

## Biotecnologia e biossegurança: o que mudou e precisa mudar para o país celeiro de alimentos do mundo

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo<sup>1</sup>, Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>1</sup>, José Ricardo de Figueiredo<sup>1</sup>, José Antônio Visintin<sup>1</sup>, Carlos Alberto Müller<sup>1</sup>

### RESUMO

Os avanços da biotecnologia conclamam um avanço símile em biossegurança. Neste artigo estão abordadas considerações importantes a respeito de biossegurança, levando-se em consideração a necessidade de assegurar que o processo inovativo de biotecnologia acontece com riscos mínimos para a saúde de seres vivos e do meio ambiente. Em seguida, são apresentados alguns modelos biotecnológicos na produção de vacinas, de kits de diagnóstico e de reprodução animal. A biotecnologia tem o papel de melhoramento de kits diagnósticos, tornando-os cada vez mais acessíveis e de fácil utilização. A imunoprofilaxia, outra alameda na empreitada de erradicação de doenças infecciosas, é uma arma possante para tal fim, e o Brasil labora com aptidão na produção local de vacinas, bem como no desenvolvimento de novos imunoprofiláticos. A biotecnologia brasileira tem avançado também no domínio de reprodução animal, exemplificado pelo desenvolvimento de um ovário artificial, cujo objetivo é permitir condições ótimas *in vitro* para assegurar a viabilidade e fecundabilidade de oócitos que outramente seriam inviáveis *in vivo*. Avanços em clonagem animal hoje possibilitam um número ilimitado de cópias de células graças à técnica de Transferência Nuclear (TN), permitindo a produção de animais geneticamente idênticos, bem como o desenvolvimento de modelos úteis de biotecnologia para fins de tratamento com a utilização de células-tronco.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, biossegurança, organismo geneticamente modificado.

### ABSTRACT

#### Biotechnology and biosafety: what has changed and has to change in the country considered as the world's barn

Advances in biotechnology impel parallel advances in biosafety. In this article, we address the most important points concerning the biosafety of biotechniques, taking into account that it is a key factor for assuring the minimisation of the risks to living beings and the environment which are inherent to innovation in biotechnology. We then discuss certain biotechnological models including the production of vaccines, diagnostic kits and animal reproduction. A correct diagnosis and immunoprophylaxis are capital for the eradication or epidemiological control of an infectious disease, and for such, biotechnology plays an important role for the improvement of the techniques and products used for these ends. Brazil has a well developed capacity for the local production of vaccines as well as the development of novel immunoprophylactics. Brazilian biotechnology has also advanced in the domain of animal reproduction, as exemplified by the development of an artificial ovary which provides optimal *in vitro* conditions for assuring the viability and fecundity of oocytes which would otherwise be unviable *in vivo*. Advances in animal cloning nowadays have now made possible the obtaining of an unlimited number of cell copies thanks to the Nuclear Transfer technique, which allows the production of genetically identical animals, as well as the development of useful models for the treatment of diseases using stem-cells.

**Key words:** Biotechnology, Biosafety, genetically modified organism

Recebido para publicação em março de 2009 e aprovado em abril de 2009

<sup>1</sup> Comissão de Biossegurança e Biotecnologia do Conselho Federal de Medicina Veterinária - Brasília - DF. E-mail: vasco@ibc.ufmg.br

## INTRODUÇÃO

O uso do conhecimento biológico para a melhoria da produção de bens e serviços tem avançado significativamente na última década. A biotecnologia moderna emprega técnicas inovadoras em vários setores industriais, incluindo agricultura, pecuária, medicina humana, medicina veterinária e produção de biocombustíveis. No Brasil, o seu impacto na agroindústria tem sido compreensivo. As biotécnicas utilizadas no País são várias e têm sido desenvolvidas por instituições brasileiras, notadamente pela EMBRAPA e por inúmeras universidades públicas, abrangendo clonagem, engenharia genética de animais e manipulação de determinantes genéticos para o melhoramento nutricional de leguminosas, bem como a promoção de resistência de plantas a patógenos e herbicidas.

O desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGM), tal como plantas transgênicas, que são utilizadas como alimentos, levantou questões quanto à segurança da utilização desses organismos para seres humanos, animais e meio ambiente. Em resposta a essas inquietudes, a regulamentação de processos biotecnológicos vem sendo desenvolvida por meio da criação de legislação específica, bem como pela criação de órgãos reguladores. No Brasil, a Política Nacional de Biossegurança, no que concerne OGMs, é assessorada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), através do estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes ao uso de OGM e seus derivados. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de plantas transgênicas, com uma área cultivada de 15,8 x 10<sup>6</sup> hectares, principalmente de milho, soja e algodão geneticamente modificados em 2008 (Isaaa, 2008).

O investimento em biotecnologia agropecuária no Brasil para o ano de 2007 foi da ordem de US\$ 68 milhões, o que corresponde a 51,7% do total investido em toda a América Latina (Falck-Zepeda *et al.*, 2009). Os recursos humanos atuantes em pesquisa agropecuária no Brasil são altamente competentes e qualificados, e 64% do corpo técnico possui doutorado, a maior proporção na América Latina (Stads & Beintema, 2009). Apesar dessas forças, persistem deficiências no estado da biotecnologia e biossegurança brasileiras, que devem ser atendidas. A inovação biotecnológica alcançada em decorrência de pesquisa no País necessita de vias mais eficientes para a sua disseminação, bem como de receptores dessa tecnologia que transformem as descobertas em produto utilizável no mercado, caso contrário, as inovações genéticas estarão fadadas ao fracasso. Ademais, o arcabouço legal no que tange à biotecnologia e biossegurança é extremamente complexo no Brasil, o que leva à tardança no lançamento comercial de produtos biotecnológicos.

## BIOSSEGURANÇA

Pode ser definida como sendo um conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes a essas atividades e que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (Fiocruz, 2005).

Muito embora o termo biossegurança seja utilizado fundamentalmente para designar um amplo programa de medidas destinado a proteger pessoas, animais, plantas e meio ambiente da exposição acidental a microrganismos e/ou seus produtos, sempre que o projeto necessita ser desenvolvido em ambiente externo, o profissional, que se expõe a uma série de riscos diferentes aos comumente observados em um ambiente laboratorial, deve estar preparado para trabalhar em condições naturais, muitas vezes impossíveis de serem controladas, em distantes áreas onde o atendimento médico imediato pode ser inviável, ou onde os profissionais podem estar expostos a riscos.

O conceito de risco está associado à probabilidade de que um dano, um ferimento ou uma doença ocorra. Nas atividades que envolvem materiais infecciosos ou potencialmente infecciosos, a avaliação do risco é um parâmetro essencial para a definição de todos os procedimentos de biossegurança, sejam eles de natureza construtiva, de procedimentos operacionais ou informacionais (Cardoso e Silva, 2007).

O manejo de animais oferece aos humanos, basicamente, dois tipos de risco: o infeccioso e o traumático. Os animais podem excretar microrganismos nas fezes, na urina, saliva ou aerolizá-los, originando, conseqüentemente, infecções, alergias e outros problemas. Existe ainda a possibilidade de inoculação de patógenos por mordeduras ou arranhaduras, assim como a transmissão direta, por contato com o animal, seu sangue ou tecidos coletados em necropsia, e indireta, por inalação de poeira originada do ambiente onde se encontram os animais. Além disso, muitos animais podem apresentar infecções assintomáticas, aumentando os riscos de contaminações (Politi *et al.*, 2008).

Atualmente, o controle das doenças infecciosas continua a representar o maior obstáculo para a saúde de animais. Prevenir as doenças é mais fácil, mais econômico e mais eficaz do que tentar tratar qualquer tipo de surto que venha a ocorrer. Portanto, a adoção de um programa preventivo de controle de doenças e infecções é essencial para a manutenção da saúde dos animais, validação dos dados de uma pesquisa e segurança das pessoas que cuidam deles (Miyazaki e Bôas, 2007).

Nos últimos anos, a emergência e a reemergência de doenças infecciosas apresentaram novos desafios para a saúde pública.

A reemergência, como a ameaça do bioterrorismo com a atividade de indivíduos ou pequenos grupos, tem levado à maior conscientização na prática da biossegurança e da biosseguridade. A necessidade de trabalhos que envolvam animais que podem representar alto risco em consequência de patógenos, como doenças transmitidas por artrópodes, tem estimulado interesse renovado nas questões de biossegurança animal, em regime de contenção. A aplicação desses princípios aos animais mantidos ao ar livre tem tido como consequência a criação de programas de erradicação de doenças (Richmond *et al.*, 2003).

### **Classificação de risco**

Em 2006, o Ministério da Saúde publicou o manual “Classificação de Riscos dos Agentes Biológicos”, onde a classificação do nível de biossegurança é norteada por diversos fatores. Dentre eles destacam a patogenicidade do microrganismo infectante, virulência, via de inoculação, estabilidade, endemicidade, concentração e volume, origem do agente biológico potencialmente patogênico, dose infectante, o tipo de ensaio, as consequências epidemiológicas, e a disponibilidade de tratamento eficaz e de medidas profiláticas.

Os agentes biológicos que afetam o homem, os animais e as plantas são assim distribuídos em classes de risco:

- Classe de risco 1 (baixo risco individual e para a coletividade): inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças em pessoas ou animais adultos saudáveis. Exemplo: *Lactobacillus sp.*

- Classe de risco 2 (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplo: *Schistosoma mansoni*.

- Classe de risco 3 (alto risco individual e moderado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam enfermidades humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplo: *Bacillus anthracis*.

- Classe de risco 4 (alto risco individual e para a comunidade): inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Até o momento não há nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz contra

infecções ocasionadas por eles. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Esta classe inclui principalmente os vírus. Exemplo: Vírus Ebola.

- Classe de risco especial (alto risco de causar doença animal grave e de disseminação no meio ambiente): inclui agentes biológicos de doença animal não existente no País e que, embora não sejam obrigatoriamente patógenos de importância para o homem, podem causar graves perdas econômicas e/ou na produção de alimentos.

Portanto, as barreiras serão determinadas por esta classificação.

Entende-se como barreira o sistema que combina aspectos construtivos, equipamentos e métodos operacionais que buscam o controle das condições ambientais das áreas fechadas e a minimização das probabilidades de contaminação (Simas, 1996).

O desenho das instalações que compõem o alojamento dos animais constitui um dos fatores de maior importância assegurando a eficácia de seu funcionamento e, conseqüentemente, o cuidado e a vigilância adequadas à manutenção dos animais. A classificação desses alojamentos é feita de acordo com a classe de risco do(s) microrganismo(s) ali manipulado(s) em quatro níveis de Biossegurança (NB-A) e consistem na combinação de práticas e técnicas de laboratório, equipamentos de segurança e instalações ou infraestrutura laboratorial, e representam as condições nas quais o agente pode ser manipulado com segurança (Cardoso e Silva, 2007).

### **Níveis de biossegurança animal**

A biossegurança é demonstrada mediante a determinação dos níveis de contenção física, de seus requisitos e da utilização de procedimentos de boas práticas, os quais têm por objetivo o desenvolvimento de um trabalho seguro, que pode apresentar diferentes níveis de biossegurança.

Consideram-se quatro níveis de biossegurança: NBA-1, NBA-2, NBA-3 e NBA-4 (Brasil, 2001), crescentes no maior grau de contenção e complexidade de proteção. O nível de biossegurança será determinado segundo o organismo de maior classe de risco envolvido (Müller, 2008).

### **Qualidade em biossegurança**

A gestão da qualidade de biossegurança consiste numa estratégia de administração orientada a criar consciência da qualidade em todos os processos organizacionais, tentando atender a alguns requisitos de certificação, dentre esses pode-se citar: a padronização de todos os processos de organização; implementação e manutenção os registros adequados e necessários para garantir a rastreabilidade do processo; inspeção de qualidade e meios apro-

priados de ações corretivas, quando necessário; e revisão sistemática dos processos e do sistema da qualidade para garantir sua eficácia.

A importância da qualidade se reflete na confiabilidade nos resultados, facilita a rastreabilidade dos dados obtidos em ensaios e a documentação de um estudo; facilita a organização de trabalho e a comunicação dos dados obtidos e evita duplicidade de estudos, levando à economia de tempo e de recursos. (Rosenberg, 2007).

Atualmente, o controle das doenças infecciosas continua a representar o maior obstáculo para a saúde de animais. Prevenir as doenças é mais fácil, mais econômico e mais eficaz do que tentar tratar qualquer tipo de surto que venha a ocorrer. Portanto, a adoção de um programa preventivo de controle de doenças e infecções é essencial para a manutenção da saúde dos animais, validação dos dados de uma pesquisa e segurança das pessoas que cuidam dos animais (Miyazaki e Bôas, 2007).

#### ***Aspectos de biossegurança na manipulação de animais transgênicos***

Particularmente no Brasil, as atividades e os projetos em contenção envolvendo animais geneticamente modificados deverão atender à Legislação de Biossegurança (Lei 11.105/2005). Ela estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.

A instituição de ensino, pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico e de produção industrial que utiliza técnicas e métodos de engenharia genética ou realiza pesquisas com organismo geneticamente modificado (OGM) e seus derivados deverá criar uma Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), cujos mecanismos de funcionamento são estabelecidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Por fim, salienta-se que todo acidente deve ser, obrigatoriamente, comunicado à chefia superior ou à CIBio no caso de OGM. Cabe à instituição o treinamento para execução das atividades e a prática dos procedimentos e das normas de biossegurança, visando à prevenção de acidentes.

Nesse contexto, fica explícito que é imperativa a utilização de organismos e/ou animais geneticamente modificados em pesquisas que visam a prevenção e a terapia de doenças, tanto humanas quanto animais, tendo também papel importante nos desenvolvimentos econômico e soci-

al, como no emprego das biotecnologias das reproduções animal e humana. Paralelamente, é de fundamental importância manter a população informada quanto à aplicação correta desses recursos biotecnológicos realizados dentro dos princípios éticos e de segurança, preservando a saúde e o bem-estar dos seres vivos e do meio ambiente.

Desse modo, laboratórios e empresas que trabalham com agentes infecciosos e OGM em pesquisa pública ou privada, humana ou veterinária, têm sido forçados a avaliar e assegurar a eficiência de seus programas de biossegurança e a proficiência de seus trabalhadores. Adicionalmente, é importante que os trabalhadores que manipulam microrganismos patogênicos entendam as condições sob as quais cada agente infeccioso pode ser seguramente manipulado.

## **BIOTECNOLOGIA**

### **Parte 1 – Biotecnologia e biossegurança na produção de vacinas e kits diagnóstico**

A biotecnologia é uma das ferramentas tecnológicas mais importantes da atualidade. Suas aplicações têm contribuído para a estruturação de novos sistemas econômicos e sociais, especialmente nas áreas de saúde pública e animal (Azevedo, 2008). Outras ferramentas consideradas fundamentais são vacinas seguras e eficazes, aliadas ao diagnóstico confiável.

A vacinação é considerada o melhor método para se evitar a entrada e disseminação de doenças em populações. Seus benefícios são inúmeros, e o impacto gerado sobre o controle das enfermidades infecciosas é o maior benefício.

Os programas de imunização utilizam, ainda hoje, vacinas importadas. Porém, o Programa de Imunização Nacional ressaltou a necessidade de desenvolver uma estratégia de substituição progressiva das importações e de expandir os laboratórios brasileiros, oficiais e comerciais para a produção das mesmas (Gadelha, 1996).

A competição por esse mercado exige que as empresas nacionais façam também investimentos significativos em pesquisa. Na última década, o mundo vem assistindo essa revolução tecnológica e organizacional. O segmento que vem sofrendo forte impacto da moderna biotecnologia é a produção e o desenvolvimento de vacinas. As novas trajetórias tecnológicas baseadas no DNA recombinante e nos métodos modernos de bioprocessamento começam a permitir a obtenção de novas vacinas e a melhoria das já existentes (Gadelha, 1996; Azevedo, 2008).

No entanto, o processo de obtenção do produto final, que passa pela etapa da transferência tecnológica realizada em centros de pesquisas e universidades para empresas comerciais, precisa ocorrer mais facilmente, com políticas que proporcionem essa parceria (Azevedo, 2008).

No entanto, as normas estão cada vez mais exigentes e detalhadas.

A preocupação com as normas de pesquisa de novos fármacos, medicamentos e vacinas vem aumentando. Ao longo dos anos, novas normas, manuais, procedimento operacional padrão (POP) e instituições foram desenvolvidos para regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvem risco à saúde pública. Entre esses serviços regulamentados estão os de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos e de normas que regulamentam as atividades de importação, comercialização, transporte, armazenamento, manipulação, consumo, liberação e descarte de produtos derivados de organismos geneticamente modificados (OGM).

A biotecnologia no Brasil pode ter futuro promissor, mas precisa-se nos consolidar e conquistar mercados, procurando alianças tecnológicas entre os segmentos empresa, universidades e União, para ser o País autossuficiente em imunobiológicos.

Nesse contexto de medidas profiláticas, um teste diagnóstico com capacidade de identificar a presença do agente infectante ou um marcador de uma doença geralmente é crucial para o tratamento adequado da enfermidade (Urdea *et al.*, 2006).

Em uma perspectiva mais ampla, os testes diagnósticos são de extrema importância não somente para a detecção e o acompanhamento de processos infecciosos sintomáticos e assintomáticos causados por microrganismos (Peeling *et al.*, 2006), mas também para quadros relacionados à alergenicidade, doenças genéticas, cancerígenas, dentre outros.

O desenvolvimento da biotecnologia e o surgimento de novas técnicas moleculares relacionadas à genômica e proteômica têm contribuído para fortalecer a elaboração de métodos diagnósticos mais acurados, de detecção rápida e custo final reduzido (Cavalcanti *et al.*, 2008).

No entanto, uma série de variáveis pode influenciar no desempenho dos testes diagnósticos. Algumas relacionadas à interação parasita-hospedeiro, como (i) as características genéticas da população e do agente infeccioso e (ii) prevalência da enfermidade em determinada região; e outras ligadas à elaboração dos testes propriamente ditos, como: (i) tipo de antígeno ou anticorpo, (ii) procedimento manual ou automático e (iii) local de padronização do teste (Bano *et al.*, 2006). Cabe aos pesquisadores realizar avaliações constantes para obter qualidade na padronização dos testes e aplicabilidade nas populações.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária, e Abastecimento possuem a incumbência de aprovar o registro de um novo teste diagnóstico no mercado, como também fiscalizar a sua utilização.

O planejamento na elaboração de um teste diagnóstico com objetividade clara e execução cuidadosa é indispensável para evitar o desperdício de tempo, recursos humanos e financeiros.

## Parte 2 - Reprodução

### *Produção in vitro de embriões e perspectivas do ovário artificial*

#### *Contexto do ovário artificial*

O ovário mamífero contém milhares de oócitos que são armazenados individualmente em estruturas denominadas folículos ovarianos. Do ponto de vista evolutivo, os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grupos, a saber: folículos pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários. *In vivo*, apesar da existência de milhares de oócitos, cerca de 99,9% serão eliminadas por meio de um processo fisiológico conhecido por atresia folicular. Tendo em vista a grande perda folicular que ocorre naturalmente nos ovários, a biotécnica de MOIFOPA/ovário artificial visa criar artificialmente *in vitro* as condições necessárias para que pequenos oócitos inclusos em folículos pré-antrais, recuperados dos ovários, possam sobreviver, crescer, maturar e posteriormente serem fecundados *in vitro*, minimizando o impacto da perda folicular originada pelo processo de atresia que ocorre largamente nos ovários (Figueiredo *et al.*, 2008). A importância da biotécnica de MOIFOPA deve-se ao fato de que 90% dos oócitos presentes nos ovários estão armazenados nos folículos pré-antrais, ou seja, em folículos destituídos de antro. Além disso, a morte folicular por atresia ocorre predominantemente na fase antral.

#### *Aplicações do ovário artificial*

O ovário artificial tem importantes aplicações nas seguintes áreas, a saber:

1) Pesquisa fundamental ou básica- Possibilita o estudo *in vitro* do efeito de diferentes substâncias sobre os folículos pré-antrais, visando elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial, atualmente pouco compreendida. Além disso, esse modelo de estudo é importante, pois apresenta-se como alternativa ao uso de animais em experimentos.

2) Biologia molecular- Assegura as condições necessárias para identificar e quantificar, nos diferentes compartimentos foliculares, a expressão dos genes que são responsáveis pelo controle do crescimento de folículos pré-antrais e antrais.

3) Indústria farmacêutica- Permite a realização de testes *in vitro* da ação de fármacos (benéfica ou tóxica) sobre os folículos preliminarmente ao seu emprego em experimentos envolvendo animais e seres humanos.

4) Nanotecnologia- Oferece importante modelo para testar a inocuidade de nanopartículas utilizadas no carregamento de drogas de interesse médico.

5) Biossegurança- Ferramenta importante para se avaliar o efeito da radioatividade sobre a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento folicular.

6) Formação de bancos genéticos (germoplasma)- Permite uma avaliação precisa da eficiência de protocolos de criopreservação de oócitos, analisando a taxa de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de oócitos, inclusive folículos pré-antrais previamente criopreservados. Essa estratégia é de fundamental importância para a constituição de bancos de germoplasma tanto na espécie humana como em animais de interesse zootécnico ou em vias de extinção, visando posterior produção *in vitro* de embriões ou xenotransplante.

7) Reprodução humana assistida (tratamento de infertilidade) - Representa uma alternativa futura para o aprimoramento de meios de cultura visando à maturação oocitária e, conseqüentemente, à produção de embriões humanos *in vitro*. Atualmente esses embriões são produzidos utilizando-se procedimentos de superovulação e colheita dos oócitos por punção, gerando desconforto físico e emocional nas pacientes. Outra aplicação seria a preservação da fertilidade feminina nos casos de mulheres que se submeterão a tratamentos de radio ou quimioterapias (casos de câncer) e que necessitam ter seu ovário previamente removido e criopreservado para posterior autotransplante ou cultivo *in vitro*.

8) Multiplicação de animais- No futuro possibilitará a produção *in vitro* de embriões em larga escala a partir de oócitos inclusive em folículos pré-antrais, recuperados de ovários inteiros, ou de fragmentos ovarianos (biópsia), que seriam submetidos aos procedimentos de crescimento, maturação e fecundação *in vitro*.

9) Bem-estar animal- Por se tratar de um modelo exclusivamente *in vitro* para a produção de embriões, a MOIFOPA contribuirá para o bem-estar animal (redução do estresse), pois representará uma alternativa aos procedimentos de superovulação, colheita de embriões e punção de oócitos por ultrassonografia, bem como ao uso de animais em experimentos.

10) Desenvolvimento de vacinas- Modelo *in vitro* importante para a avaliação da eficiência de anticorpos na destruição/eliminação folicular como etapa preliminar à realização de testes em animais vivos. Esse procedimento minimiza o número de animais necessários nos experimentos. As referidas vacinas poderão ser utilizadas em procedimentos e imunosterilização, visando notadamente ao controle populacional de caninos e felinos, por exemplo.

#### **Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais**

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Em gatas (Jewgenow & Stolte, 1996), gambás (Butcher & Ullman, 1996) e macacas (Fortune *et al.*, 1998), já foi observado o crescimento de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Nas espécies bovina (Gutierrez *et al.*, 2000; McCaffery *et al.*, 2000), ovina (Cecconi *et al.*, 1999), caprina (Huamin & Yong, 2000) e humana (Roy & Treacy, 1993), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Em suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (Hirao *et al.*, 1994), com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Wu *et al.*, 2001). Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. Eppig & O'Brien (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Carroll *et al.* (1990) obtiveram também o nascimento de camundongos *in vitro* após congelamento e descongelamento, crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos primários. Entretanto, o rendimento referente à produção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais é extremamente baixo e variável devido à inadequação dos meios de cultivo disponíveis.

#### **Contribuição do LAMOFOPA nas pesquisas relativas ao ovário artificial caprino**

A equipe do LAMOFOPA-FAVET-UECE vem desenvolvendo pesquisas em todas as áreas da MOIFOPA, incluindo isolamento folicular, conservação (resfriamento e criopreservação) e cultivo de FOPA *in vitro*, com ênfase na espécie caprina. Os resultados dessas pesquisas resultaram na elaboração de diversos artigos científicos (ver grupo de pesquisa Manipulação de folículos ovarianos na plataforma Lattes do CNPq). Foram desenvolvidos protocolos eficientes para o isolamento (micromanipulação folicular) e transporte de ovários (resfriamento) bem como para a criopreservação de FOPA. Intensos esforços têm sido dispensados no estudo da expressão gênica em folículos em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo de grande importância para nortear testes de substância no cultivo de folículos pré-antrais caprinos. No tocante ao cultivo *in vitro*, estabeleceu-se com sucesso um protocolo de base para o cultivo de folículos *in situ* e na forma isolada. Essa equipe tem obtido grande êxito na ativação de folículos primordiais *in vitro*, bem como no desenvolvimento folicular para estádios mais avançados (primários e secundários) após cultivo *in situ* (meio de

cultivo *MFOPA 1*). Além disso, realizam, com sucesso, o cultivo de folículos secundários isolados (meio de cultivo *MFOPA 2*), obtendo-se taxas de formação de antro e sobrevivência folicular superiores a 70%. Importante avanço realizado pela equipe do LAMOFOPA foi o crescimento de oócitos inclusos em FOPA caprinos até alcançar o tamanho para a retomada da meiose (>110 µm), inclusive obtendo-se em alguns casos maturação nuclear completa (placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar).

O sistema de cultivo desenvolvido (meios de cultivo *MFOPA 1* e *MFOPA 2*) permitiu estabelecer o processo tecnológico do ovário artificial caprino, pois, após desenvolvimento *in vitro*, conseguiu-se obter e manter viáveis no cultivo todos os tipos de folículos ovarianos. O referido sistema de cultivo está disponível para a indústria farmacêutica, visando avaliar em caráter pré-clínico o efeito de drogas sobre oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (de folículos primordiais até folículos antrais), e constitui uma rotina no nosso laboratório. Além disso, os meios de cultivo desenvolvidos foram eficientes para demonstrar a eficiência de anticorpos antizona pelúcida suíno na eliminação de FOPA caninos, constituindo-se na primeira etapa para o desenvolvimento de procedimento imunoesterilizante em fêmeas dessa espécie.

## CLONAGEM E CÉLULAS TRONCO

A palavra clone deriva do grego *klón* e foi criada para denominar indivíduos que se originam de outros por reprodução assexuada, comum em vegetais. Em mamíferos, o processo de clonagem “natural” produz gêmeos idênticos. Isso se dá quando o embrião, nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, sofre uma divisão natural, originando dois ou mais indivíduos geneticamente iguais (gêmeos univitelinos). No entanto, a clonagem “natural” resulta em número limitado de cópias.

A produção de número ilimitado de cópias tornou-se possível com o desenvolvimento da técnica da Transferência Nuclear (TN), cujo princípio consiste na fusão de uma célula diplóide (embrionária, fetal ou adulta) com um oócito enucleado. A produção de animais geneticamente idênticos (clones) pela TN apresenta-se como poderosa ferramenta biotecnológica. O sucesso na utilização de células de cultura primária (fibroblastos, células da glândula mamária e do *cumulus ooforus*, células-tronco etc.) na produção de animais clonados com emprego da técnica de TN poderá possibilitar a produção de animais geneticamente modificados, objetivando a produção de proteínas de interesse humano, de órgãos para xenotransplantes etc. (Visintin *et al.* 2007).

Experimentos envolvendo TN ainda possibilitam estudar aspectos relacionados à ativação genômica, à repro-

gramação nuclear, à sincronização do ciclo celular, à interação núcleo-citoplasma e à herança citoplasmática materna (DNA mitocondrial), assim como produzir, em larga escala, indivíduos geneticamente idênticos (clones), permitindo a rápida difusão de material genético superior.

Embora haja grande interesse na utilização da Transferência Nuclear nas áreas de produção animal, biomedicina, biotecnologia e na pesquisa básica, a expansão e difusão dessa tecnologia estão limitadas pela baixa eficiência de todo o processo de clonagem. O melhor entendimento dos eventos envolvidos na reprogramação nuclear poderá trazer resultados mais previsíveis e com maior reprodutibilidade, tornando a técnica mais segura, tanto para a pesquisa quanto para a produção animal.

Mesmo em vista dessas importantes aplicações, o interesse maior da TN está em sua associação com a tecnologia de modificação genética de células animais, resultando em clones transgênicos. A produção desses animais, além de ser considerada um dos maiores avanços tecnológicos para a agropecuária, causará grande impacto em diversas áreas da medicina. Dentre os benefícios potenciais, citam-se produção de leite com proteínas recombinantes de interesse farmacêutico, biomateriais (colágeno, proteína da teia de aranha) e uso de animais como modelos de doenças humanas e no estudo de funções gênicas e como doadores de órgãos para transplante (xenotransplante).

Quando o núcleo de uma célula somática contendo as informações genéticas do doador é transferido para o interior de um óvulo receptor, do qual o núcleo foi removido previamente, o óvulo poderá dar origem a tecidos embrionários idênticos geneticamente ao doador (Wilmot *et al.*, 2009). Essa técnica é denominada clonagem terapêutica e não origina organismos vivos, pois o óvulo reprogramado não é inserido em um útero, mas sim mantido em cultura de células em laboratório. Por meio dessa técnica é possível se obter células-tronco embrionárias sem a necessidade de embriões humanos, que poderão ser usadas em pesquisas clínicas.

A perspectiva de aplicação da clonagem terapêutica para tecidos humanos é avaliada como importante alternativa para o tratamento de enfermidades graves e debilitantes. Porém, as técnicas envolvidas durante os procedimentos de extração nuclear, assim como o estabelecimento de culturas celulares, ainda são demasiadamente onerosas, limitando sua aplicação em pesquisas (Del Carlo *et al.*, 2008).

A clonagem para fins terapêuticos e de pesquisa possui um potencial considerável dentro da perspectiva científica. No Brasil, de acordo com a lei de biossegurança nº 11.105, de março de 2005, artigo 6º, inciso IV, é proibida a clonagem humana terapêutica e reprodutiva (Oliveira *et al.*, 2006).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento da biotecnologia vem promovendo a mobilização dos mais diversos setores da sociedade. Opiniões favoráveis e contrárias à utilização de produtos oriundos dessa área de pesquisa têm sido intensamente discutidas, principalmente quanto aos benefícios e potenciais riscos às saúdes humana, e animal e ao meio ambiente. A maneira pela qual essa tecnologia pode ser controlada é através do estabelecimento de normas que regulamentem sua utilização, o que, conseqüentemente, acarreta em sua posterior liberação ou restrição ao público.

Órgãos reguladores como a CTNBio, por meio de seus representantes, são os responsáveis, por estabelecerem os mecanismos que controlam o desenvolvimento de produtos e processos e protegem o uso dessa biotecnologia. Esse conjunto de normas, leis e pareceres, que constituem o campo da biossegurança, visa controlar os impactos advindos da introdução de produtos, desde o processo de pesquisa até o desenvolvimento do produto ou processo biotecnológico final. Juntamente com o crescimento da pesquisa biotecnológica torna-se imprescindível a adequação da legislação brasileira aos novos rumos tomados pelo avanço da ciência.

## AGRADECIMENTOS

Este artigo foi elaborado como parte das atividades da Comissão de Biotecnologia e Biossegurança (COBIO) do CFMV. Os autores expressam sua gratidão ao presidente desse Conselho e a todos os seus funcionários.

Os membros da Comissão de Biotecnologia e Biossegurança do Conselho Federal de Medicina Veterinária agradecem aos estudantes John Antony McCulloch, Anderson Miyoshi, Fernanda Alves Dorella, Dayana Ribeiro, Juliana Perez Chaparro e Núbia Seyffert (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG); Betânia Souza Monteiro e Napoleão Martins Argolo Neto (Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG), pela valiosa colaboração.

## REFERÊNCIAS

- Azevedo VAC (2008) Biotecnologia e biossegurança na produção de vacinas e kits diagnóstico. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 11: 126-129.
- Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, Smith PG, Sriram N, Wongsrichanalai C, Linke R, O'Brien R, Perkins M, Cunningham J, Matsoso P, Nathanson CM, Olliaro P, Peeling RW & Ramsay A (2006) TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 20-32.
- Brasil. Ministério da Saúde (2001) Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia. Manuais e Normas Técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. p. 11-57.
- Butcher L & Ullmann SL (1996) Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction, Fertility and Development*, 8: 35-539.
- Cardoso TAO & Silva I (2007) Biossegurança no manejo de animais. In: Cardoso TAO & Navarro MBMA (eds) *A Ciência entre Bichos e Grilos- Reflexões e Ações da Biossegurança com Animais*. São Paulo: Hucitec, Rio de Janeiro, Faperj. p. 229-257.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E & Gosden RG (1990) Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90: 21-327.
- Cavalcanti MP, Lorena VMB & Gomes YG (2008) Avanços Biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. *Revista de Patologia Tropical*, 37: 1-14.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia, M & Mattioli M (1999) In vitro development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 60: 594-601.
- Del Carlo, RJ, Monteiro, BS & Argolo Neto, NM (2008) Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. *Ciência Veterinária nos trópicos*, 11: 167-169.
- Eppig JJ & O'Brien MJ (1996) Development in vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, 54: 197-207.
- Falck-Zepeda J, Falconi C, Sampaio-Amstalden MJ, Rebolledo JLS, Trigo E & Verástegui J. *La Biotecnología Agropecuaria en América Latina: Una Visión Cuantitativa*. IFPRI Documento de Discusión 00860SP (2009) Disponível em: <<http://www.ifpri.org/spanish/pubs/dp/IFPRIDP00860sp.pdf>>. Acessado em: 3 de junho de 2009.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA & Silva JRV (2008) Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR & Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal 2ª ed.* São Paulo, Editora Roca. p. 303-327.
- Fortune JE, Kito S, Wandji SA & Srsen V (1998) Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles in vitro. *Theriogenology*, 49: 441-449.
- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (2005) Procedimentos para a manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz. CTBio-Fiocruz. 219p.
- Gadelha CAG (1996) A produção e o desenvolvimento de vacinas no Brasil. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v3n1/v3n1a08.pdf>>. Acessado em: 3 de julho de 2009.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I. & WEBB, R (2000) Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of Reproduction*, 62: 1322-1328.
- Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M & Kato S (1994) In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100: 333-339.
- Huamin Z & Yong Z (2000) In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, 54: 641-650.
- Isaaa Brief 39-2008: Executive Summary Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: (2008) The First Thirteen Years, 1996 to 2008 Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>> Acessado em: 3 de junho de 2009.
- Jewgenow K & Stolte M (1996) Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 183-19.
- McCaffery FH, Leask R, Riley SC & Telfer EE (2000) Culture of Bovine Preantral Follicles in a Serum-Free System: Markers for Assessment of Growth and Development. *Biology of Reproduction*, 63: 267-273.
- Miyazaki NHT & Bôas MHSV (2007) Medidas Sanitárias empregadas na criação de animais. In: Cardoso TAO & Navarro MBMA. *A Ciência entre Bichos e Grilos- Reflexões e Ações da Biossegurança com Animais*. Rio de Janeiro, Faperj. p. 165-185.



- Müller CA (2008) Biossegurança na Experimentação Animal. In: Anais do I Congresso Brasileiro de Bioética e Bem-Estar Animal e I Seminário Nacional de Biossegurança e Biotecnologia Animal, Recife. Anais, CFMV. p.154-157.
- Oliveira LAC, Sponchiado G & Adam ML (2006) Conceitos e aplicações de células-tronco em medicina regenerativa: uma revisão. *Revista Unicenp de Biologia & Saúde*, 2: 32-42.
- Peeling RW, Smith, PG & Bossuvt PM (2006) A guide for diagnostic evaluations. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 2-6.
- Politi FAS, Pietro RCLR & Salgado HRN (2008) Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29: 17-28.
- Richmond JY, Hill RH, Weyat RS, Nesby-O'dell SL & Vinson PE (2003) What's Hot in Animal Biosafety? *ILAR Journal*, 44: 1.
- Rosenberg FJ (2007) Sistemas de Gestão de Qualidade em Biotérios de Criação e Experimentação. In: Cardoso, TAO & Navarro MBMA A Ciência entre Bichos e Grilos - Reflexões e Ações da Biossegurança com Animais. Rio de Janeiro, Faperj. p.105-129.
- Roy SK & Treacy BJ (1993) Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility*, 59: 783-790.
- Simas C (1996) Biossegurança e arquitetura. In: Teixeira P & Valle S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro, FIOCRUZ. p. 75-110.
- Stads G & Beintema NM (2009) Public Agricultural Research in Latin America and the Caribbean: Investment and Capacity Trends. ASTI Synthesis Report. Disponível em: <[http://www.asti.cgiar.org/pdf/LAC\\_Syn\\_Report.pdf](http://www.asti.cgiar.org/pdf/LAC_Syn_Report.pdf)>. Acessado em: 3 de junho de 2009.
- Urdea M, Penny LA, Olmsted SS, Giovanni MY, Kaspar P, Shepherd A, Wilson P, Dahl CA, Buchsbaum S, Moeller G & Burgess DCH (2006) Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature*, 444: 73-79.
- Visintin, JA, Mello, MRB, Assumpção, MED (2007) Clonagem de bovinos empregando fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleos. In: Almeida MR. Biotecnologia e saúde animal, Viçosa, Editora UFV. p.79-110.
- Wilmot I, Sullivan G & Taylor J (2009) A decade of progress since the birth of Dolly. *Reproduction, Fertility and Development*, 21: 95-100.
- Wu J, Benjamin RE & Carrell DT (2001) In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 64: 375-381.