

# **A ERITROPOETINA ALFA HUMANA RECOMBINANTE COMO MODELO DA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS A PARTIR DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS**

**Karina de Figueiredo Fonseca<sup>1</sup>**  
**Silvio Valle<sup>2</sup>**

## **Introdução**

A produção de animais transgênicos ainda é recebida pela população como uma novidade no campo da biotecnologia. Assim como acontece com todo novo conhecimento, a transgenia causa certo temor e muitas dúvidas sobre as razões para se trabalhar com esse tipo de técnica e sobre quais implicações futuras ela irá desencadear.

Ainda no mesmo patamar, porém, gerando menos debates, estão os biofármacos. Esse ainda é um assunto muito novo, do qual pouquíssimas pessoas têm conhecimento, mas que, segundo os pesquisadores, irá revolucionar o cenário mundial dos fármacos.

Assim sendo, este trabalho irá tratar da análise da produção de biofármacos a partir de animais transgênicos com foco na eritropoetina alfa humana recombinante (EPO). Explicaremos o conceito de transgênicos, fazendo um breve histórico desse termo. As aplicações dos transgênicos e as técnicas de transgenia também serão analisadas, tendo, entretanto, um foco especial aquelas utilizadas para a produção da eritropoetina alfa humana recombinante.

<sup>1</sup> Ex-aluna do Curso Técnico de Ensino Médio em Biotecnologia em Saúde da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio EPSJV/FIOCRUZ; Estagiária do núcleo de Biossegurança da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio EPSJV/FIOCRUZ.

<sup>2</sup> Pesquisador Titular da EPSJV/FIOCRUZ e Coordenador dos cursos de Biossegurança da FIOCRUZ.



Faremos um estudo comparativo entre a eritropoetina humana e a eritropoetina humana recombinante, explicando sua atuação no organismo humano.

A anemia, síndrome causada por diversos tipos de doenças, possui, dentre suas causas, o decréscimo dos níveis de eritropoetina no sangue. Por isso, ela também será analisada com o objetivo de explicar os males causados por esse decréscimo de substância no corpo e como essa diminuição ocorre.

Por fim, encerraremos explicando o conceito de biofármaco, seu histórico, como se estruturam suas técnicas de produção, quais as suas aplicações na ciência e como é sua atual situação no mercado de fármacos mundial bem como no mercado brasileiro.

## **O que são animais transgênicos?**

Animais transgênicos são definidos como produtos ou organismos cujo patrimônio (genoma) foi artificialmente manipulado pela introdução, modificação ou deleção de um gene (transformação gênica), alterando todas as células do organismo de tal forma que a modificação genética seja transmitida aos descendentes (SINOGAS, 2005/2006).

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

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

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

- transgênicos por adição ou expressão exacerbada de um gene, em que várias cópias desse gene são adicionadas ao genoma;
- transgênicos por *knock-out* ou *knockin* (COLLARES, 2005).

## Histórico dos transgênicos

Pouco antes da década de setenta, o termo transgênico começou a ser utilizado na literatura científica em inúmeros estudos, mostrando a introdução de fragmentos de DNA *in vitro*<sup>3</sup> em células somáticas procarióticas (sem carioteca) e eucarióticas (com carioteca) e a indução da expressão de genes em vários tipos celulares (células do tecido nervoso e do sangue).

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

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

Entretanto, nesses experimentos não foi observada integração do gene exógeno nas células germinativas, uma vez que não houve transmissão aos descendentes. Estudos subseqüentes (1976/1977) demonstraram o sucesso na integração de DNA exógeno nas células germinativas

<sup>3</sup> Todos os fenômenos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado de um laboratório.



quando embriões de camundongos foram microinjetados com o retrovírus<sup>4</sup> da leucemia murina de Moloney (M-MuLV) com transmissão da alteração genética aos descendentes, gerando a primeira linhagem de camundongos transgênicos.

Em 1980, Gordon e Cols introduziram a técnica de microinjeção pronuclear<sup>5</sup> de uma construção viral em embriões recém fertilizados para a geração de um camundongo transgênico por adição; entretanto, não foi observada transmissão aos descendentes.

Em 1982, a primeira linhagem de camundongos transgênicos produzida por adição pela técnica de microinjeção pronuclear foi caracterizada por Richard Palmiter, Ralph Brinster e colaboradores. A idéia era produzir animais com um fenótipo<sup>6</sup> alterado com relação aos irmãos não-transgênicos, no caso, animais de maior tamanho. Para isso, construíram um DNA contendo uma cópia do gene do hormônio de crescimento de ratos sob o controle do promotor do gene de metalotioneína capaz de digerir a expressão do gene para vários tecidos do animal.

Centenas de cópias dessa construção de DNA foram microinjetadas em pronúcleos de embriões de camundongos que, posteriormente, foram transferidos para mães de aluguel. Dos vinte e um camundongos nascidos, sete carregavam a construção do gene exógeno, sendo que seis se desenvolveram mais rápido e atingiram um tamanho duas vezes maior que os irmãos não-transgênicos. Esse resultado foi um marco no desenvolvimento de animais transgênicos, despertando grande atenção na mídia em todo o mundo quando o camundongo “gigante” foi publicado na capa da revista científica Nature (PESQUERO, 2004).

Em 1987, obteve-se êxito na geração de mutações sítio específicas em células-tronco embrionárias por recombinação homóloga<sup>7</sup>. Isso possibilitou a geração dos primeiros modelos *knock-out*<sup>8</sup> de camundongos por Schwartzberg e colaboradores, demonstrando a viabilidade de transmis-

<sup>4</sup> Vírus de RNA que contém a enzima transcriptase reversa que permite a sua propagação via integração de dupla cadeia, no genoma da célula hospedeira.

<sup>5</sup> Núcleo dos gametas.

<sup>6</sup> Características observáveis de um organismo.

<sup>7</sup> Quando um gene específico pode ser modificado ou inativado no genoma.

<sup>8</sup> Quando um gene endógeno é inativado.

são de uma mutação introduzida em um gene para as células germinativas por recombinação homóloga.

Essa mesma técnica possibilitou a geração dos primeiros modelos *knockin*<sup>9</sup>, em que um gene de interesse é modificado em células-tronco embrionárias em cultura e, posteriormente, integrado no genoma de camundongos.

### **Técnicas de transgenia**

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

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

Dependendo da técnica aplicada, o animal produzido pode constituir-se somente de células que carregam o transgene (denominado animal transgênico) ou de conjuntos de células com ou sem o transgene (animal quimérico ou mosaico).

No total, podemos distinguir nove técnicas diferentes para a produção de animais transgênicos (RIBEIRO e AZEVEDO, 2005):

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

<sup>9</sup> Gene previamente modificado e substituído no genoma.



- Introdução de complexos de Lipossomas<sup>10</sup> para introduzir DNA clonado em células de embriões;
- Eletroporação<sup>11</sup>;
- Biobalística<sup>12</sup> ou Bombardeamento de partículas;
- Transferência nuclear com células somáticas, tronco ou germinativas embrionárias transfectadas;
- Injeção de DNA em testículo para produzir células-tronco espermatogênicas transgênicas;

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

### **Transgênicos por adição ou superexpressão**

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

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

<sup>10</sup> Estruturas pequenas, consistindo em camadas de lipídios semelhantes a lipídios de membrana capazes de proteger o DNA exógeno da digestão por proteases e DNAses.

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

<sup>12</sup> Método físico que utiliza microprojéteis acelerados para introduzir o DNA em tecidos e células.



Este fato pode levar ao aparecimento de um fenótipo independente do transgene, no animal transgênico, o que exige a necessidade da comparação do fenótipo alterado em diferentes linhagens mutantes. Além disso, o número de cópias do gene inserido no genoma não pode ser controlado, bem como o nível de expressão do mesmo, o qual é dependente do número e da posição de inserção do genoma. (PESQUERO, 2004).

### **Microinjeção pronuclear**

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

Utilizando-se um micromanipulador (agulha de diâmetro extremamente fino) acoplado a um microscópio invertido de alta resolução, centenas de cópias de uma construção de DNA (endógeno ou de outra espécie) são injetadas diretamente em um dos pronúcleos (masculino ou feminino) de embriões recém fecundados (oócitos) coletados do oviduto<sup>13</sup> de fêmeas doadoras superovuladas<sup>14</sup>.

Os pronúcleos são os núcleos materno e paterno provindos do óvulo e do espermatozóide, respectivamente, antes que se unam para formar um único núcleo contendo o genoma do novo indivíduo. Normalmente, múltiplas moléculas de DNA tendem a integrar-se ao genoma do hospedeiro, em um único sítio de inserção.

Após a microinjeção os embriões permanecem em cultivo *in vitro* até serem transferidos para o oviduto de uma fêmea receptora pseudográvida, previamente acasalada com um macho vasectomizado<sup>15</sup> que levará a ter-

<sup>13</sup> Local de "trânsito" para o óvulo e o espermatozóide.

<sup>14</sup> Método para estimular diversos folículos terciários até o estágio de ovulação.

<sup>15</sup> Método cirúrgico de esterelização masculina.



mos o nascimento dos possíveis transgênicos posteriormente genotipados<sup>16</sup> quanto à presença do gene exógeno (GONSALVES, FIGUEIREDO; FREITAS, 2002).

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

- **Vantagens:** Tem eficiência relativamente alta para gerar linhagens de animais transgênicos que expressem o transgene de maneira correta, o que garante a certeza de uma prole transgênica. O índice de animais que contêm o gene inserido em seu genoma é maior que nos outros métodos. É a mais simples e com os melhores resultados. Permite um controle mais apurado, além de permitir uma produção em série de animais transgênicos;

- **Desvantagens:** Essa técnica é limitada. O método não pode ser aplicado a embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento. A detecção do sítio de inserção no cromossomo hospedeiro é difícil, pois o DNA se integra em cópias múltiplas. Ocorrem rearranjos causados no genoma da célula microinjetada e introdução de várias cópias do transgene, originando animais com expressão variável do transgene (PESQUERO, 2004).

## Utilizações de animais transgênicos

As principais linhas de pesquisa dividem-se em:

- Estudo da regulação e expressão gênica<sup>17</sup>;

<sup>16</sup> Constituição genética de um organismo em relação às características consideradas, herdando-as dos seus progenitores.

<sup>17</sup> Estudo dos mecanismos moleculares que controlam a expressão e a regulação de diversos genes durante o desenvolvimento fetal e já no próprio tecido adulto.





- Utilização de animais transgênicos como biorreatores para a produção de biofármacos e bioprodutos;
- Produção de modelos animais para aplicações biomédicas<sup>18</sup>;
- Incrementos de novas características genéticas de produção importantes economicamente;
- Xenotransplantes<sup>19</sup>.

### **Biorreatores vivos**

Biorreatores vivos são animais modificados geneticamente a partir da introdução de uma proteína específica (que pode ser endógena ou exógena), utilizando-se promotores tecido-específicos para que esses animais posteriormente venham a atuar como biofábricas, produzindo essa proteína de interesse em larga escala e com um alto valor farmacológico (RECH, 2001).

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

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

Normalmente, essa produção de proteínas é direcionada para vários fluidos biológicos, como urina, plasma sangüíneo e leite das glândulas mamárias. O isolamento de proteínas nos fluidos apresenta grande

<sup>18</sup> Animais que apresentam doenças semelhantes às que atingem os seres humanos, de maneira que se possa compreender como se estrutura a doença (causas,estágios, sintomas) e buscar formas de tratamento.

<sup>19</sup> Produção de animais transgênicos como futuros doadores de órgãos para os seres humanos que expressem fatores de inibição e rejeição.



vantagem em relação à sua produção nos tecidos, uma vez que os fluidos são constantemente produzidos e as proteínas são fáceis de serem recuperadas.

Vários experimentos já foram feitos introduzindo-se as proteínas recombinantes de interesse nos fluidos já mencionados. Contudo, a expressão da maioria delas mostrou-se prejudicial para a saúde dos animais (RUMPF e MELO, 2005). Somente nas glândulas mamárias a manipulação de proteínas recombinantes não apresentou nenhum problema para o animal.

Além disso, o fato de as proteínas do leite não circularem pelo corpo do animal (o que tornaria mais difícil sua purificação) e a produção freqüente deste, fazendo com que possa ser coletado em grandes quantidades, além dos custos reduzidos para a produção, são algumas das características que fazem com que a glândula mamária seja considerada como o melhor biorreator vivo disponível atualmente (HAUSER e WAGNER, 1997).

A produção dessas proteínas já se dá em laboratórios por meio de células em cultura (CHO<sup>20</sup>, por exemplo) ou sendo sintetizadas por bactérias. Contudo, algumas proteínas humanas são muito complexas para serem produzidas por microrganismos e sua produção em células em cultura não se dá em larga escala.

Em termos quantitativos, a glândula mamária é capaz de gerar dezenas de gramas de proteínas recombinantes por litro de leite a cada dia, ao passo que, através de sistemas de produção em células em cultura, pode-se produzir no máximo 1-2 gramas (100-200mg) por litro a cada dia (RECH, 2001).

A partir dessa constatação, diversos animais, como coelhos, cabras, porcos, vacas e ovelhas, têm sido utilizados como biofábricas para a produção de fármacos. Entretanto, as espécies mais utilizadas para essa prática tem sido a dos ovinos, caprinos e bovinos, devido ao alto nível de produção de leite e proteínas segregadas por eles.

---

<sup>20</sup> Células de ovário de hamster chinês.



Uma vez produzida no leite, a proteína será posteriormente isolada (extraída e purificada), para que só então seja transformada em fármaco.

### **Biossegurança para animais transgênicos**

No manuseio de animais transgênicos, existem pelo menos três tipos de riscos que devem ser evitados: contaminação do pesquisador ou tratador durante o manuseio do animal; liberação dos Animais Geneticamente Modificados (AnGMs) para o meio ambiente, podendo se tornar danoso para as demais espécies do ecossistema; e contaminação de outros animais (AnGMs ou não) por contato com o transgênico (JURKIEWICZ, 2001).

Os AnGMs devem ser criados em locais apropriados (biotérios) onde devem permanecer protegidos para evitar qualquer tipo de contaminação. Entretanto, é importante esclarecer que não estamos nos referindo apenas à contaminação externa (de outros animais, do meio ambiente ou da sociedade), mas também da contaminação do próprio animal a ser utilizado. Os animais não podem estar contaminados com vírus, bactérias e/ou parasitas. Isso interferiria no objetivo final da produção do transgênico, inutilizando as pesquisas. Assim sendo, é preciso que o biotério onde esses animais são mantidos tenha toda infra-estrutura, como filtragem do ar com filtros especiais, barreiras de contenção sofisticadas, como microisoladores<sup>21</sup>, autoclaves e diversos outros equipamentos que garantam a manutenção de um ambiente estéril.

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

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

<sup>21</sup> Gaiolas com filtro de barragem para microrganismos.



Quanto ao pessoal que trabalha com os AnGMs (sejam pesquisadores ou tratadores dos animais), todos devem ser especializados para esse tipo de trabalho. Somente deve ser permitida a entrada de pessoas credenciadas, que devem seguir determinadas regras de vestimenta (como roupas adequadas, máscaras, luvas, sapatos apropriados etc.) bem como de conduta para com os animais e os demais trabalhadores do biotério e do laboratório. (JURKIEWICZ, 2001).

## **Eritropoetina (EPO)**

### **Eritropoetina humana e sua produção**

A eritropoetina é um hormônio natural glicoprotéico produzido pelas células epiteliais que revestem os capilares peritubulares renais que regulam a proliferação e a diferenciação de células hematopoiéticas, como os eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), conhecida como eritropoiese e realizada pela medula óssea. Os rins são responsáveis por secretar 90% da eritropoetina circulante. Já o fígado contribui com cerca de 10% da produção total desse hormônio.

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

No interior dos ossos longos, encontramos a medula óssea (ou medula vermelha), responsável pela hematopoiese. Lá, a eritropoetina estimula a produção de eritropoiese, induzindo a divisão e diferenciação das células progenitoras eritróides, aumentando a quantidade disponível no sangue circulante. Assim, o oxigênio encontra maior facilidade para circular pelo organismo, chegando até todos os tecidos.



## Eritropoetina humana recombinante

Esse hormônio, agora conhecido como eritropoetina recombinante, tem a mesma função do hormônio natural produzido pelo corpo – estimular a produção e diferenciação de eritrócitos —, mas agora pode ser administrado através de tratamentos clínicos de maneira a suprir a deficiência de sua produção no organismo causada por alguns tipos de enfermidades.

Em pessoas normais, os níveis plasmáticos de eritropoetina oscilam num intervalo entre 10mUI/ml e 30 mUI/ml e podem ser incrementados até 100 vezes durante períodos de hipóxia ou anemia. No entanto, em pacientes com insuficiência renal crônica, a produção de eritropoetina endógena é deficiente e, ainda que a patogenia da anemia nesses pacientes seja multifatorial, essa deficiência é a causa primária.

A primeira evidência de resposta à eritropoetina é o incremento na contagem de reticulócitos nos primeiros 10 dias de tratamento, seguido de um incremento na contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, geralmente –no período de duas a seis semanas seguintes. Uma vez alcançada a meta proposta de hematócrito (33% - 36%), esse nível deve ser mantido, se não existir deficiência de ferro ou outra doença concomitante.

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

A eritropoetina alfa humana recombinante é uma glicoproteína de peso molecular igual a 34.400 daltons<sup>22</sup>, produzida através da tecnologia de DNA recombinante, contendo 165 aminoácidos que se apresentam em seqüência idêntica à da EPO endógena (MELLO, 2000). Seu tempo médio de ação é de 5,2 horas.

Sua atividade biológica é a mesma e corresponde a 129.000 UI/mg do hormônio natural. Ela induz a liberação de reticulócitos<sup>23</sup> da medula óssea

<sup>22</sup> Pequena unidade de massa usada para expressar massas atômicas e moleculares. Não é uma massa do SI (Sistema Internacional de Medidas).

<sup>23</sup> Células eritrocitárias imaturas.



na corrente sangüínea, onde ocorre sua maturação em eritrócitos. A eritropoetina pode ser aplicada por via subcutânea ou via intravenosa.

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

Atualmente, a eritropoetina alfa humana recombinante é usada no tratamento de anemias relacionadas à quimioterapia em pacientes com tumores malignos não mielóides<sup>24</sup>, insuficiência renal crônica (com ou sem diálise), terapia com zidovudina<sup>25</sup> em pacientes infectados por HIV (nível de eritropoetina endógena < 500 um/mL), casos de cirurgia não cardíaca e não vascular, reduzindo a necessidade de transfusões em pacientes com hemoglobina > 10 e 13 g/dL (MELLO, 2000).

Possui contra-indicação para pacientes com hipertensão, hipersensibilidade a eritropoetina humana recombinante, soro-albumina humano e produtos derivados de células de mamíferos ou aos componentes da fórmula, além de pessoas portadoras de leucemia eritróide e em período de gravidez e lactação.

A eritropoetina beta humana recombinante também é um antianêmico, contudo é menos específico que a alfa humana recombinante. Ela age estimulando a formação de glóbulos vermelhos e é indicada para o tratamento de alguns tipos de anemia. A única contra-indicação é a alergia a alguma das substâncias presentes em sua composição.

Alguns tratamentos, como a quimioterapia e a radioterapia (para pessoas acometidas por algum tipo de neoplasia), além de algumas doenças, como a AIDS, a insuficiência renal crônica e a deficiência do organismo de algumas vitaminas e minerais (vitamina B12 e ferro, por exemplo), diminuem o número de eritrócitos presentes no organismo. Isso leva à ocorrência de uma das principais síndromes que atingem a população mundial: a anemia.

<sup>24</sup> São células que incluem os monócitos e os granulócitos.

<sup>25</sup> Análogo sintético de um composto da Timina que bloqueia a incorporação de novos nucleotídeos à cadeia de DNA, o que leva à interrupção da síntese do DNA viral complementar.



## Conceito de anemia

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

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

Atualmente, a anemia é considerada como sendo a síndrome crônica de maior ocorrência em quadros clínicos. Ela é classificada em dois tipos: anemia aguda e anemia crônica. A anemia aguda é caracterizada pela perda súbita de sangue (principalmente por hemorragias). Nela, a diminuição do volume de sangue total é mais importante que a falta de eritrócitos e de hemoglobina. Já na anemia crônica, o volume sangüíneo total permanece normal (pois é compensado pelo aumento do volume plasmático), mas ocorre uma diminuição da quantidade de eritrócitos e da hemoglobina. Esta normalmente é desenvolvida através de alguma enfermidade adquirida pelo paciente (já mencionadas anteriormente) (SOUZA e ELIAS, 2005).

## Tipos de anemia

- Além de apresentar diversos graus de severidade, existem diversos tipos de anemia, todas de particular importância e interesses médicos e/ou sociais. Os principais tipos de anemia e suas causas são (OLIVEIRA e NETO, 2004): Anemia de carência de ferro (anemia ferropriva);



- Anemia de carência de vitamina B12 (anemia perniciosa ou anemia megaloblástica<sup>26</sup>) e de carência de ácido fólico;
- Anemia das doenças crônicas - uremia<sup>27</sup>, hipotireoidismo<sup>28</sup>, hepatite, insuficiência renal, neoplasias, infecções bacterianas, virais (em especial a AIDS) e por parasitas;
- Anemia por anomalias genéticas – hemoglobinopatias<sup>29</sup>, sendo as mais comuns hemoglobinopatias S (anemia falciforme), síndromes talassêmicas (talassemia<sup>30</sup> alfa ou beta), esferocitose e eliptocitose, deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e anemia de fanconi <sup>31</sup>;
- Anemia por destruição periférica dos eritrócitos - malária, anemias hemolíticas autoimunes<sup>32</sup>, anemia por fragmentação dos eritrócitos;
- Anemia decorrente de doenças da medula óssea – anemia aplásica<sup>33</sup>, leucemias e tumores na medula;
- Anemia por perda de sangue – hemorragia excessiva (acidentes, parto etc.), sangramento crônico devido a úlceras, câncer intestinal, ciclo menstrual excessivo, sangramento nasal, sangramento por hemorróidas etc.

## Sintomas e diagnóstico

Em muitas pessoas a anemia pode ser assintomática ou apresentar sintomas muito vagos. Contudo, os sintomas mais freqüentes são: fadiga, fraqueza, palidez, dificuldades de concentração, falta de ar, vertigem, astenia

<sup>26</sup> Síntese comprometida do DNA.

<sup>27</sup> Excesso de uréia na corrente sanguínea.

<sup>28</sup> Diminuição do funcionamento da glândula tireóide.

<sup>29</sup> Distúrbios da hemoglobina.

<sup>30</sup> Característica do sangue transmitida de pais para filhos. Ela reduz a quantidade de hemoglobina que o corpo pode fabricar.

<sup>31</sup> Doença hereditária que afeta principalmente a medula óssea, gerando uma redução na produção de todos os tipos de células sanguíneas do organismo.

<sup>32</sup> Destruição precoce das hemácias devido à fixação de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária.

<sup>33</sup> Déficit (de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) no sangue periférico, secundária a uma medula óssea marcadamente hipocelular, afetando as três linhas celulares: granulocítica, eritróide e megacariocítica.





(fraqueza orgânica) e extremidades frias. Nos casos mais severos, podem ocorrer desmaios, taquicardia, palpitações, hipotensão e, por fim, choque que pode levar a um quadro irreversível e letal.

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

O exame mais comum para diagnosticar a anemia é o hemograma. A partir do volume de células sanguíneas e do nível de hemoglobina detectado na amostra coletada, pode-se detectar se o paciente possui, ou não, anemia. Além disso, esse exame também pode detectar as anisocitoses<sup>34</sup> que irão determinar de qual tipo de anemia o paciente está acometido (SOUZA e ELIAS, 2005), tais como:

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

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

<sup>34</sup> Alterações morfológicas quanto ao tamanho das hemácias.



## Histórico e conceito de biofármacos

A idéia de produzir drogas transgênicas ocorreu a muitos cientistas em meados da década de 80, quando esse novo setor começou a enfrentar o desafio de fabricar proteínas complexas: assegurar que essas grandes moléculas tivessem a forma adequada, e com todos os açúcares nos locais corretos, na superfície dos aminoácidos das proteínas.

A partir disso, começou-se a buscar meios de se isolarem essas proteínas humanas em quantidades significativas, de maneira a tornar possível a extração para a produção das drogas de interesse. Contudo, havia muitas etapas ainda a serem alcançadas para que se pudesse obter as tais drogas transgênicas.

A princípio, era necessário encontrar uma maneira de produzir essas proteínas de modo que nada interferisse na sua estruturação (fatores externos, como microorganismos, ou fatores internos, como enzimas, por exemplo). Precisava-se de um mecanismo que as produzisse de maneira pura e em grandes quantidades.

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

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

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



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

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

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

São, na verdade, medicamentos biológicos de primeira qualidade construídos à base de substâncias idênticas ou muito parecidas com as humanas, que atuam com mais eficácia e menos efeitos colaterais que os produtos químicos.

No caso dos animais (foco deste estudo), essas moléculas modificadas seriam introduzidas em seus genomas (transgenia) e a produção se daria nos fluidos desses animais, principalmente nas glândulas mamárias – por motivos já explicitados anteriormente - por constatar-se que atendiam rigorosamente a todas as exigências feitas para a produção dessas drogas de interesse (HAUSER e WAGNER, 1997).

Com o desenvolvimento dessa técnica, tornou-se possível a produção de proteínas muito complexas e em grandes quantidades. Embora existam algumas rejeições a utilização de animais como biofábricas tem sido muito bem aceita, quando comparada à introdução de transgênicos na alimentação, uma vez que esses animais estão sendo produzidos para serem utilizados como remédios e não como alimento.



## **Etapas da produção de biofármacos**

Essas etapas consistem na obtenção da linhagem celular recombinante, produção dos animais transgênicos, cultivo das células nesses biorreatores e, finalmente, purificação da proteína obtida.

A obtenção da linhagem celular recombinante se dá pela inserção das novas características na proteína a ser expressa. No nosso caso, com a eritropoetina são administradas alterações que reduzem os efeitos colaterais, minimizando o grau de rejeição do organismo para essa substância.

Obtidas essas linhagens celulares de proteínas recombinantes, é necessária a produção dos animais transgênicos a partir da introdução dessas mesmas proteínas no genoma do animal escolhido. No caso da eritropoetina, os animais mais utilizados para pesquisas e estudos, até hoje, são os camundongos e coelhos (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

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

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

Mesmo após a industrialização do produto, este não será imediatamente levado para as prateleiras no mercado. Serão ainda realizados estudos pré-clínicos (testes farmacológicos, toxicológicos etc), além de um minucioso desenvolvimento clínico, a fim de analisar possíveis efeitos colaterais (a curto e a longo prazo).



## Purificação de proteínas

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

O processo de purificação de uma proteína dependerá de suas características físico-químicas, de suas propriedades biológicas, da fonte da qual a proteína será purificada e da tecnologia de purificação disponível. Este é dividido em etapas que visam distinguir as proteínas umas das outras de acordo com suas respectivas seqüências de aminoácidos, com o conteúdo de carboidratos e lipídio-estrutura tridimensionais e com suas atividades biológicas (HO; KITAHARA; OGAWA; SILVA; RAMOS e NASCIMENTO, 2000).

As cromatografias<sup>35</sup> em colunas de gel, filtração ou adsorção são os sistemas mais utilizados para a separação das proteínas. Contudo, ao longo do processo de purificação, pode haver mudanças nas estruturas das proteínas. Isso transforma esse processo num desafio para os cientistas, que buscam minimizar os fatores que possam causar essas alterações (controle de variação de temperatura, oxidação etc.) de maneira a garantir que o produto final tenha todas as características necessárias para seu uso.

É necessário que a proteína seja extraída de sua fonte natural. Os tecidos em que ela se encontra são triturados e os microorganismos ou as células animais provenientes de cultura são lisadas por sonificação<sup>36</sup>. Se esta estiver restrita a uma organela em particular, uma purificação substancial é obtida a partir do isolamento dessas estruturas celulares, geralmente por centrifugação diferencial em gradiente de sacarose (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

<sup>35</sup> Técnica bioquímica na qual uma mistura de substância pode ser separada pela carga, tamanho, ou alguma outra propriedade de seus componentes, através da sua partição entre uma fase móvel e outra estacionária.

<sup>36</sup> Variações repentinas de pressão e osmolaridade, forte agitação na presença de esferas de vidro ou por enzimas citolíticas.



Em seguida, temos a clarificação da amostra. Esta é feita através de resinas cromatográficas que garantem com segurança a adsorção da amostra – sistema de leite expandido.

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

Ainda assim, é possível que algum resíduo tenha restado na proteína purificada. Por isso, são realizados testes com o objetivo de avaliar o resultado de pureza final da amostra. Dentre as diferentes técnicas, podemos citar: seqüenciamento peptídeo automático, espectrometria de massa<sup>37</sup>, ressonância magnética<sup>38</sup> de alta resolução, eletroforese<sup>39</sup> em gel de poliacrilamida e eletroforese bidimensional.

De acordo com as estratégias planejadas, pode-se saber se a proteína exige um grau mais complexo de purificação (conforme a aplicação final do produto: humano, veterinário ou diagnóstico), quais técnicas serão utilizadas (conforme a viabilidade econômica), qual a escala de manufatura para atender à demanda do produto, dentre outras (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

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

Contudo, antes de ser utilizada na aplicação medicinal, ainda serão realizados testes e experimentos científicos, além de a substância passar

<sup>37</sup> Análise a partir do espectrômetro, instrumento ótico que serve para medir as propriedades da luz em uma determinada porção do espectro eletromagnético.

<sup>38</sup> Técnica de fazer radiografias computadorizadas mais complexas para a identificação de alterações no organismo.

<sup>39</sup> Técnica laboratorial de fracionamento de proteínas, enzimas, DNA e RNA.



por uma rigorosa avaliação de biossegurança, para que só assim possa ser utilizada como uma molécula terapêutica e circular no mercado.

A arte de purificação de proteínas varia de acordo com as características estruturais e físico-químicas de cada uma delas. Portanto, cada proteína deve ser analisada separadamente, de maneira a se adequar a melhor técnica ao processo, garantindo que o produto final tenha todas as características desejadas no princípio.

### **Importância dos biofármacos**

Fármacos como a eritropoetina recombinante fazem parte da lista de medicamentos tidos pelo Ministério da Saúde como excepcionais (constituída por 216 itens, dentre os quais encontramos a eritropoetina). Essa classificação se deve ao seu alto custo de produção ou importação e à dificuldade de acessibilidade.

Todo ano, milhões de dólares são gastos com a importação ou com a produção desses medicamentos em células em cultura ou em bactérias. A idéia de se produzirem os biofármacos surgiu como uma tentativa de garantir uma maior disponibilidade desses produtos no mercado, reduzindo o custo final para o consumidor.

Proteínas como a eritropoetina, o interferon<sup>40</sup>, os anticorpos monoclonais<sup>41</sup> e os anticoagulantes, dentre outros, estão na lista dos medicamentos mais caros e que possuem uma maior demanda de produção. Daí a idéia de fabricá-los em animais vivos, que teriam um custo muito reduzido e poderiam corresponder a essas demandas, uma vez que produziriam as proteínas de interesse em grandes quantidades e com segurança garantida.

Apesar do encarecimento inicial (com relação à obtenção dos equipamentos) para se produzirem animais transgênicos, vemos que a produção

<sup>40</sup> Substância de origem celular, produzida por todos os animais vertebrados ou invertebrados, capaz de inibir a multiplicação de células cancerígenas e de certos vírus.

<sup>41</sup> Produzidos em laboratórios pela fusão de células, não estão presentes na natureza. São resultantes da multiplicação de um único clone híbrido de duas células.



posterior dos biofármacos em si, a partir de biorreatores vivos, é uma técnica com baixo investimento de capital, que resulta em produtos seguros para o consumidor. Além disso, possui uma grande facilidade de estocagem e transporte.

## **Biofármacos no cenário mundial e brasileiro**

Algumas pesquisas mostram que a utilização de biorreatores vivos poderia reduzir os custos de produção de proteínas recombinantes em até 50 vezes, quando comparados aos custos com os produtos convencionais.

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

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

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

A GTC, por exemplo, é uma das maiores empresas de Biotecnologia existentes na atualidade, tendo lançado o primeiro medicamento produzido em animais transgênicos (cabras transgênicas), o Atryn, um agente anticoagulante para o tratamento de pacientes acometidos de antitrombina<sup>42</sup> hereditária – já aprovado pela Agência Européia de Medicina.

<sup>42</sup> Pequena molécula que inativa várias enzimas que possibilitam a coagulação.





As demais empresas ainda estão em fase de estudos e de produção de outros medicamentos, contudo, sem previsões para lançar no mercado. No caso da eritropoetina, algumas empresas japonesas estão realizando estudos sobre sua produção utilizando camundongos e coelhos como biorreatores. Contudo, também sem previsão para o lançamento dessas moléculas recombinantes no mercado.

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

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

Essa problemática se deve a inúmeros fatores: econômicos, como os altos custos para a compra e manutenção dos equipamentos necessários para as técnicas de transgenia; educacionais, no que diz respeito à necessidade de especialização dos profissionais para atuarem nessa área; e legislativos, uma vez que o Brasil é um dos países com mais regras e questões burocráticas com relação à área da saúde e da biotecnologia.

## **Considerações finais**

Apesar de novas e ainda muito desconhecidas pela grande maioria da população, as técnicas de transgenia estão cada vez mais inseridas nas atuais e futuras aplicações médicas. Como muitas vezes afirmado, elas são a base para uma revolução na área da saúde. A decodificação, bem como a manipulação do genoma, representa o avanço mais importante da genética moderna.

Embora dispendiosas inicialmente, devido aos altos custos dos equipamentos e da sua manutenção, essas técnicas se mostram vantajosas e eficientes a longo prazo, podendo interferir, de maneira satisfatória, nos



mais diversos campos da ciência. Apesar de enfocarmos a transgenia para a produção de animais que futuramente poderão atuar como biorreatores, não devemos esquecer das demais aplicações que essas técnicas possuem e dos benefícios que poderemos obter através delas.

Sua melhor aceitação se dá justamente no campo dos fármacos porque, quando essas técnicas não mexem diretamente com algo que vemos e que sabemos que, de livre e espontânea vontade, estamos ingerindo, a relutância e o receio para ingeri-los se torna incrivelmente menor. Isso ocorre, principalmente, pelo fato de as pessoas pouco entenderem e pouco buscarem conhecer sobre a composição, a empresa fabricante e a origem dos medicamento que ingerem.

De um modo geral, em se tratando de transgênicos, as controvérsias ainda existem, e, até que esse assunto seja completamente esclarecido, de maneira a deixar bem claros seus prós e seus contras, será difícil sua instituição e popularização no cenário científico brasileiro, em especial no campo da alimentação.

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

No que diz respeito à síndrome enfocada neste estudo, chega-se à conclusão de que ela é uma das que mais atinge a população mundial nos dias de hoje. Trata-se de uma síndrome muito comum, que apresenta sintomas claros (na maioria das vezes), o que facilita seu diagnóstico. Qualquer alteração ou sensação de mal estar deve ser informado imediatamente a um médico competente para que este possa avaliar o caso e diagnosticar se existe algum problema a ser tratado (independentemente de estar relacionado ou não com a anemia).

Embora caro, já existe no mercado um medicamento à base de eritropoetina recombinante para o tratamento da anemia por deficiência desse hormônio glicoprotéico. Por estar na lista de medicamentos excepcionais, seu requerimento deve ser feito ao Ministério da Saúde para que só

então o paciente possa ter acesso a ele. Seu elevado custo, além de todas essas etapas para sua obtenção por intermédio do SUS (Sistema Único de Saúde), dificultam o acesso da população a esse medicamento.

Foi como forma de amenizar esses problemas que se começou a estudar uma forma de produção mais barata desses e de outros fármacos. Assim nasceu a idéia dos biofármacos, produtos que nada mais são do que medicamentos produzidos em larga escala através de animais transgênicos de grande porte, que após sua purificação serão industrializados e comercializados.

Obter medicamentos que possuem uma grande demanda por um baixo preço está se tornando uma realidade cada vez mais próxima. Os produtos biotecnológicos estão em pleno desenvolvimento e hoje alcançam mais de 10% dos novos produtos inseridos no mercado.

### Referências bibliográficas

ALMEIDA, Marcius S. e KURTENBACH, Eleonora. Como purificar proteínas? In: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n°. 24, págs. 30-35, jan.-fev/2002.

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

Canadian regulatory requirements for veterinary biologics produced by biotechnology. AgbiotechNet. Proceedings002. Disponível em <<http://www.agbiotech.net>>. Consultado em 04/05/2006.

COLLARES, Tiago. *Animais Transgênicos – Princípios & Métodos*. São Carlos, SP: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 1ªed, 2005.

SCHOBBER, Juliana Ética para os animais transgênicos postado em 10/05/2002. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/transgenicos/trans11.htm>>. Consultado em 13/06/2006.

GOLDIM, Roberto José. Animais Transgênicos. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/animtran.htm>>. Consultado em 29/08/2006.

GONSALVES, P. B. e FIGUEIREDO, J. R. & FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à produção animal*. São Paulo, SP: Ed. Varela, 2002.



HAUSER, Hansjörg e WAGNER, Roland. *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*. New York: Ed. Walter de Gruyter, 1997.

HO, Paulo Lee; KITAHARA, Érika; OGAWA, Diogo M. O.; SILVA, Álvaro R. B. Prieto da; RAMOS, Celso Raul Romero e NASCIMENTO, Ana Lúcia Tabet Oller. A arte de purificar proteínas. In: *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.º. 13, p. 24-26, mar-abr/2000.

INSTITUTO BUTANTAN. Laboratório especial de biofármacos em célula animal. Linhas de Pesquisa. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/biofarmacos.htm>>. Consultado em 26/02/2006.

JURKIEWICZ, Aron. Biossegurança no manejo de modelos animais. In: *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.º. 18, p. 31-33, jan/fev/2001.

STIX, Gary - O medicamento que veio do leite. Edição 43 – postado em dez/2005. Disponível em: <[http://www2.uol.com.br/sciam/artigos/o\\_medicamento\\_que\\_veio\\_do\\_leite\\_2.html](http://www2.uol.com.br/sciam/artigos/o_medicamento_que_veio_do_leite_2.html)>. Consultado em 14/10/2006.

PESQUERO, João Bosco e BAPTISTA, Heloísa Allegro. *Animais Transgênicos*. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2004.

PESQUERO, João Bosco. [Íntegra do Biochat realizado em 09/10/2003 – Animais Transgênicos em *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*]. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Consultado em: 14/10/2006.

PESQUERO, João Bosco; MAGALHÃES, Luís Edmundo; e SABATINE, Regiane Angélica. *Animais Transgênicos*. In: *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.º. 27, p. 52-56, jul-ago/2002.

RECH, Elíbio. Os OGM's como biofábricas de medicamentos. In: *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.º. 20, págs. 4-7, maio/junho 2001.

RIBEIRO, Luciana de Andréia e AZEVEDO, Vasco. *Animais Geneticamente modificados (Transgênicos) e a Legislação Brasileira de Biossegurança. Manual de Biossegurança, Parte IV., 2005.*

RUMPF, Rodolfo e MELO, Eduardo O. *Produção de animais transgênicos: Metodologias e aplicações*. Brasília: Embrapa, 2005.

SINOGAS, Carlos. *Animais Transgênicos*. *Biotecnologia 2006/07*. Disponível em: <http://www.ensino.uevora.pt/biotec/Transgenicos.pdf>

