANA et al., 2009).

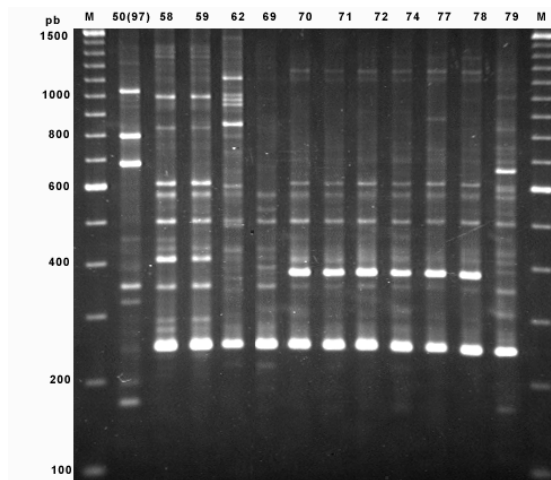


FIGURA 12. Visualização do resultado de um RAPD. Múltiplas bandas são geradas com um único primer. As diferenças de bandas redundam de mutações no sítio de pareamento do primer ou de inserções e deleções entre dois sítios de pareamento quaisquer.

Fonte: www.mycor.nancy.inra.fr/molecular/aubure/index.html

2.2.4 Sequenciamento de DNA

Esta tecnologia foi desenvolvida para obter informação da seqüência dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA clonada. Até 1975 a determinação da seqüência de mesmo poucos nucleotídeos era impossível, enquanto a tecnologia para o seqüenciamento de aminoácidos nas proteínas já era bem conhecida. A. M. Maxam e W. Gilbert, EUA, propuseram uma tecnologia que usa agentes químicos que reagem especificamente com as bases do DNA (G,C,A,T), quebrando a cadeia fosfodiéster preferencialmente em determinados nucleotídeos. As moléculas quebradas são analisadas em gel de poliacrilamida de alta resolução, de modo a separa moléculas que diferem apenas em um nucleotídeo. Como relatado por Watson et al.(2009), após a década de 60, Frederick Sanger desenvolveu uma técnica mais rápida e simples para o seqüenciamento de moléculas maiores de RNA, utilizando inicialmente uma RNA polimerase para sintetizar uma cadeia de RNA complementar e, então, seqüenciando este RNA.

Como resultado do avanço desta técnica, surgiram dois métodos que permitiam o seqüenciamento direto de DNA com 100 a 500 nucleotídeos de comprimento. O primeiro foi o método mais-menos (plus-minus), desenvolvido por Sanger em 1975; com a utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida, uma grande parte da seqüência de 5.386 pb do pequeno fago ϕ X174 foi prontamente determinada. Em 1977, Allan Maxam e Walter Gilbert desenvolveram um método que serviu como avanço do método plus-minus, baseado na degradação química das cadeias de DNA; nela os fragmentos de DNA eram marcados nas extremidades e então divididos em quatro amostras separadas. Cada amostra passava por um tratamento diferente, produzindo fragmentos de DNA terminando em G,C uma combinação de A e G, e uma combinação de C e T. Os fragmentos de DNA produzidos após o final das reações eram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e detectados por autoradiografia. Este segundo método tornou-se a técnica padrão.

A segunda metodologia proposta, mais difundida pela simplicidade no manuseio e leitura da seqüência, foi desenvolvida pelo grupo F. Sanger, em Cambridge, Inglaterra, em que emprega a DNA polimerase, gerando fragmentos a partir de um iniciador (primer) complementar ao DNA molde que se deseja seqüenciar. A cadeia de DNA é sintetizada a partir dos quatro nucleotídeos precursores do DNA, além de precursores de nucleotídeos terminadores da cadeia, jpa que neste caso o açúcar desoxirribose é substituído pela 2'3'-didesoxirribose. Este açúcar não oferece a extremidade 3'-OH essencial para a extensão da cadeia. Estes nucleotídeos terminadores trifosfatados são chamados ddNTP. Como somente pequena quantidade de determinado análogo (ddTTP, ddATP, ddCTP ou ddGTP) é utilizada na reação de seqüenciamento, podem-se obter fragmentos de DNA com tamanhos diferentes, que refletem a incorporação em todos os sítios correspondentes àquele didesoxirribonucleotídeo específico (MIR et al., 2004).

As duas metodologias foram aperfeiçoadas para aumentar a resolução e tamanho da seqüência gerada. O método que sofreu maiores alterações foi o da terminação de síntese do DNA, sendo acoplado a outras tecnologias como o PCR. Atualmente, o uso de tipos diferentes de DNA polimerase (que atuam a temperaturas elevadas), nucleotídeos análogos terminadores da reação ligados a marcadores fluorescentes e equipamentos sofisticados de eletroforese, o processo de seqüenciamento do DNA passou a ser automático. A leitura da seqüência é feita diretamente no computador, e longos trechos podem ser seqüenciados em um única reação. (MIR et al., 2004).

A figura 13 (a e b) mostra esquematicamente o seqüenciamento pela técnica de dideoxi ou interrupção de cadeia. Através de uma termociclagem semelhante ao PCR são obtidos centenas de milhares de fragmentos de DNA fita simples iniciando sempre num determinado primer e terminando no análogo de base com a substituição de desoxirribose pela didesoxirribose. Este análogo têm uma fluorescência que pode, em vários sistemas de seqüenciamento automático, ser diferente para cada um dos 4 nucleotídeos. Uma vez completada a reação os fragmentos de cada reação são separados por eletroforese de poliacrilamida. A distância entre as bandas é muito pequena porque a diferença de massa entre elas é de apenas um nucleotídeo. As bandas geradas pela reação de termociclagem na presença dos terminadores dideoxi podem ser visualizadas de duas formas distintas. Quando o seqüenciamento é manual, cada tubo de reação contém somente um tipo de terminador: ddTTP, ddCTP, ddGTP ou ddATP. Nunca haverá fragmentos do mesmo comprimento, portanto, em tubos distintos, daí também as bandas serem diferentes em cada coluna da eletroforese. A soma de todas as bandas, contudo, dá em teoria uma escada de fragmentos diferindo entre eles em apenas um nucleotídeo. Portanto, na leitura manual o gel (em geral, na verdade, de um autoradiograma obtido do gel pela exposição deste a um filme sensível ao raio X, quando são empregados terminadores radioativos), basta deslizar uma régua horizontalmente ao topo do gel e as bandas que surgirem sobre a borda da régua indicarão as bases, sucessivamente, na seqüência do DNA. No seqüenciamento automático, os quatro terminadores, com diferentes fluorocromos cada um, são adicionados juntos na reação e arrastados pelo campo elétrico como na eletroforese; a sua passagem por um tubo capilar com um polímero (que faz o papel do gel) é detectada por uma câmara digital, que capta a fluorescência emitida quando a banda é iluminada por um laser (Farah, 2007).

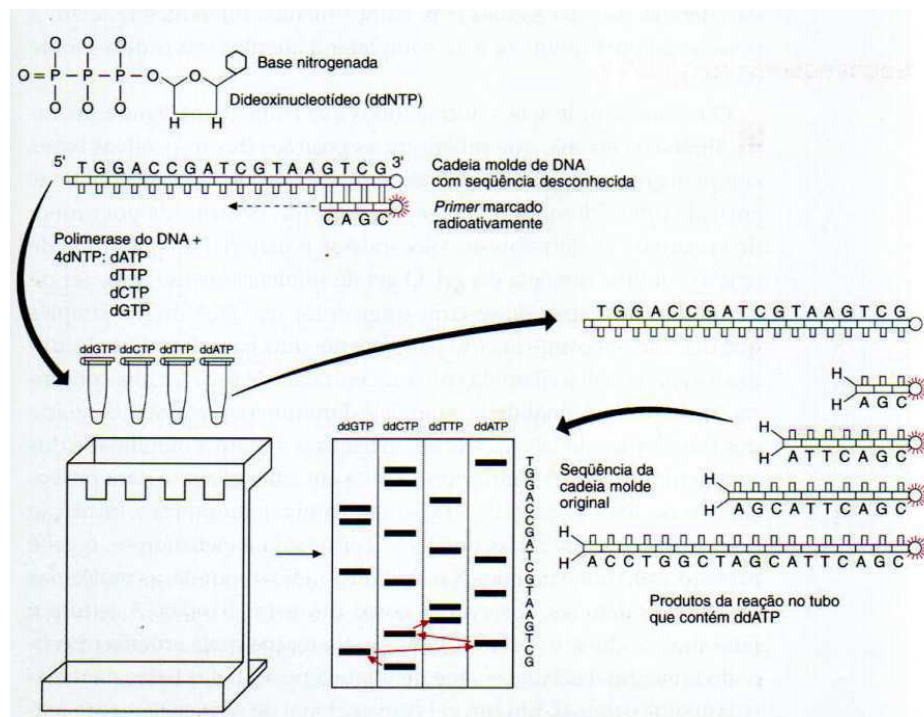


FIGURA 13a. Geração de fragmentos de DNA fita simples por termociclagem e interrupção da extensão das fitas pela incorporação de um didesoxinucleotídeo. Ver detalhamento no texto.(Fonte: Farah, 2007).

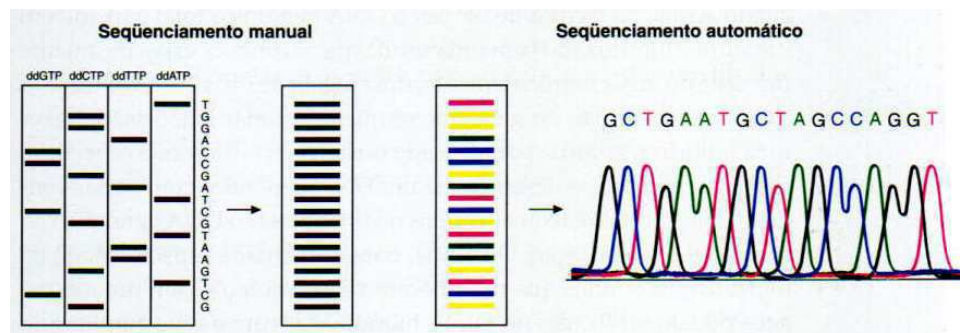


FIGURA 13b. As bandas geradas pela reação de termociclagem na presença dos terminadores dideoxi podem ser visualizadas de duas formas distintas: pela leitura direta das bandas num autoradiograma, obtidas de 4 reações separadas, com cada um dos didesoxinucleotídeos, ou pela análise automática da fluorescência das bandas geradas pela adição simultânea dos 4 ddNTPs, marcados com fluorocromos distintos. Ver detalhamento no texto (Fonte: Farah, 2007).

Nos últimos anos vários novos sistemas de seqüenciamento da DNA foram desenvolvidos, sendo os mais conhecidos o Illumina, o ABI SOLiD e o Roche FLX 454. Todos eles permitem a produção de um imenso número de seqüências em poucas horas, tipicamente mais de um milhão. Entretanto, estas seqüências costumam ser pequenas, com menos de 150 bases cada.

A tecnologia de seqüenciamento Illumina está baseada num seqüenciamento simultâneo de milhões de fragmentos de DNA. O processo de seqüenciamento depende inicialmente da ligação de fragmentos de DNA gerados aleatoriamente a uma superfície plana, transparente. Cada fragmento de DNA é amplificado, restando as mais de 1000 cópias de cada molde juntas, formando um cluster. Milhões de diferentes clusters são formados em cada arranjo óptico. A sequência de bases é identificada pela fluorescência de terminadores que, ao contrário da técnica convencional de dideoxi descrita anteriormente, podem ter sua fluorescência retirada. O processo permite a leitura base a base da sequência, sem dificuldades adicionais em regiões repetidas e com outras características de difícil solução no seqüenciamento convencional. Um total de mais de 33 Gb de bases são geradas a cada rodada do equipamento.

As demais técnicas (ABI SOLiD e Roche FLX 454), mantendo suas particularidades, permitem um número equivalente de seqüências. As três plataformas de seqüenciamento têm acelerado enormemente a descrição de novos genomas e o maior desafio agora é como lidar com este imenso número de dados.

2.2.5. Clonagem

O objetivo da clonagem não é somente isolar um gene específico, mas também produzir grandes quantidades de um gene para análise e manipulações posteriores (WATSON et al.; 2009). A clonagem de DNA envolve a separação de um gene específico ou segmento de DNA do seu cromossomo, a sua ligação a uma molécula de DNA transportadora pequena, chamada vetor, e depois a replicação deste DNA modificado, milhares ou mesmo milhões de vezes, por meio de um aumento no número de células contendo o vetor (NELSON e COX, 2002).

Como principais vetores utilizados na clonagem tem-se o plasmídeo, o bacteriófago (ou fago), o cosmídeo, o fagemídeo, os BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), que são cromossomos artificiais de bactérias e os YACs (*Yeast Artificial Chromossomes*), que são cromossomos artificiais de leveduras. Os BACs podem receber insertos grandes de 100 a 500 kb e os YACs recebem insertos de 250 a 1.000 kb. A tabela 3 mostra os vários vetores, quanto podem transportar de DNA e suas características principais.

TABELA 3 - Sinopse dos vetores mais empregados par clonagem de fragmentos de DNA

Designação	Tamanho do inserto	Descrição
Plasmídeo	1b-10 kb	DNA circular fita dupla
Fago (bacteriófago)	até 20 kb	DNA linear fita dupla
Cosmídeo	até 40 kb	DNA linear fita dupla, que se circulariza para convert a forma de fago em plasmídeo
BAC - cromossomo artificial De bactéria	até 250 kb	DNA circular fita dupla (com sinais de cromossomo bacteriano)
YAC - cromossomo artificial De levedura	até 2 Mb	DNA linear fita dupla (com sinais de cromossomo de levedura, como telômeros, centro organizador de nucléolo, etc.)

Os vetores mais utilizados em experimentos com *E. coli* são os plasmídeos, bacteriófagos e cromossomos artificiais de bactéria. Há várias abordagens para a ligação entre o DNA a ser clonado e o vetor. O emprego de enzimas (ou endonucleases) de restrição para gerar extremidades coesivas ou retas é uma das abordagens para a união do vetor com o DNA do organismo de interesse. Num primeiro passo o DNA a ser clonado é parcialmente digerido, utilizando uma determinada endonucleases de restrição, de tal modo que serão gerados fragmentos de tamanhos variados da sequência de interesse. É importante nesta etapa que a digestão seja parcial, permitindo que nem todos os sítios de reconhecimento da enzima na sequência sejam clivados. O vetor de clonagem é igualmente clivado com a mesma endonuclease de restrição, mas neste caso será uma digestão completa, que gerará um único corte no vetor, e em seguida ligado aos fragmentos de DNA genômico (NELSON e COX; 2002).

O pequeno tamanho dos plasmídeos (o que facilita sua manipulação) e a presença de genes resistentes a antibióticos (o que fornece um meio para selecionar uma bactéria que contenha plasmídeo) fazem destes vetores ideais para clonagem (WATSON et al., 2009). Além de sua capacidade natural de penetrar nas bactérias, os plasmídeos duplicam-se independentemente do DNA das bactérias. Isso permite a formação de múltiplas cópias do plasmídeo, com o fragmento inserido, dentro de cada bactéria. A duplicação do plasmídeo é garantida por uma região da molécula que contém as seqüências necessárias para a execução desse processo, conhecida como origem de replicação, embora todas as enzimas utilizadas na multiplicação da molécula sejam fornecidas pela célula hospedeira (EÇA et al., 2004).

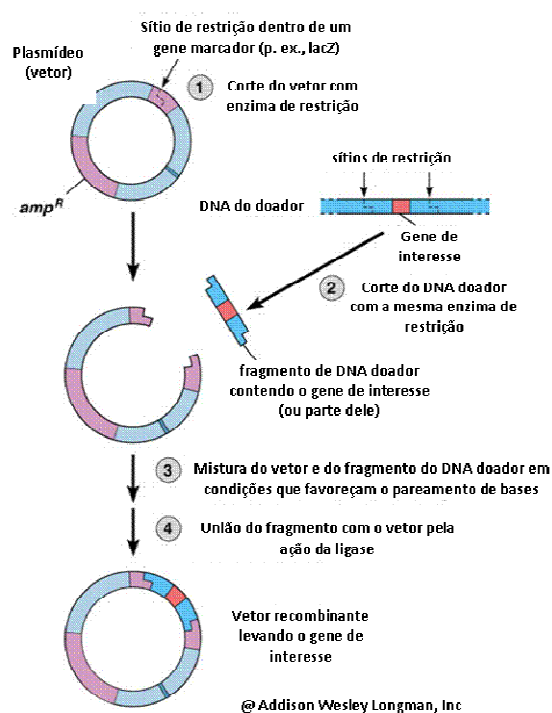


FIGURA 14. Representação esquemática da clonagem de um segmento de DNA contendo um gene de interesse de um organismo doador num vetor plasmidial, pelo emprego de enzimas de restrição. (Fonte: adaptado de http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/CB18_28B.html)

2.3 Aplicações da Biologia Molecular na Medicina Veterinária

2.3.1 Epidemiologia:

A epidemiologia é fundamental no controle das doenças infecciosas e na descoberta de fatores associados a várias enfermidades crônicas e agudas. O grande desenvolvimento metodológico da epidemiologia, após a Segunda Guerra Mundial, possibilitou a identificação de fatores envolvidos na etiologia de muitas doenças (BARATA., 1997). Com o advento das ferramentas moleculares de diagnóstico e identificação de patógenos, assim como sua aplicação na determinação de pedigree, a epidemiologia desenvolve-se ainda mais. A seguir serão brevemente apresentados e comentados resultados nesta área empregando algumas das técnicas descritas na parte anterior desta monografia.

a) Prevalência de infecção

Bezerra et al. (2007) desenvolveram um estudo para identificação de *Anaplasma marginale* e caracterização epidemiológica da doença, com amostras de coágulo sanguíneo doadas pela agência de Defesa Sanitária Agropastoril (IDARON), provenientes de bovinos com idade entre 4 a 12 meses criados na região de Ji-Paraná, estado de Rondônia. O DNA extraído do coágulo foi submetido a PCR para amplificação do gene de diagnóstico msp5 da bactéria. Os primers utilizados amplificam um fragmento de 458 pb. Os autores tiveram como resultado do PCR das 328 amostras de coágulo sanguíneo bovino, 323 (98,47%) positivas pela amplificação do gene msp5 de *A. marginale* e 5 negativas, correspondendo a 1,53% do total de amostras analisadas. De acordo com os resultados obtidos concluíram que as regiões estudadas apresentam características que permitem classificá-las como áreas de endemia estável para *A. marginale*. O gene msp5 (major surface protein 5) é de cópia única no genoma da bactéria, ao contrário de outros genes para proteínas de superfície (VISSER et al., 1992). Idealmente, um PCR diagnóstico deve estar baseado em genes de múltiplas cópias ou pertencentes a uma família gênica, para aumentar o número de alvos na amostra. A técnica de PCR descrita, mesmo baseada num gene de cópia única, mostra-se adequada para a detecção do *A. marginale* em bovinos, podendo ser indicada para a utilização em investigações epidemiológicas da anaplasmoze em outras regiões brasileiras devido a sua alta sensibilidade e especificidade.

b) Presença de fatores de virulência (toxinas e adesinas)

Costa et al. (2006) empregaram PCR para identificar a presença de genes de toxinas e adesinas em amostras de *E. coli* isoladas da suíno no Sul do Brasil. Dos 40 isolados clínicos, 82,5% (33/40) foram positivos pela PCR para pelo menos um dos genes pesquisados que codificam fatores de virulência. Os genes para toxinas mais prevalentes foram de Stb, presentes em 50% (20/40) dos isolados, seguidos de Sta e Lt com 35%. Os genes de adesinas com maior prevalência foram F18, com 27,5%, seguido por F4 e F5 com 22,5%. O presente estudo revelou dois isolados positivos somente para Stb e F41. Nenhum isolado foi positivo para o gene de F6. O gene que codifica para Stx foi identificado em 7,5% (3/40) das amostras. Os resultados desta pesquisa demonstraram que a maior parte dos isolados clínicos possuem genes que codificam para os fatores de virulência pesquisados, tendo a adesina F18 e a toxina Stb como os fatores de maior prevalência, evidenciando que os isolados de *Escherichia coli* na região sul do Brasil possuem grande potencial patogênico.

c) Distribuição e transmissão de patógenos em animais selvagens

A tuberculose bovina é endêmica entre búfalos africanos e em muitos outros animais selvagens das reservas da África do Sul. O manejo dos animais depende da compreensão da dinâmica desta enfermidade e da identificação das fontes primárias de infecção. O estudo de Michel e cols. (2009) avaliou, empregando a técnica de RFLP, a hipótese de que a infecção foi introduzida numa das reservas importantes do país pelo contato direto de búfalos com o gado bovino, o que foi confirmado no estudo pelo padrão de restrição de dois genes indicadores. A conclusão do trabalho não está baseada exclusivamente na figura abaixo, mas ela traz os elementos principais da análise. Observa-se a semelhança de perfis entre a amostra de gado (CATTLE) e as amostras de búfalo e kudu nas proximidades da fazenda onde o gado estava infectado. Pelo seu complexo padrão de bandas, a RFLP é muito discriminativa para populações, mesmo próximas, como demonstra esta publicação.

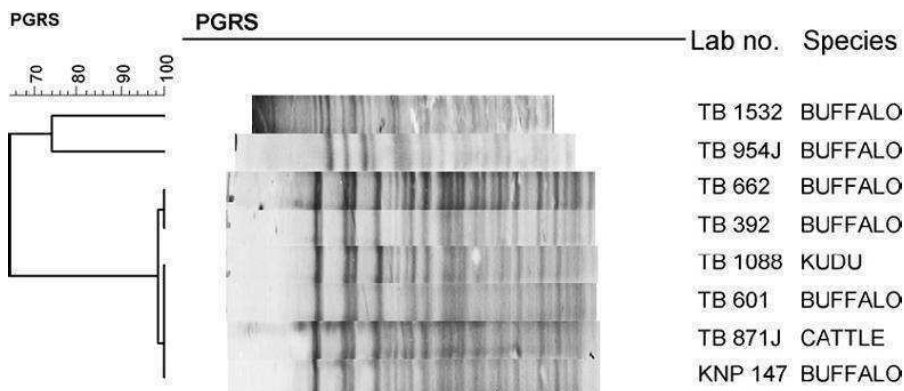


FIGURA 14. Dendrograma original do artigo de Michel et al. (2009) mostrando a relação entre oito perfis de RFLP para a digestão de um gene marcador (PGRS), representativos das amostras de reservas na África do Sul: Reserva Natural de Spioenkop (TB 1532), Parque Hluhluwe iMfolozi (TB 954J), Parque Nacional Kruger (TB 662, TB 392, TB 1088, TB 601, KNP 147) e um gado epidemiologicamente relacionado (TB871J).

2.3.2 Clínica Médica/ Diagnóstico

a) Detecção e tipagem de vírus a RNA

A Estomatite Vesicular (EV) é uma enfermidade viral de grande impacto na saúde animal. O animal enfermo apresenta queda na produtividade em rebanho de carne e na produção leiteira, sendo um fator limitante para o comércio internacional de animais. Além dos danos à produtividade essa enfermidade assume importante papel nos programas de saúde animal por ser indistinguível clinicamente da Febre Aftosa. O diagnóstico da estomatite vesicular viral (VEV) pode ser realizado por ELISA, fixação de complemento ou teste de inativação viral, que além de diagnosticarem a infecção, são capazes de distinguir entre os dois tipos de vírus, o New Jersey e o Indiana. Sepúlveda et al. (2007) empregaram alternativamente a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa) baseada na amplificação parcial específica do gene NS do VEV foi utilizada como um método alternativo para a detecção do vírus. Um total de 10 amostras de referência do VEV e 12 espécimes coletados de animais

com sinais clínicos de enfermidade vesicular obtidas de episódios de campo em Equador foi testado. O método permitiu a amplificação parcial da região que codifica para proteína P, tanto para NJ (642 pb) quanto para Ind (614 pb).

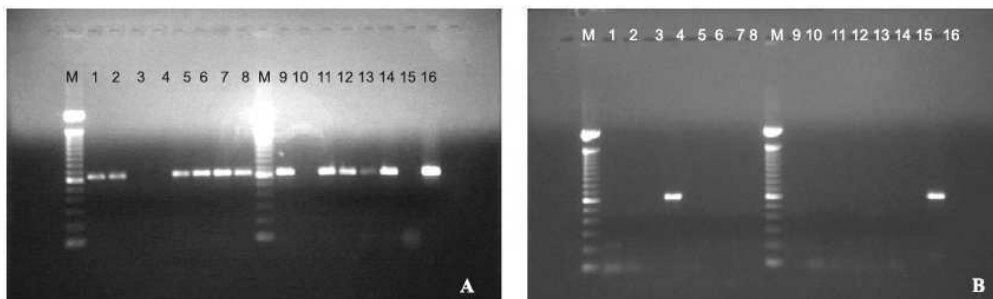


FIGURA 15. Resultado de RT-PCR obtido a partir de RNA isolado de amostras colhidas de bovinos no Equador e de amostras de referência. Foram empregados pares de primers específicos para VEV NJ (A) ou VEV Ind (B). Colunas 1 a 14: isolados do Equador; coluna 15: controle negativo; lane 16: amostra de referência NJ CR /66 (A) e Ind CR /72 (B); coluna M: Marcador de peso molecular (100 pb) (SEPÚLVEDA et al., 2007).

Os resultados foram concordantes com os dados obtidos por Fixação de Complemento e a identidade dos produtos amplificados foi confirmada por meio de seqüenciamento nucleotídico. Este trabalho demonstra que a PCR pode ser aplicada para o diagnóstico de uma ampla gama de enfermidades infecciosas, inclusive aquelas em que o agente é um vírus a RNA.

2.3.3 Vacinas

A vacinação é a medida mais eficiente e em geral menos dispendiosa para evitar doenças infecciosas. Apesar dos grandes benefícios das vacinas existentes, há ainda muitas doenças para as quais não existem vacinas. Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. Na última década, o grande avanço da biologia molecular permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e a produção de antígenos e foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. As vacinas de segunda geração (subunidades), são constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais ou sintéticas, e antígenos recombinantes. As de terceira geração ou gênicas, surgiram com a introdução de genes ou fragmentos de genes no organismo que se deseja imunizar (KANO et al., 2007). A vacina de DNA foi descrita em 1990, quando o plasmídeo contendo um gene repórter que codifica β -galactosidase expressou a proteína após a inoculação direta no músculo de camundongos (WOLFF et al., 1990). A administração de uma única dose de plasmídeo pode proporcionar um amplo espectro de resposta imune, incluindo a ativação dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+, os quais secretam citocinas e tem função reguladora na produção de anticorpos (KOWALCZYK e ERTL, 1999).

a) Vacina de DNA contra hepatite viral canina

A hepatite infecciosa canina é uma doença viral aguda altamente contagiosa causada pelo adenovírus tipo 1 (CAV-1). A vacinação não tem tido bons resultados e uma proteção efetiva não foi ainda alcançada. A vacinação de DNA poderia ser mais efetiva, pois costuma induzir uma resposta celular marcante, que está associada à proteção na hepatite viral.

He e colaboradores (2005) desenvolveram uma vacina de DNA baseada na proteína pequena do envelope do vírus da hepatite B (HBV). O gene foi amplificado por PCR diretamente de DNA obtido do soro de um paciente e foi clonado no sítio de restrição para EcoRI/BamHI do plasmídeo pVAX1. O vetor foi empregado para transformar *E. coli* e a partir de uma cultura desta hospedeira foi então isolado por lise alcalina e purificado por gradiente de equilíbrio. Endotoxinas foram removidas por extração com Triton X114. Camundongos imunizados com a vacina mostraram resposta imune compatível com proteção induzida por mecanismos de reconhecimento celular do antígeno clonado.

Posteriormente, Liu e cols. (2008) avaliaram a segurança da vacina, ainda em camundongos e demonstraram que os animais ficam protegidos de um desafio com o vírus. O grupo de pesquisas relata que a vacina protege cães, mas os resultados ainda devem ser comprovados por outros pesquisadores.

b) Vacina de peptídeos contra leishmaniose visceral canina

O cão representa o principal hospedeiro da *Leishmania chagasi* nas Américas e na Europa. Na ausência de um tratamento efetivo a vacinação ganha ainda mais importância como recurso preventivo. No Brasil uma vacina, desenvolvida na UFRJ, já está sendo comercializada pela empresa Fort Dodge. Esta vacina é baseada num extrato de *Leishmania chagasi*, que precisa ser cultivada em condições muito controladas. Outra vacina recentemente ganhou o mercado, é baseada na proteína H2, sendo um produto purificado e considerado substância pura, embora proveniente de *Escherichia coli* recombinante. Esta segunda vacina é comercializada pela empresa Hertape.

2.3.4 Imunologia

Técnicas de biologia molecular com a PCR, a RT-PCR e PCR em Tempo Real tem proporcionado grandes avanços no envolvimento de citocinas nas respostas inflamatórias e nos mecanismos de imunidade celular e humoral contra patógenos e em doenças auto-imunes em animais domésticos. Várias empresas fornecem kits para dosagem de citocinas (interleucinas, interferons e fatores de crescimento) em camundongos, ratos e humanos que eram os modelos inicialmente mais estudados em imunologia. Estes kits se baseiam na dosagem de citocinas que são capturadas por anticorpos e não em técnicas moleculares.

Na China, foi possível avaliar o nível de expressão de citocinas, conseqüentemente o tipo de resposta celular, de cavalos vacinados com vírus da anemia infecciosa equina atenuado. As citocinas avaliadas foram o interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e IL-12, que participam dos processos de imunidade celular, importantes na resposta contra vírus. A detecção do nível de citocina foi realizada pela técnica de RT-PCR, que consiste, inicialmente, na extração de RNA e transcrição reversa deste em DNA complementar

(cDNA) que foi a fonte de DNA para a reação da PCR citocina específica. Uma das conclusões do experimento é que níveis altos de IL-2 pode ser um indicador importante na proteção pela vacina (ZHANG et al, 2007).

No mesmo ano, nos EUA, Allen et al validaram o teste de PCR em Tempo Real (*Real Time PCR*) para interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) expressas por macrófagos de equino. A RT-PCR é uma técnica sensível, específica e de caráter quantitativo; desta forma, a combinação das duas técnicas pode contribuir significativamente para o conhecimento da participação de macrófagos e de linfócitos Th1 na resposta imune de equinos contra patógenos.

2.3.5 Produção de alimentos

A *Yersinia enterocolitica* é uma doença que acomete humanos, que se caracteriza por sintomas gastroentéricos, associando à enterocolite ou linfadenite mesentérica. No Brasil, *Y. enterocolita* foi isolada do ser humano, de cães e suínos, enfermos e sadios, da água e de alimentos, como carnes e derivados, leite e vegetais. Marcadores de patogenicidade já foram identificados no genoma dessa bactéria. Atualmente, como recurso adicional à análise microbiológica convencional, testes de PCR têm sido padronizados para a detecção de *Y. enterocolita*, baseado em genes de patogenicidade localizados no cromossomo bacteriano, o *yst* ou o *ail*. Teodoro et al., (2006) avaliaram esfregaços de carcaças e tonsilas de suínos coletadas de três abatedouros sem inspeção e analisaram as amostras por diagnóstico microbiológico convencional e por meio da PCR. Os resultados foram negativos nos testes microbiológicos tradicionais entretanto, pela PCR, 40% das carcaças e 43% das tonsilas foram positivas. A PCR também permitiu determinar a presença de cepas patogênicas nas tonsilas positivas para *Y. enterocolitica*. O método microbiológico convencional mostrou-se menos sensível que a PCR, além de necessitar de um período de até 20 dias para a confirmação da espécie, e, para a identificação da cepa, são necessárias provas adicionais de biotipagem e sorotipagem, demandando mais tempo, e aumentando os custos em relação a PCR.

2.3.6 Genética de Populações / Pedigree

Gimenez e Lucca (2005) utilizaram o marcador RAPD para diferenciar os javalis de suínos domésticos (Landrace e Large White) e seus híbridos. Analisando javalis provenientes do Canadá e da França e suínos domésticos, 107 bandas foram geradas, sendo 75 polimórficas (70,10%) e 32 monomórficas (29,90%). A análise dos dados permitiu a reunião dos 27 animais em três grupos distintos (G1, G2 e G3), com grande homologia entre os grupos G1 (formado pelos 11 suínos domésticos) e G2 (formado por 4 javalis da França e dois do Canadá). Os suínos do grupo G1, da raça Large White não foram separados daqueles resultantes dos cruzamentos Large White X Landrace. O grupo G3 incluiu 5 javalis do Canadá e 3 da França e se mostrou distinto dos anteriores. O fato dos 27 animais serem provenientes de 3 regiões completamente diferentes, exclui a possibilidade de intercruzamento entre eles, concluindo-se que a variação observada é exclusivamente devida à variabilidade genética da espécie, revelada pelos marcadores utilizados.

A técnica de RAPD foi utilizada para verificar a distância e a variabilidade genética entre e dentro das raças nativas brasileiras (Caracu, Crioulo Lageano, Curraleiro, Mocho Nacional e Pantaneiro) e duas comerciais (Holandês e Nelore). A variabilidade genética total foi

verificada em virtude das diferenças de indivíduos dentro das populações. A menor divergência genética foi observada entre Crioulo Lageano e Curraleiro. A raça Mocho Nacional, apesar de historicamente ser considerada de origem *Bos taurus aquitanicus*, mesma origem da raça Caracu, agrupou-se com as demais raças nativas consideradas de origem *Bos taurus ibericus*. De modo geral, as raças estudadas se agruparam em clusters distintos, com exceção da Mocho Nacional. A técnica de RAPD foi capaz de distinguir geneticamente as raças estudadas; Caracu, Crioulo Lageano, Curraleiro e Pantaneiro podem ser consideradas entidades genéticas distintas, comprovando, a unicidade de suas populações. A Mocho Nacional não conseguiu se restabelecer, após seu declínio na década de 50, perdendo, sua identidade genética (SERRANO et al. 2004).

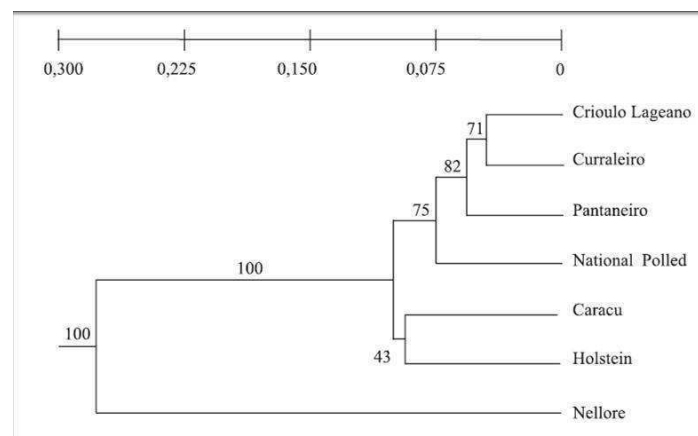


FIGURA 16. Dendrograma demonstrando a distância genética entre raças de bovinos nativas brasileiras e comerciais. Fonte Serrano et al (2004).

A equideocultura representa hoje um setor da economia que envolve milhões de reais por ano, havendo no mercado animais de alto valor e geneticamente superiores. Na equideocultura, é comum o aparecimento de problemas cromossômicos no plantel principalmente devido ao uso intenso de acasalamentos consanguíneos. Um dos problemas mais comuns encontrados nos cavalos são infertilidade nas éguas, reversão sexual ou pseudohermafroditismo. Somando-se a citogenética clássica novas técnicas como hibridização in situ, uso de marcadores fluorescentes e alguns procedimentos usados na biologia molecular, como por exemplo a reação em cadeia da polimerase (PCR), tornou-se possível o conhecimento de polimorfismos, identificando-se assim, indivíduos portadores ou afetados por mutações genéticas indesejáveis. Alguns testes já estão disponíveis no mercado baseados na utilização da PCR, para identificação tanto de genes indesejáveis quanto desejáveis (COELHO & OLIVEIRA, 2008).

Existem ainda, outros testes baseados em PCR que determinam os genes desejáveis, assim como, cor da pelagem entre outros. Devido a seu alto valor comercial, os equinos, principalmente aqueles destinados à prática de esportes, têm a necessidade de serem mais precisamente identificados quanto a sua descendência tanto para fins de registro quanto para sua aquisição. A confirmação de genologia tem papel extremamente importante, não apenas para garantir a ascendência dos animais, mas também porque um *pedigree* confiável pode permitir ao criador identificar a origem de problemas genéticos em seu rebanho e reduzi-los, ou mesmo eliminá-los (COELHO & OLIVEIRA,

3. CONCLUSÃO

Técnicas de biologia molecular podem ser aplicadas nas diferentes áreas da Medicina Veterinária, entretanto pela diversidade das espécies domésticas e silvestres, pela gama de patógenos que acometem animais e pela complexidade intrínseca de cada procedimento, muito ensaios precisam ser padronizados para que seja atingido um índice satisfatório de contribuição na qualidade de vida animal, humana e na conservação do meio ambiente.

4. REFERÊNCIAS

- ARDUINO, G.G.C., GIRIO, R.J.S. FREIRE, M.M. FILHO, M.M., Anticorpos contra *leptospira* spp em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação; **Ciência Rural**; v 34; n 3; p 865-871, 2004.
- ALLEN, C.A., PAYNE, S.L., HARVILLE, M., COHEN, N.; RUSSELL, K. Validation of Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays for Measuring Cytokine Expression in Equine Macrophages. **Journal Immunol Methods**, v. 328, n. 1-2, p. 59–69. 2007.
- AVERY, O.T.; MACLEOD, C.M., MCCARTY, M.; Studies on the chemical nature
- BAMBARA, R.A.; MURANTE, R.S.; HENRICKSEN, L.A.; Enzymes and Reactions at the Eukaryotic DNA Replication; **Fork; THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**; v. 272,n. 8; p. 4647–4650; 1997.
- BEZERRA, J.E.G.; BRITO, L.G.; MOURA, M.M.F.; MARIM, A.D.; SOUZA, G.C.R.; Epidemiologia Molecular De *Anaplasma MARGINALE* Em Bovinos Criados Na Microrregião De J Iparaná, Rondônia. Disponível em: <http://www.pibic.unir.br/pdf/VIDA%20E%20SAUDE/Jose%20Eduardo%20Gisbert%20Bezerra%20RES.pdf>
- BORÉM, A., CAIXETA, E.T., **Marcadores Moleculares**, 2 ed., ed. UFV, 2009.
- BROD, C.S.; ALEIXO, J.A.G.; JOUGLARD, S.D.D.; FERNANDES, C.H.; TEIXEIRA, J.L.R. ; DELLAGOSTIN., O.A.; Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** , v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.
- BURGERS, P. M. J. Polymerase Dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4041-4045, 2009
- BURGERS, P.M.J.; Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. **Chromosoma**, n. 107, p. 218-227; 1998.
- CAETANO, C. F.; FINGER, P. F.; SIEDLER, B. S.; MUNHOZ, L. S.; VILELA, C.O.; FERREIRA, L. N.; FISCHER, G.; VARGAS, G. A.; VIDOR, T.; HUBNER, S.O. **RT-PCR Para Identificação do Vírus da Cinomose Canina.**
- COELHO, E.G.A., OLIVEIRA, D.A.A.; Testes genéticos na equideocultura. **Revista Brasileira Zootecnia**. v.37, *suplemento especial*, p.202-205, 2008.
- COOPER, G. M. ; **The Cell - a molecular approach**. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>
- CORRÊA, FABRÍCIO GONÇALVES; Identification for PCR of Bacterium *Bartonella vinsonii* Subsp. *Berkhoffii* in 50 dogs with Infection for *Ehrlichia canis* (*E. canis*). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** , ano VII, n. 13, p. 1679-7353, Periódicos Semestral , 2009.

CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S.; CARNEIRO, P.C.S.; **Genética**; v 2- GBOL; ed. UFV; Capítulo 11; 2001.

DE ROBERTIS, E., HIB, J., PONZIO, R., **De Robertis Biologia Celular e Molecular**, 14 ed, ed. Guanabara Koogan, 2008.

DEAN, FB; BULLOCK, P; MURAKAMI, Y.; WOBBE, CR; WEISSBACH, L; HURWITZ, J; Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. **84**, n. 1, p. 16-20; 1987.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M.; Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 115-119, 2005.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G; Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira Zootecnia**; v.37; *suplemento especial*; p.08-14; 2008.

GARCIA, JOÃO LUIS; **UTILIZAÇÃO DE VACINAS PARA O CONTROLE DA TOXOPLASMOSE**; Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, Londrina-PR.

GATTÁS, G.J.F.; SEGRE, M.; FILHO, V.W.; Genética, Biologia molecular e ética: as relações trabalho e saúde; **Ciência e saúde coletiva**; v. 7, n. 1, p. 159-167; 2002.

GIMENEZ, D. L. ; LUCCA, E. J.; O uso de Marcadores Moleculares de RAPD como Potencial Informativo para a Distingção entre Javali *Sus scrofa scrofa*, o Suíno Doméstico *Sus scrofa domesticus* e seus Híbridos; **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**; Periodicidade Semestral; 4 ed . p. 1679-7353, 2005.

GRIEBELER, JOSIANE; **Titulação de vacinas contra o sorotipo 3 da doença de Marek por PCR em tempo real**; Dissertação; Porto Alegre; 2005.

GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. **Journal of Hygiene** , n. 27, p. 113-159; 1928.

GRODZICKER, T.; ANDERSON, C.; SHARP, P.A.; SAMBROOK, J.; Conditional Lethal Mutants of Adenovirus 2-Simian Virus 40 Hybrids I. Host Range Mutants of Ad2+ND1; **Journal Of Virology**, v. 13, n. 6.; p. 1237-1244; 1974.

HE X-W, SUN S-H, HU Z-L, LI J, JIANG L, ZHOU F-J, et al. Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting. **Vaccine** , n.23, p. 1649-56, 2005.

KANO, F.S. ; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, MC.,; Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária; **Semina: Ciências Agrárias**; v. 28; n. 4; p. 709-726; 2007.

KORNBERG, H.L. Genetics in the Study of Carbohydrate Transport by Bacteria. Sixth Griffith Memorial Lecture. **Journal of General Microbiology**, n.96, p. 1-16; 1976.

KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune response to DNA vaccine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.55, p.751-701, 1999.

- LARA, V.M., TANIWAKI S.A., ARAÚJO JR., J.P.; Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**; v. 27, n. 11, p. 467-470, 2007.
- LINN, S.; ARBER, W.; **Host Specificity Of DNA Produced By Escherichia coli, X. In Vitro Restriction Of Phage Fd Replicative Form**; 1968.
- LIU, F. Y.; GUO, R. M.; ZHENG, L.; LU, Y. M.; YOU, H. Y.; SHUXI, S.; WANG, J. X.; SUN, S. H. Safety evaluation of a canine hepatitis DNA vaccine. **Vaccine**, ed. 26, p. 6025-6028, 2008.
- LODISH, H., BERCK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDARIA, P., BALTIMORE, D., DORNELL, J., **Biologia Celular e Molecular**, 4 ed., ed. Revinter, 2002.
- MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; CAMPOS, A.L.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; v.57, n.3, p.380-389, 2005.
- MENDEL, GREGOR. 1866. Versuche uber Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn, Bd. IV fur das Jahr 1865*, Abhandlungen, 3–47. Disponível em <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>. Acesso em 2 de nov. de 2009.
- MESELSON, M., STAHL, F.W., The replication of DNA in *Escherichia coli*. **Proc.N.S**, v. 44, p. 671-682, 1958.
- MIR, L., MOREIRA-FILHO, C.A., MENCK, C.F.M., SILVA, C.L., ABDELHAY, E., RECH, E., NETO, E.D., SALZANO, F.M., OLIVA, G., VANNUCHI, H., RAW, I., KLIL, J., OLIVEIRA, J.E.D., ZANETTINI, M.H., VIEIRA, M.L.C., ZATZ, M., NARDI, N., VELHO, N., ARRUDA, P., BISCH, P.M., BOROJEVIC, R., OLIVEIRA, S.C., PENA, S., **Genômica**, ed Atheneu, CIB, São Paulo, 2004.
- NEGRÃO, F.J.; WOSIACKI, S.H.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.6, p.1099-1106, 2006.
- NELSON, D.L.; COX, M.M.; **Lehninger-Princípios de Bioquímica**; ed. Sarvier; 2002.
- ORPHANIDES, G., REINBERG, D. A unified theory of gene expression. **Cell** 108: 439–451; 2002.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L., **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**; Embrapa; 1a ed; Brasília-DF; 2001.
- REMOLD, S.K., RAMBAUT, A., TURNER, P.E.; Evolutionary Genomics of Host Adaptation in Vesicular Stomatitis Virus. **Mol. Biol. Evol.** n. 25, v. 6, p. 1138–1147. 2008
- SANDLER, I.; Pierre Louis Moreau de Maupertuis—A precursor of Mendel? **Jornal of the History of Biology**, n. 16 v. 1, p. 101-136, 1988.

SILVEIRA, C.; VAZ, L; SILVA, S.C.; Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína; **Ciência Rural**; v.34, n.2, p.635-643, 2004.

STRACHAN,T., READ, A.P., **Genética Molecular Humana**, 2 ed.; ed. Artmed; Capítulos 1, 4, 6; 2002.

TEODORO, V.A.M., PINTO, P.S.A., VANETTI, M.C.D., BEVILACQUA, P.D., MORAES, M.P; PINTO, M.S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.1, p.9-14, 2006.

TEODORO, V.A.M.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; MORAES, M.P.; PINTO, M.S.; Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção; **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**; v.58 ; n.1; p.9-14; 2006.

TOSO, E.A.V., MORABITO, R., **Otimização No Dimensionamento E Sequenciamento De Lotes De Produção: Estudo De Caso Numa Fábrica De Rações**. Gestão e Produção. 2005.

VAZ, C. S.L.; SILVA, S.C.; Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína; **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.635-643;2004.

VIANA, J.M.S., CRUZ, C.D., BARROA, E.G., **Genética**, vol. 1- fundamentos, 2a ed, ed UFV, capitulos 9, 16, 2003.

WAGA, S. ; STILLMAN, B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. **Annu. Rev. Biochem**, v. 67, p. 721–5, 1998

Walker2001, Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize; **Proc Natl Acad Sci. U S A.** ;n. 98, v.15, p. 8342–8349; 2001.

WATSON, J.D., CRICK, F.H.C.; Genetical implications of the structure of desoxyribonucleic acid. **Nature** ; n. 171, p.964-967.; 1953.

WATSON, J.D.; MYERS, R.M.; CAUDY, A.A.; WITKOWSKI, J.A.; **DNA Recombinante Genes e Genoma**; 3 ed.; Artmed ed; 2009.

WELSH,J.; MCCLELL,M.; Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers; **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, 1990.

WILLIAMS, JOHN G.K.; KUBELIK, ANNE R.; LIVAK, KENNETH J.; RAFALSKI, J.ANTONI; TINGEY, SCOTT V.; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers; **Nucleic Acids Research**, Vol. 18, No. 22; p. 6531-6535; 1990.

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGHER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, New York, v.247, p.1465-1468, 1990.

WYMAN, A.R.; WHITE,R.; A highly polymorphic locus in human DNA; **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**; v. 77, n. 11, p. 6754-6758, 1980.

ZHANG, X.; WANG, Y.; LIANG, H.; WEI, L.; XIANG, W.; SHEN, R.; SHAO, Y., Correlation between the induction of Th1 cytokines by an attenuated equine infectious anemia virus vaccine and protection against disease progression. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 998–1004, 2007.