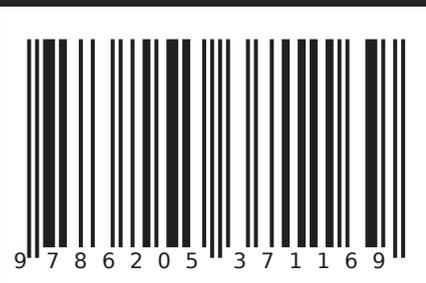


# Fundamentos de Biologia Médica e Biologia Molecular Médica

Biologia, estudo dos seres vivos e seus processos vitais. O campo lida com todos os aspectos físico-químicos da vida. A tendência moderna para a pesquisa interdisciplinar e a unificação do conhecimento científico e da investigação de diferentes campos resultou em uma sobreposição significativa do campo da biologia com outras disciplinas científicas. O conceito de homeostase de que os seres vivos mantêm um ambiente interno constante foi sugerido pela primeira vez no século XIX pelo fisiologista francês Claude Bernard, que afirmou que "todos os mecanismos vitais, variados como são, têm apenas um objetivo: o de manter constantes as condições da vida". RT-PCR pode ser usado para diagnosticar doenças genéticas, como a síndrome de Lesch-Nyhan. Esta doença genética é causada por um mau funcionamento no gene HPRT1 que clinicamente leva ao cálculo urinário fatal de ácido úrico e sintomas semelhantes à gota. A análise de uma mãe grávida e de um feto quanto aos níveis de expressão de mRNA de HPRT1 revelará se a mãe é portadora e se o feto provavelmente desenvolverá a síndrome de Lesch-Nyhan.



Ela é Ph.D. em Biotecnologia, com microbiologia, Engenharia Genética, Genética Molecular e Engenharia de Proteínas, pesquisador, criador, inventor e autor, professor da University College of Al-Turath University college, bacharel em Microbiologia e mestre em Biologia Molecular em Microbiologia pela Al-Mustan.



EDIÇÕES  
NOSSO CONHECIMENTO

Nebras Rada Mohammed



EDIÇÕES  
NOSSO CONHECIMENTO



## Fundamentos de Biologia Médica e Biologia Molecular Médica

*Biologia Celular e Biologia Molecular Especializada*

**Nebras Rada Mohammed**

**Nebras Rada Mohammed**

**Fundamentos de Biologia Médica e Biologia Molecular Médica**

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**Nebras Rada Mohammed**

# **Fundamentos de Biologia Médica e Biologia Molecular Médica**

**Biologia Celular e Biologia Molecular  
Especializada**

FOR AUTHOR USE ONLY

**ScienciaScripts**

## **Imprint**

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

This book is a translation from the original published under ISBN 978-620-5-50208-2.

Publisher:

Scientia Scripta

is a trademark of

Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L Publishing group  
Str. Armeneasca 28/1, office 1, Chisinau MD-2012, Republic of Moldova,  
Europe

Printed at: see last page

**ISBN: 978-620-5-37116-9**

Copyright © Nebras Rada Mohammed

Copyright © 2022 Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L  
Publishing group

FOR AUTHOR USE ONLY

**Fundamentos de Biologia Médica e  
Biologia Molecular Médica**

**Subtítulo**

**Biologia Celular e Biologia Molecular  
Especializada**

**Por**

**Nebras Rada Mohammed**

**Universidade de Al-Turath**

**Departamento de Engenharia Biomédica**

**Iraque**

# Conteúdos

1-Biologia .....	6
1-1 Tipos de células .....	65
Célula A-Eukaryotic .....	83
Célula B-Prokaryotic .....	91
1-2 Componentes das células procarióticas .....	94
Parede A-Cell .....	98
B-Nucleus .....	102
Membrana C-Cell .....	112
D- Organelas .....	137
E - Ácidos nucleicos .....	152
1-3 Referências .....	250

## Sobre o Autor



### **Nebras Rada Mohammed**

Ela é doutorada. em Biotecnologia, com uma micro especialização, Engenharia Genética, Genética Molecular e Engenharia de Proteínas, investigadora, criadora, inventora e autora, professora no Colégio Universitário da Universidade de Al-Turath, licenciada em Microbiologia e mestre em Biologia Molecular em Microbiologia pela Universidade Al-Mustansiriya, árbitro, residente internacional e consultora em laboratórios médicos, perita em laboratórios médicos e detentora do título de projecto de cientista, um árbitro, uma editora distinta, um apoiante de prata de plataformas científicas, um presidente de um comité numa sociedade científica, recebendo elogios da propriedade intelectual internacional, o Prémio da Melhor Mulher Árabe 2020, também o Prémio da Melhor Personalidade Comunitária, o Prémio da Melhor Investigação 2019, também o Prémio da Melhor Investigação 2020 e um Prémio Americano pela invenção de 2020 pelo GUIA Americano a Comissão Mundial de Investimento na América.

## Prefácio

Biologia, estudo dos seres vivos e dos seus processos vitais. O campo lida com todos os aspectos físico-químicos da vida. A tendência moderna para a investigação interdisciplinar e a unificação do conhecimento científico e investigação de diferentes campos resultou numa sobreposição significativa do campo da biologia com outras disciplinas científicas.

O conceito de homeostasia que os seres vivos mantêm um ambiente interno constante foi sugerido pela primeira vez no século XIX pelo fisiologista francês Claude Bernard, que afirmou que "todos os mecanismos vitais, por muito variados que sejam, têm apenas um objectivo: o de preservar constantemente as condições de vida".

RT-PCR pode ser usado para diagnosticar doenças genéticas como a síndrome de Lesch-Nyhan. Esta doença genética é causada por um mau funcionamento do gene HPRT1 que clinicamente conduz à pedra urinária de ácido úrico fatal e a sintomas semelhantes à gota. A análise de uma mãe grávida e de um feto para os níveis de expressão de mRNA do HPRT1 revelará se a mãe é portadora e se o feto irá provavelmente desenvolver a síndrome de Lesch-Nyhan. Detecção do cancro Os cientistas estão a trabalhar em formas de utilizar RT-PCR na detecção do cancro para ajudar a melhorar o prognóstico, e monitorizar a resposta à terapia.

As células tumorais circulantes produzem transcrições únicas de mRNA, dependendo do tipo de cancro. O objectivo é determinar que transcrições de mRNA servem como os melhores biomarcadores para um tipo particular de célula cancerígena e depois analisar os seus níveis de expressão com RT-PCR.

FOR AUTHOR USE ONLY

# **Bem-vindo à Biologia**

## **1-Biologia**

Biologia, estudo dos seres vivos e dos seus processos vitais. O campo lida com todos os aspectos físico-químicos da vida. A tendência moderna para a investigação interdisciplinar e a unificação do conhecimento científico e investigação de diferentes campos resultou numa sobreposição significativa do campo da biologia com outras disciplinas científicas. Os princípios modernos de outros campos - química, medicina e física, por exemplo - estão integrados com os da biologia em áreas como a bioquímica, biomedicina, e biofísica.

A biologia é subdividida em ramos separados por conveniência de estudo, embora todas as subdivisões estejam inter-relacionadas por princípios básicos. Assim, embora seja costume separar o estudo das plantas (botânica) do estudo dos animais (zoologia), e o estudo da estrutura dos organismos (morfologia) do estudo da função (fisiologia), todos os seres vivos partilham em comum certos fenómenos biológicos, por exemplo, vários meios de reprodução, divisão celular, e a transmissão de material genético.

A biologia é o estudo científico da vida. É uma ciência natural com um âmbito vasto mas com vários temas unificadores que a ligam como um campo único e coerente. Por exemplo, todos os

organismos são constituídos por células que processam informação hereditária codificada em genes, a qual pode ser transmitida às gerações futuras. Outro tema importante é a evolução, o que explica a unidade e diversidade da vida. Finalmente, todos os organismos necessitam de energia para se moverem, crescerem e reproduzirem, bem como para regularem o seu próprio ambiente interno.

Os biólogos são capazes de estudar a vida a vários níveis de organização. Desde a biologia molecular de uma célula à anatomia e fisiologia das plantas e animais, e à evolução das populações. Assim, existem múltiplas subdisciplinas dentro da biologia, cada uma definida pela natureza das suas questões de investigação e pelas ferramentas que utilizam. Tal como outros cientistas, os biólogos utilizam o método científico para fazer observações, colocar questões, gerar hipóteses, realizar experiências e formar conclusões sobre o mundo à sua volta.

A vida na Terra, que emergiu há mais de 3,7 mil milhões de anos, é imensamente diversificada. Os biólogos têm procurado estudar e classificar as várias formas de vida, desde organismos procarióticos, tais como arcaias e bactérias, até organismos eucarióticos, tais como protists, fungos, plantas e animais. Estes vários organismos contribuem para a biodiversidade de um ecossistema, onde desempenham papéis especializados na ciclagem de nutrientes e energia.

A biologia é frequentemente abordada com base em níveis que lidam com unidades fundamentais da vida. Ao nível da biologia molecular, por exemplo, a vida é considerada como uma manifestação de transformações químicas e energéticas que ocorrem entre os muitos constituintes químicos que compõem um organismo. Como resultado do desenvolvimento de instrumentos e técnicas laboratoriais cada vez mais poderosos e precisos, é possível compreender e definir com grande precisão não só a organização físico-química final (ultraestrutura) das moléculas em matéria viva, mas também a forma como a matéria viva se reproduz a nível molecular. Especialmente crucial para esses avanços foi a ascensão da genómica no final do século XX e início do século XXI.

A biologia celular é o estudo das células, as unidades fundamentais de estrutura e função nos organismos vivos. As células foram observadas pela primeira vez no século XVII, quando o microscópio composto foi inventado. Antes dessa época, o organismo individual era estudado como um todo num campo conhecido como biologia do organismo; essa área de investigação continua a ser uma componente importante das ciências biológicas. A biologia populacional trata de grupos ou populações de organismos que habitam uma determinada área ou região. A esse nível estão incluídos estudos sobre os papéis que tipos específicos de plantas e animais desempenham nas complexas e auto-

perpetuantes inter-relações que existem entre o mundo vivo e o não vivo, bem como estudos do construído, em controlos que mantêm essas relações naturalmente. Aqueles níveis amplamente baseados - moléculas, células, organismos inteiros e populações - podem ser subdivididos para estudo, dando origem a especializações como morfologia, taxonomia, biofísica, bioquímica, genética, epigenética, e ecologia. Um campo da biologia pode estar especialmente preocupado com a investigação de um tipo de ser vivo, por exemplo, o estudo de aves em ornitologia, o estudo de peixes em ictiologia, ou o estudo de microrganismos em microbiologia.

## **Etimologia**

A biologia deriva das palavras gregas antigas de βίος bíos romanizado que significa 'vida' e -λογία; romanizado -logía que significa 'ramo de estudo' ou 'falar'. Estas combinações fazem com que a palavra grega βιολογία romanized biología signifique 'biologia'. Apesar disto, o termo βιολογία como um todo não existia no grego antigo. O primeiro a tomá-lo emprestado foi o inglês e o francês (biologie). Historicamente havia outro termo para biologia em inglês, lifelore; é raramente utilizado hoje em dia.

A forma latina do termo apareceu pela primeira vez em 1736 quando o cientista sueco Carl Linnaeus (Carl von Linné) usou biólogos na sua Bibliotheca Botanica. Foi novamente utilizado em

1766 numa obra intitulada *Philosophiae naturalis sive physicae: tomus III*, geólogo contínuo, biólogo, *phytologian generalis*, de Michael Christoph Hanov, discípulo de Christian Wolff. O primeiro uso alemão, *Biologie*, foi numa tradução de 1771 da obra de Linnaeus. Em 1797, Theodor Georg August Roose utilizou o termo no prefácio de um livro, *Grundzüge der Lehre van der Lebenskraft*. Karl Friedrich Burdach usou o termo em 1800 num sentido mais restrito do estudo do ser humano numa perspectiva morfológica, fisiológica e psicológica (*Propädeutik zum Studien der gesammten Heilkunst*). O termo entrou na sua utilização moderna com o tratado de seis volumes *Biologie, oder Philosophie der lebenden Natur* (1802-22) de Gottfried Reinhold Treviranus, que anunciou.

## **História**

As primeiras raízes da ciência, que incluíam a medicina, podem ser traçadas até ao antigo Egipto e à Mesopotâmia, por volta de 3000 a 1200 a.C. As suas contribuições mais tarde entraram e moldaram a filosofia natural grega da antiguidade clássica. Filósofos gregos antigos, como Aristóteles (384-322 a.C.) contribuíram extensivamente para o desenvolvimento do conhecimento biológico. As suas obras como *History of Animals* foram especialmente importantes porque revelaram as suas inclinações naturalistas, e mais tarde obras mais empíricas que se centraram na causação biológica e na diversidade da vida. O

sucessor de Aristóteles no Liceu, Theophrastus, escreveu uma série de livros sobre botânica que sobreviveram como a contribuição mais importante da antiguidade para as ciências vegetais, mesmo na Idade Média. Estudiosos do mundo islâmico medieval que escreveram sobre biologia incluíram al-Jahiz (781-869), Al-Dīnawarī (828-896), que escreveu sobre botânica e Rhazes (865-925), que escreveu sobre anatomia e fisiologia. A medicina foi especialmente bem estudada por estudiosos islâmicos que trabalham nas tradições filosóficas gregas, enquanto que a história natural se baseou fortemente no pensamento aristotélico, especialmente na manutenção de uma hierarquia fixa da vida.

A biologia começou a desenvolver-se e a crescer rapidamente com a dramática melhoria do microscópio de Anton van Leeuwenhoek. Foi então que os estudiosos descobriram espermatozóides, bactérias, infusórios e a diversidade da vida microscópica. As investigações de Jan Swammerdam levaram a um novo interesse pela entomologia e ajudaram a desenvolver as técnicas básicas de dissecação e coloração microscópica.

Os avanços na microscopia também tiveram um profundo impacto no pensamento biológico. No início do século XIX, um certo número de biólogos apontou para a importância central da célula. Então, em 1838, Schleiden e Schwann começaram a promover as ideias agora universais que incluem:

- (1) A unidade básica dos organismos é a célula.

(2) Que as células individuais têm todas as características da vida, embora se oponham à ideia de que.

(3) Todas as células provêm da divisão de outras células. Graças ao trabalho de Robert Remak e Rudolf Virchow, porém, nos anos 1860, a maioria dos biólogos aceitou os três princípios do que veio a ser conhecido como teoria celular.

Entretanto, a taxonomia e a classificação tornaram-se o foco dos historiadores naturais. Carl Linnaeus publicou uma taxonomia básica para o mundo natural em 1735 (cujas variações têm sido utilizadas desde então), e na década de 1750 introduziu nomes científicos para todas as suas espécies. Georges-Louis Leclerc, Comte de Buffon, tratou as espécies como categorias artificiais e as formas vivas como maleáveis - sugerindo mesmo a possibilidade de descendência comum. Embora ele fosse contra a evolução, Buffon é uma figura chave na história do pensamento evolutivo; o seu trabalho influenciou as teorias evolutivas tanto de Lamarck como de Darwin.



**Figura (1): Em 1842, Charles Darwin escreveu o seu primeiro esboço de *On the Origin of Species* (Sobre a Origem das Espécies).**

O pensamento evolucionário sério teve origem nas obras de Jean-Baptiste Lamarck, que foi o primeiro a apresentar uma teoria coerente da evolução. Ele afirmou que a evolução era o resultado do stress ambiental sobre as propriedades dos animais, o que significa que quanto mais frequente e rigorosamente um órgão fosse utilizado, mais complexo e eficiente se tornaria, adaptando assim o animal ao seu ambiente. Lamarck acreditava que estas características adquiridas poderiam então ser transmitidas à prole do animal, que as desenvolveria e aperfeiçoaria ainda mais. Contudo, foi o naturalista britânico Charles Darwin, combinando a abordagem biogeográfica de Humboldt, a geologia uniformitária de Lyell, os escritos de Malthus sobre o crescimento populacional, e os seus próprios conhecimentos morfológicos e observações

naturais extensivas, que forjou uma teoria evolutiva mais bem sucedida baseada na selecção natural; raciocínios e provas semelhantes levaram Alfred Russel Wallace a chegar independentemente às mesmas conclusões. A teoria da evolução por selecção natural de Darwin espalhou-se rapidamente pela comunidade científica e rapidamente se tornou um axioma central da ciência da biologia em rápido desenvolvimento.

A base da genética moderna começou com o trabalho de Gregor Mendel, que apresentou o seu trabalho, "Versuche über Pflanzenhybriden" ("Experiments on Plant Hybridization"), em 1865,<sup>[30]</sup> que delineou os princípios da herança biológica, servindo como base para a genética moderna. Contudo, o significado do seu trabalho só se concretizou no início do século XX, quando a evolução se tornou uma teoria unificada, uma vez que a síntese moderna reconciliou a evolução darwiniana com a genética clássica. Nos anos 40 e início dos anos 50, uma série de experiências de Alfred Hershey e Martha Chase apontaram o ADN como o componente dos cromossomas que continham as unidades portadoras de características que se tinham tornado conhecidas como genes. Um enfoque em novos tipos de organismos modelo, tais como vírus e bactérias, juntamente com a descoberta da estrutura de dupla camada de ADN por James Watson e Francis Crick em 1953, marcou a transição para a era da genética molecular. Desde a década de 1950 até aos nossos dias, a biologia

tem sido vastamente alargada no domínio molecular. O código genético foi rachado por Har Gobind Khorana, Robert W. Holley e Marshall Warren Nirenberg, depois de se ter entendido que o ADN continha códonos. Finalmente, o Projecto Genoma Humano foi lançado em 1990 com o objectivo de mapear o genoma humano geral. Este projecto foi essencialmente concluído em 2003, estando ainda a ser publicadas mais análises. O Projecto Genoma Humano foi o primeiro passo num esforço globalizado para incorporar o conhecimento acumulado da biologia numa definição funcional e molecular do corpo humano e dos corpos de outros organismos.

## **Conceitos básicos de biologia**

### **Princípios biológicos**

#### **Homeostasia**

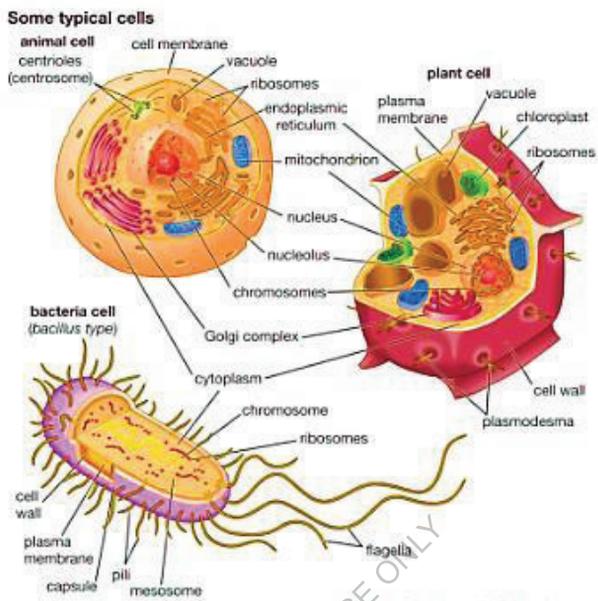
O conceito de homeostasia que os seres vivos mantêm um ambiente interno constante foi sugerido pela primeira vez no século XIX pelo fisiologista francês Claude Bernard, que afirmou que "todos os mecanismos vitais, por muito variados que sejam, têm apenas um objectivo: o de preservar constantemente as condições de vida".

Tal como concebido originalmente por Bernard, a homeostase applicava-se à luta de um único organismo para sobreviver. O

conceito foi posteriormente alargado para incluir qualquer sistema biológico desde a célula até à biosfera inteira, todas as áreas da Terra habitadas por seres vivos.

## **Unidade**

Todos os organismos vivos, independentemente da sua singularidade, têm certas características biológicas, químicas e físicas em comum. Todos, por exemplo, são compostos de unidades básicas conhecidas como células e das mesmas substâncias químicas, que, quando analisadas, apresentam semelhanças notáveis, mesmo em organismos tão díspares como as bactérias e os seres humanos. Além disso, uma vez que a acção de qualquer organismo é determinada pela forma como as suas células interagem e uma vez que todas as células interagem de forma muito semelhante, o funcionamento básico de todos os organismos é também semelhante.



**Figura (2): As células animais e as células vegetais contêm organelas ligadas à membrana, incluindo um núcleo distinto. Em contraste, as células bacterianas não contêm organelas.**

Não há apenas unidade de substância viva básica e de funcionamento, mas também unidade de origem de todos os seres vivos. De acordo com uma teoria proposta em 1855 pelo patologista alemão Rudolf Virchow, "todas as células vivas surgem de células vivas pré-existentes". Esta teoria parece ser verdadeira para todos os seres vivos na actualidade, nas condições ambientais existentes. Se, no entanto, a vida teve origem na Terra mais de uma vez no passado, o facto de todos os organismos terem a mesma

estrutura básica, composição e função parece indicar que apenas um tipo original foi bem sucedido.

Uma origem comum da vida explicaria porque é que no ser humano ou nas bactérias e em todas as formas de vida intermédias, a mesma substância química, o ácido desoxirribonucleico (ADN), sob a forma de genes explica a capacidade de toda a matéria viva se replicar exactamente e de transmitir informação genética dos pais para os descendentes. Além disso, os mecanismos para essa transmissão seguem um padrão que é o mesmo em todos os organismos.

Sempre que ocorre uma mudança num gene (uma mutação), há uma mudança de algum tipo no organismo que contém o gene. É este fenómeno universal que dá origem às diferenças (variações) nas populações de organismos a partir dos quais a natureza selecciona para sobreviver aqueles que são mais capazes de lidar com as condições em mudança no ambiente.

## **Evolução**

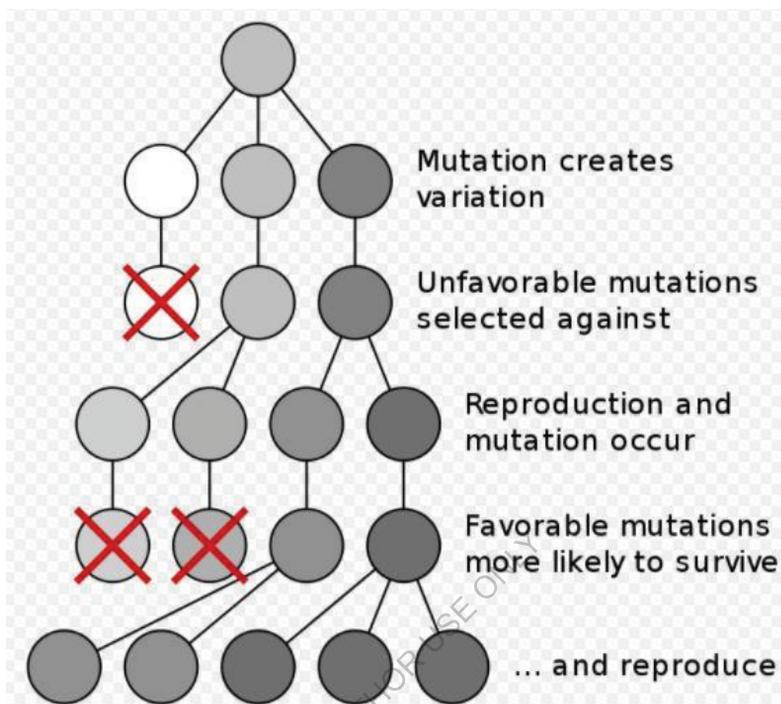
Um conceito organizador central em biologia é que a vida muda e desenvolve-se através da evolução, que é a mudança nas características hereditárias das populações ao longo de gerações sucessivas. A evolução é agora utilizada para explicar as grandes

variações da vida na Terra. O termo *evolução* foi introduzido no léxico científico por Jean-Baptiste de Lamarck em 1809 e cinquenta anos mais tarde Charles Darwin e Alfred Russel Wallace formularam a teoria da evolução por selecção natural. De acordo com esta teoria, os indivíduos diferem uns dos outros no que diz respeito às suas características hereditárias, resultando em diferentes taxas de sobrevivência e reprodução. Como resultado, os traços que se adaptam melhor ao seu ambiente são mais susceptíveis de serem transmitidos às gerações seguintes. Darwin não tinha conhecimento do trabalho de Mendel em matéria de herança e por isso o mecanismo exacto da herança subjacente à selecção natural não foi bem compreendido até ao início do século XX, quando a síntese moderna reconciliou a evolução darwiniana com a genética clássica, que estabeleceu uma perspectiva neo-darwiniana de evolução por selecção natural. Esta perspectiva sustenta que a evolução ocorre quando há mudanças nas frequências dos alelos dentro de uma população de organismos inter cruzados. Na ausência de qualquer processo evolutivo que actue sobre uma grande população de acasalamentos aleatórios, as frequências alélicas permanecerão constantes ao longo das gerações, tal como descrito pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Outro processo que impulsiona a evolução é a deriva genética, que são as flutuações aleatórias das frequências dos alelos dentro de uma população de uma geração para a seguinte. Quando as

forças selectivas estão ausentes ou relativamente fracas, as frequências dos alelos são igualmente susceptíveis de **derivar** para cima ou para baixo em cada geração sucessiva porque os alelos estão sujeitos a erro de amostragem. Esta deriva cessa quando um alelo acaba por se fixar, quer desaparecendo da população, quer substituindo inteiramente os outros alelos. A deriva genética pode portanto eliminar alguns alelos de uma população devido apenas ao acaso.

Na sua teoria da selecção natural, que é discutida mais tarde em maior detalhe, Charles Darwin sugeriu que a "sobrevivência do mais apto" era a base da evolução orgânica (a mudança dos seres vivos com o tempo). A própria evolução é um fenómeno biológico comum a todos os seres vivos, ainda que tenha levado às suas diferenças. As provas para apoiar a teoria da evolução vieram principalmente do registo fóssil, de estudos comparativos de estrutura e função, de estudos de desenvolvimento embriológico e de estudos de ADN e RNA (ácido ribonucleico).



**Figura (3):** Variação das criaturas mutantes.

## Diversidade

Apesar das semelhanças básicas biológicas, químicas e físicas encontradas em todos os seres vivos, existe uma diversidade de vida não só entre e entre espécies, mas também dentro de cada população natural. O fenómeno da diversidade tem tido uma longa história de estudo porque muitas das variações que existem na natureza são visíveis à vista. O facto de os organismos terem

mudado durante a pré-história e de novas variações estarem em constante evolução pode ser verificado por registos paleontológicos, bem como por experiências de reprodução em laboratório. Muito depois de Darwin ter assumido que as variações existiam, os biólogos descobriram que elas são causadas por uma mudança no material genético (ADN). Essa alteração pode ser uma ligeira alteração na sequência dos constituintes do ADN (nucleótidos), uma alteração maior tal como uma alteração estrutural de um cromossoma, ou uma alteração completa do número de cromossomas. Em qualquer caso, uma alteração no material genético das células reprodutivas manifesta-se como algum tipo de alteração estrutural ou química na descendência. A consequência de tal mutação depende da interacção da descendência mutante com o seu ambiente.

Tem sido sugerido que a reprodução sexual se tornou o tipo de reprodução dominante entre organismos devido à sua vantagem inerente de variabilidade, que é o mecanismo que permite a uma espécie adaptar-se às condições em mudança. Novas variações estão potencialmente presentes nas diferenças genéticas, mas a predominância de uma variação num pool genético depende do número de descendentes que os mutantes ou variantes produzem (reprodução diferencial). É possível que uma novidade genética (nova variação) se propague no tempo a todos os membros de uma população, especialmente se a novidade aumentar as hipóteses de

sobrevivência da população no ambiente em que ela existe. Assim, quando uma espécie é introduzida num novo habitat, ou se adapta à mudança por selecção natural ou por algum outro mecanismo evolutivo, ou eventualmente morre. Porque cada novo habitat significa novas adaptações, as mudanças de habitat têm sido responsáveis pelos milhões de diferentes tipos de espécies e pela heterogeneidade dentro de cada espécie.

O número total de espécies animais e vegetais existentes está estimado entre cerca de 5 milhões e 10 milhões; cerca de 1,5 milhões dessas espécies foram descritas por cientistas. A utilização da classificação como meio de produzir algum tipo de ordem a partir do número impressionante de diferentes tipos de organismos apareceu já no livro do Génesis - com referências a gado, animais, aves, répteis, árvores, e assim por diante. A primeira tentativa científica de classificação, porém, é atribuída ao filósofo grego Aristóteles, que tentou estabelecer um sistema que indicasse a relação de todas as coisas entre si. Ele organizou tudo ao longo de uma escala, ou "escada da natureza", com coisas não vivas na base; as plantas foram colocadas abaixo dos animais, e a humanidade estava no topo. Outros esquemas que foram utilizados para agrupar espécies incluem grandes semelhanças anatómicas tais como asas ou barbatanas, que indicam uma relação natural e também semelhanças nas estruturas reprodutivas.

A taxonomia tem sido baseada em dois pressupostos principais: um é que uma construção corporal semelhante pode ser usada como critério para um agrupamento de classificação; o outro é que, para além das semelhanças estruturais, as relações evolutivas e moleculares entre organismos podem ser usadas como um meio para determinar a classificação.

### **Comportamento e inter-relações**

O estudo das relações dos seres vivos entre si e com o seu ambiente é conhecido como ecologia. Porque estas inter-relações são tão importantes para o bem-estar da Terra e porque podem ser gravemente perturbadas pelas actividades humanas, a ecologia tornou-se um ramo importante da biologia.

### **Continuidade**

Quer um organismo seja humano ou uma bactéria, a sua capacidade de reprodução é uma das características mais importantes da vida. Como a vida provém apenas da vida pré-existente, só através da reprodução é que as sucessivas gerações podem continuar a ter as propriedades de uma espécie.

### **O estudo da estrutura**

As coisas vivas são definidas em termos das actividades ou funções que faltam nas coisas não vivas. Os processos de vida de cada organismo são realizados por materiais específicos montados em estruturas definidas. Assim, um ser vivo pode ser definido como um sistema, ou estrutura, que se reproduz, muda com o seu ambiente ao longo de um período de tempo, e mantém a sua individualidade através de um metabolismo constante e contínuo.

### **Células e seus constituintes**

Os biólogos dependiam em tempos do microscópio de luz para estudar a morfologia das células encontradas nas plantas e animais superiores. O funcionamento das células em organismos unicelulares e multicelulares foi então postulado a partir da observação da estrutura; a descoberta dos cloroplastídeos na célula, por exemplo, levou à investigação do processo de fotossíntese. Com a invenção do microscópio electrónico, a organização fina dos plastídeos pôde ser utilizada para estudos quantitativos adicionais das diferentes partes desse processo.

As análises qualitativas e quantitativas em biologia utilizam uma variedade de técnicas e abordagens para identificar e estimar os níveis de ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, e outros constituintes químicos das células e tecidos. Muitas dessas técnicas fazem uso de anticorpos ou sondas que se ligam a moléculas

específicas dentro das células e que são marcadas com um corante químico, geralmente fluorescente, um isótopo radioactivo, ou uma mancha biológica, permitindo assim ou melhorando a visualização microscópica ou a detecção das moléculas de interesse.



**Figura (4): Células e seus constituintes**

### ***Yersinia enterocolitica***

Fotomicrografia da coloração de Gram de *Yersinia enterocolitica*, o agente causador da yersiniosis.

Os rótulos químicos são meios poderosos através dos quais os biólogos podem identificar, localizar, ou rastrear substâncias em matéria viva. Alguns exemplos de ensaios amplamente utilizados que incorporam rótulos incluem a coloração de Gram, que é

utilizada para a identificação e caracterização de bactérias; hibridação fluorescente in situ, que é utilizada para a detecção de sequências genéticas específicas em cromossomas e ensaios de luciferase que medem a bioluminescência produzida a partir de reacções de luciferina-luciferase, permitindo a quantificação de uma vasta gama de moléculas.

## **Tecidos e órgãos**

Os primeiros biólogos viam o seu trabalho como um estudo do organismo. O organismo, então considerado a unidade fundamental da vida, é ainda a principal preocupação de alguns biólogos modernos, e compreender como os organismos mantêm o seu ambiente interno continua a ser uma parte importante da investigação biológica. Para melhor compreender a fisiologia dos organismos, os investigadores estudam os tecidos e órgãos dos quais os organismos são compostos. A chave para esse trabalho é a capacidade de manter e desenvolver células in vitro ("em vidro"), também conhecida como cultura de tecidos.

Algumas das primeiras tentativas de cultura de tecidos foram feitas no final do século XIX. Em 1885, o zoólogo alemão Wilhelm Roux manteve tecido de um embrião de pinto numa solução salina. O primeiro grande avanço na cultura de tecidos, contudo, veio em 1907 com o crescimento de processos de células nervosas de rã

pelo zoólogo americano Ross G. Harrison. Vários anos mais tarde, os investigadores franceses Alexis Carrel e Montrose Burrows refinaram os métodos de Harrison e introduziram o termo *cultura de tecidos*. Utilizando técnicas laboratoriais rigorosas, os trabalhadores conseguiram manter as células e tecidos vivos em condições de cultura durante longos períodos de tempo. As técnicas para manter os órgãos vivos em preparação para transplantes derivam de tais experiências.

Os avanços na cultura de tecidos têm permitido inúmeras descobertas em biologia. Por exemplo, muitas experiências têm sido dirigidas para uma compreensão mais profunda da diferenciação biológica, particularmente dos factores que controlam a diferenciação. Crucial a esses estudos foi o desenvolvimento, no final do século XX, de métodos de cultura de tecidos que permitiram o crescimento de células estaminais embrionárias de mamíferos e, em última análise, células estaminais embrionárias humanas em placas de cultura.

## **A história da biologia**

Há momentos na história de todas as ciências em que se fazem progressos notáveis em períodos de tempo relativamente curtos. Tais saltos de conhecimento resultam em grande parte de dois factores: um é a presença de uma mente criativa, suficientemente

perceptiva e original para descartar ideias até agora aceites e formular novas hipóteses, o segundo é a capacidade tecnológica de testar as hipóteses através de experiências apropriadas. A mente mais original e inquiridora é severamente limitada sem as ferramentas adequadas para conduzir uma investigação; inversamente, o equipamento tecnológico mais sofisticado não pode, por si só, produzir conhecimentos sobre qualquer processo científico.

### **Saiba como o monge e botânico católico austríaco Gregor Mendel observou propriedades de hereditariedade**

Uma introdução aos estudos de hereditariedade do botânico austríaco, professor e prelado agostiniano Gregor Mendel.

Um exemplo da relação entre estes dois factores foi a descoberta da célula. Há centenas de anos que se especulava sobre a estrutura básica tanto de plantas como de animais. Contudo, só quando os instrumentos ópticos foram suficientemente desenvolvidos para revelar as células, foi possível formular uma hipótese geral, a teoria celular, que explicava satisfatoriamente como as plantas e os animais estão organizados. Do mesmo modo, o significado dos estudos de Gregor Mendel sobre o modo de herança na ervilha de jardim permaneceu negligenciado durante muitos anos até que os avanços tecnológicos tornaram possível a descoberta dos cromossomas e o papel que estes desempenham na divisão celular

e hereditariedade. Além disso, como resultado do desenvolvimento relativamente recente de instrumentos extremamente sofisticados, tais como o microscópio electrónico, a ultracentrifugadora, e as máquinas de sequenciamento automático de ADN, a biologia passou de uma ciência largamente descritiva - uma ciência preocupada com células e organismos inteiros - para uma disciplina que enfatiza cada vez mais os aspectos subcelulares e moleculares dos organismos e tenta equacionar a estrutura com a função a todos os níveis de organização biológica.

### **A herança inicial**

Embora não se saiba quando teve origem o estudo da biologia, os primeiros seres humanos devem ter tido algum conhecimento dos animais e plantas que os rodeavam. A sobrevivência humana dependia do reconhecimento preciso das plantas alimentares não venenosas e da compreensão dos hábitos dos predadores perigosos. Os registos arqueológicos indicam que mesmo antes do desenvolvimento da civilização, os seres humanos tinham domesticado praticamente todos os animais disponíveis e tinham desenvolvido um sistema agrícola suficientemente estável e eficiente para satisfazer as necessidades de um grande número de pessoas que viviam juntas em comunidades. É evidente, portanto, que grande parte da história da biologia é anterior à época em que a humanidade começou a escrever e a manter registos.

## Os primeiros registos biológicos

### Práticas biológicas entre assírios e babilónios

Grande parte da história mais antiga registada da biologia deriva de baixos-relevos assírios e babilónicos que mostram plantas cultivadas e de esculturas que representam medicina veterinária. Ilustrações em certas focas revelam que os babilónios tinham aprendido que a palmeira tâmara se reproduz sexualmente e que o pólen podia ser retirado da planta macho e utilizado para fertilizar as plantas fêmeas. Embora falte uma data precisa desses primeiros registos, um contrato comercial babilónico do período Hamurabi (c. 1800 A.C.) menciona a flor masculina da tamareira como um artigo de comércio, e as descrições da colheita de tâmaras remontam a cerca de 3500 A.C.

Outra fonte de informação relativa à extensão do conhecimento biológico destes povos primitivos foi a descoberta de vários papiros que pertencem a sujeitos médicos; uma, acredita-se que até 1600 A.C., contém descrições anatómicas; outra (c. 1500 A.C.) indica que a importância do coração tinha sido reconhecida. Porque esses documentos antigos, que continham misturas de factos e superstições, provavelmente resumiam conhecimentos então actuais, pode assumir-se que alguns dos seus conteúdos tinham sido conhecidos pelas gerações anteriores.

## Conhecimentos biológicos de egípcios, chineses e indianos

Papiros e artefactos encontrados em túmulos e pirâmides indicam que os egípcios também possuíam conhecimentos médicos consideráveis. As suas múmias bem conservadas demonstram que tinham um conhecimento profundo das propriedades conservantes das ervas necessárias para o embalsamamento; colares de plantas e baixos-relevos de várias fontes também revelam que os antigos egípcios estavam bem cientes do valor medicinal de certas plantas. Uma compilação egípcia conhecida como Ebers papyrus (c. 1550 A.C.) é um dos mais antigos textos médicos conhecidos.



**Figura (5): Conhecimento biológico de egípcios, chineses e indianos.**

### Ebers papiro

Receita Ebers papyrus para tratamento da asma.

Na China antiga, três imperadores míticos. Fu Xi, Shennong, e Huangdi, cujos supostos períodos governantes se estenderam desde o século 29 até ao século 27 A.C., foram considerados como possuidores de conhecimentos médicos. Segundo a lenda, Shennong descreveu os poderes terapêuticos de numerosas plantas medicinais e incluiu descrições de muitas plantas alimentares importantes, tais como a soja. O mais antigo registo escrito de medicina conhecido na China, contudo, é o *Huangdi neijing* (*O Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo*), que data do século III A.C. Para além da medicina, os antigos chineses possuíam conhecimentos de outras áreas da biologia. Por exemplo, não só utilizavam o bicho-da-seda *Bombyx mori* para produzir seda para comércio, mas também compreendiam o princípio do controlo biológico, empregando um tipo de insecto, uma formiga entomófaga (comedora de insectos), para destruir os insectos que se aborreciam nas árvores.

Já em 2500 A.C. o povo do noroeste da Índia tinha uma ciência da agricultura bem desenvolvida. As ruínas de Mohenjo-daro produziram sementes de trigo e cevada que eram cultivadas nessa altura. O painço, tâmaras, melões, e outras frutas e vegetais, assim como o algodão, eram conhecidos da civilização. No entanto, as plantas não eram apenas uma fonte de alimento. Um documento, que se crê datar do século VI A.C., descreveu a utilização de cerca

de 960 plantas medicinais e incluiu informação sobre temas como anatomia, fisiologia, patologia, e obstetrícia.

## **O mundo greco-romano**

Embora os babilônios, assírios, egípcios, chineses e indianos tivessem acumulado muita informação biológica, viviam num mundo que se crê ser dominado por demónios e espíritos imprevisíveis. Assim, indivíduos instruídos nessas primeiras culturas orientaram os seus estudos para uma compreensão do mundo sobrenatural, e não do natural. Os anatomistas, por exemplo, dissecavam animais não para obterem uma compreensão da sua estrutura mas para estudarem os seus órgãos a fim de preverem o futuro. Com a emergência da civilização grega, no entanto, essas atitudes místicas começaram a mudar. Por volta de 600 A.C. surgiu uma escola de filósofos gregos que acreditavam que cada acontecimento tinha uma causa e que uma causa particular produzia um efeito particular. Esse conceito, conhecido como causalidade, teve um efeito profundo na investigação científica subsequente. Além disso, esses filósofos assumiram a existência de uma "lei natural" que rege o universo e pode ser compreendida pelos seres humanos através do uso dos seus poderes de observação e dedução. Embora tenham estabelecido a ciência da biologia, a maior contribuição que os gregos deram à ciência foi a ideia do pensamento racional.

## Teorias sobre a humanidade e a origem da vida

Um dos primeiros filósofos gregos, Thales de Miletus (c. Século VII A.C.), sustentou que o universo continha uma força criativa a que chamou física, um dos primeiros progenitores do termo *física*, também postulou que o mundo e todos os seres vivos nele existentes eram feitos de água. Anaximander, um estudante de Tales, não aceitava a água como a única substância da qual os seres vivos derivavam; acreditava que, além da água, os seres vivos consistiam em terra e numa substância semelhante ao gás chamada *apeiron*, que podia ser dividida em quente e frio. Várias misturas desses materiais deram origem aos quatro elementos: terra, ar, fogo, e água. Embora tenha sido um dos primeiros a descrever a Terra como uma esfera e não como um plano plano plano, Anaximandro propôs que a vida surgiu espontaneamente na lama e que os primeiros animais a emergir tinham sido peixes cobertos com uma pele espinhosa. Os descendentes desses peixes acabaram por deixar água e mudaram-se para terra seca, onde deram origem a outros animais por transmutação (a conversão de uma forma em outra). Assim, foi formulada uma teoria evolucionária precoce.

Em Crotona, no sul de Itália, onde uma importante escola de filosofia natural foi estabelecida por Pitágoras cerca de 500 A.C., um dos seus alunos, Alcmaeon, investigou a estrutura animal e descreveu a diferença entre artérias e veias, descobriu o nervo óptico, e reconheceu o cérebro como a sede do intelecto. Como

resultado dos seus estudos sobre o desenvolvimento do embrião, Alcmaeon pode ser considerado o fundador da embriologia.

Embora o médico grego Hipócrates, que criou uma escola de medicina na ilha do Egeu de Cos cerca de 400 A.C., não fosse um investigador no sentido de Alcmaeon, reconheceu através de observações de pacientes as complexas inter-relações envolvidas no corpo humano. Contemplava também a influência do ambiente na natureza humana e acreditava que os climas fortemente contrastantes tendiam a produzir um tipo de habitante poderoso, enquanto que mesmo os climas temperados eram mais propícios à indolência.



## **Hipócrates**

Hipócrates, busto sem data.

© *Photos.com/Thinkstock*

Hipócrates e os seus predecessores estavam preocupados com a questão filosófica central de como o cosmos e os seus habitantes

foram criados. Embora aceitassem a física como a força criadora, diferiam quanto à importância dos papéis desempenhados pela terra, ar, fogo, água, e outros elementos. Embora Anaximenes, por exemplo, que pode ter sido um estudante de Anaximandro, tenha aderido ao preceito então popular de que a vida tinha origem numa massa de lama, postulou que a força criativa real se encontrava no ar e que era influenciada pelo calor do Sol. Os membros da escola hipocrática também acreditavam que todos os corpos vivos eram compostos por sangue de quatro humores, bílis negra, catarro e bílis amarela - que supostamente tinham origem no coração, no baço, no cérebro e no fígado, respectivamente. Pensava-se que um desequilíbrio dos humores provocava um indivíduo a ser sanguíneo, melancólico, fleumático, ou cólico. Estas palavras persistiram na literatura médica durante séculos, uma prova da longa popularidade da ideia das influências humorais. Durante séculos acreditou-se também que um desequilíbrio nos humores era a causa de doenças, uma crença que resultou na prática comum da sangria para livrar o corpo de humores excessivos.

### **A descoberta de células**

Dos cinco microscopistas, Robert Hooke foi talvez o mais intelectualmente preeminente. Como curador de instrumentos na Royal Society of London, esteve em contacto com todos os novos

desenvolvimentos científicos e demonstrou interesse em assuntos tão díspares como o voo e a construção de relógios. Em 1665 Hooke publicou a sua *Micrographia*, que era principalmente uma revisão de uma série de observações que tinha feito enquanto seguia o desenvolvimento e aperfeiçoamento do microscópio. Hooke descreveu em pormenor a estrutura das penas, o ferrão de uma abelha, a rádula, ou "língua", dos moluscos, e o pé da mosca. Foi Hooke que cunhou a palavra *célula*; num desenho da estrutura microscópica da cortiça, mostrou paredes que rodeavam espaços vazios e referiu-se às estruturas como células. Descreveu estruturas semelhantes no tecido de outras árvores e plantas e discerniu que em alguns tecidos as células estavam cheias de um líquido enquanto noutros estavam vazias. Por conseguinte, supôs que a função das células era transportar substâncias através da planta.

Embora o trabalho de qualquer um dos microscopistas clássicos pareça carecer de um objectivo definido, é preciso lembrar que estes homens encarnaram o conceito de que a observação e a experiência eram de primordial importância, que as meras especulações hipotéticas e filosóficas não eram suficientes. É notável que tão poucos homens, trabalhando como indivíduos totalmente isolados uns dos outros, deveriam ter registado tantas observações de tamanha importância fundamental. O grande significado do seu trabalho foi que revelou, pela primeira vez, um

mundo em que os organismos vivos apresentam uma complexidade quase incrível.

O trabalho com o microscópio composto definiu durante quase 200 anos, principalmente porque as lentes iniciais tendiam a quebrar a luz branca nas suas partes constituintes. Este problema técnico não foi resolvido até à invenção das lentes acromáticas, que foram introduzidas por volta de 1830. Em 1878 foi produzido um microscópio composto acromático moderno a partir do desenho do físico alemão Ernst Abbe. Abbe concebeu subsequentemente um sistema de iluminação de subestágio que, juntamente com a introdução de um novo condensador de subestágio, abriu o caminho para as descobertas biológicas daquela época.

### **O desenvolvimento dos princípios taxonómicos**

Em 1687 o matemático, físico e astrónomo inglês Isaac Newton publicou a sua grande obra *Principia*, na qual descreveu o universo como fixo, com a Terra e outros corpos celestes a moverem-se harmoniosamente de acordo com as leis matemáticas. Essa abordagem de sistematização e classificação foi dominar a biologia nos séculos XVII e XVIII. Uma razão era que os "pais da botânica" do século XVI se tinham contentado apenas em descrever e desenhar plantas, reunindo um número enorme e diversificado que continuava a aumentar à medida que as explorações de países

estrangeiros tornavam evidente que cada país tinha as suas próprias plantas e animais nativos.

Aristóteles iniciou o processo de classificação quando utilizou o modo de reprodução e habitat para distinguir grupos de animais. De facto, as palavras *género* e *espécie* são traduções dos *géneros* e *eidos* gregos utilizados por Aristóteles. O botânico suíço Bauhin tinha introduzido um sistema binomial de classificação, utilizando um nome genérico e um nome específico. Contudo, a maioria dos sistemas de classificação propostos antes do século XVII eram confusos e insatisfatórios.

### **A utilização de estrutura para classificação de organismos**

Dois sistemáticos dos séculos XVII e XVIII foram o naturalista inglês John Ray e a naturalista e exploradora sueca Carolus Linnaeus. Ray, que estudou em Cambridge, estava particularmente interessado no trabalho dos antigos compiladores de ervas, especialmente aqueles que tinham tentado formular alguns meios de classificação. Reconhecendo a necessidade de um sistema de classificação que se aplicasse tanto a plantas como a animais, Ray empregou nos seus esquemas de classificação descrições extremamente precisas para géneros e espécies. Ao basear o seu sistema em estruturas, tais como a disposição dos dedos dos pés e dentes nos animais, em vez de cor ou habitat, Ray introduziu um conceito novo e muito importante para a biologia taxonómica.

## **Reorganização de grupos de organismos**

Antes de Linnaeus, a maioria dos taxonomistas começaram os seus sistemas de classificação dividindo todos os organismos conhecidos em grandes grupos e depois subdividindo-os em grupos progressivamente mais pequenos. Ao contrário dos seus predecessores, Linnaeus começou com as espécies, organizando-as em grupos ou géneros maiores, e depois organizando géneros análogos para formar famílias e famílias relacionadas para formar ordens e classes. Provavelmente utilizando o trabalho anterior de Grew e outros, Linnaeus escolheu a estrutura dos órgãos reprodutivos da flor como base para agrupar as plantas superiores. Assim, ele distinguiu entre plantas com flores e sementes reais (fanerógamas) e as que não têm flores e sementes reais (criptogâmicas), subdividindo as primeiras em formas hermafroditas (bissexuais) e unissexuais. Para os animais, seguindo o trabalho de Ray, Linnaeus baseou-se nos dentes e dedos dos pés como características básicas dos mamíferos; utilizou a forma do bico como base para a classificação das aves. Tendo demonstrado que um sistema de classificação binomial baseado em descrições concisas e precisas poderia ser utilizado para o agrupamento de organismos, Linnaeus estabeleceu a biologia taxonómica como uma disciplina.

Desenvolvimentos posteriores na classificação foram iniciados pelos biólogos franceses Comte de Buffon, Jean-Baptiste Lamarck, e Georges Cuvier, todos eles deram contribuições duradouras para a ciência biológica, particularmente em estudos comparativos. Os sistemáticos posteriores interessaram-se principalmente pelas relações entre os animais e esforçaram-se por explicar não só as suas semelhanças mas também as suas diferenças em termos gerais que abrangem, além da estrutura, composição, função, genética, evolução, e ecologia.

### **O desenvolvimento de estudos biológicos comparativos**

Uma vez dissipado o opprobrium ligado à dissecação dos corpos humanos no século XVI, os anatomistas orientaram os seus esforços para uma melhor compreensão da estrutura humana. Ao fazê-lo, ignoraram geralmente outros animais, pelo menos até à última parte do século XVII, quando os biólogos começaram a aperceber-se de que importantes conhecimentos podiam ser obtidos através de estudos comparativos de todos os animais, incluindo os humanos. Um dos primeiros destes anatomistas foi o médico inglês Edward Tyson, que estudou a anatomia de um chimpanzé imaturo em detalhe e a comparou com a de um humano. Ao fazer mais comparações entre o chimpanzé e outros primatas, Tyson reconheceu claramente pontos de semelhança entre esses animais e os humanos. Isto não só foi uma grande contribuição para

a antropologia física, como foi também uma indicação, quase dois séculos antes de Darwin, da existência de relações entre os humanos e outros primatas.

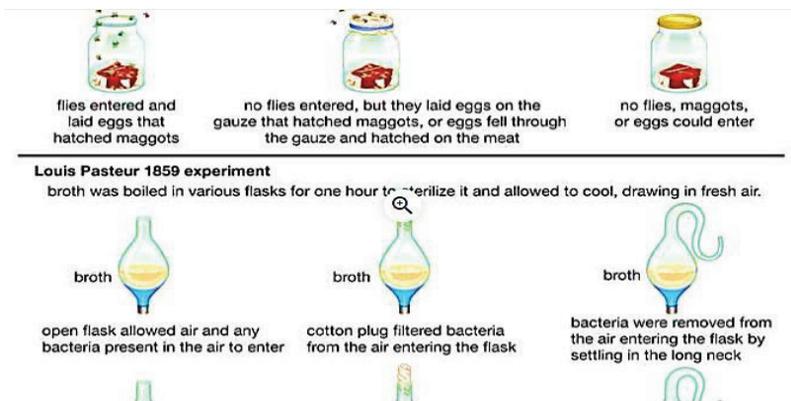
Entre aqueles que deram o seu maior ímpeto aos estudos comparativos, encontrava-se Georges Cuvier, que utilizou grandes colecções de espécimes biológicos que lhe foram enviados de todo o mundo para elaborar uma organização sistemática do reino animal. Para além de estabelecer uma ligação entre anatomia sistemática e comparativa, ele acreditava que existia uma "correlação de partes" segundo a qual um determinado tipo de estrutura, por exemplo, as penas estão relacionadas com uma determinada formação anatómica, por exemplo, uma asa, que por sua vez está relacionada com outras formações específicas, por exemplo, a clavícula e assim por diante. Por outras palavras, sentiu que uma grande quantidade de informação anatómica poderia ser deduzida sobre um organismo, mesmo que o espécime inteiro não estivesse disponível. Essa percepção deveria ser de grande importância prática no estudo dos fósseis, no qual Cuvier desempenhou um papel preponderante. De facto, a publicação de 1812 de Cuvier's *Recherches sur les ossements fossiles de quadrupèdes* (traduzida como *Research on Fossil Bones* em 1835) lançou as bases para a ciência da paleontologia. Mas a fim de conciliar as suas descobertas científicas com as suas crenças religiosas pessoais, Cuvier postulou uma série de eventos

catastróficos que poderiam explicar tanto a presença de fósseis como a imutabilidade das espécies existentes.

## **O estudo da origem da vida**

### **Geração espontânea**

Se uma espécie só pode desenvolver-se a partir de uma espécie pré-existente, então como é que a vida se originou? Entre as muitas ideias filosóficas e religiosas avançadas para responder a essa pergunta, uma das mais populares foi a teoria da geração espontânea, segundo a qual, como já foi mencionado, os organismos vivos poderiam ter origem em matéria não viva. Com o ritmo crescente das descobertas durante os séculos XVII e XVIII, contudo, os investigadores começaram a examinar mais criticamente a crença grega de que as moscas e outros pequenos animais surgiram da lama no fundo dos riachos e lagoas por geração espontânea. Depois, quando Harvey anunciou o seu ditado biológico *ex ovo omnia* ("tudo vem do ovo"), parecia que tinha resolvido o problema, pelo menos na medida em que dizia respeito às plantas em flor e aos animais superiores, todos os quais se desenvolvem a partir de um ovo. Mas a subsequente descoberta inquietante de Leeuwenhoek de cápsulas animais demonstrou a existência de um mundo densamente povoado mas anteriormente invisível de organismos que tinha de ser explicado.



**Figura (6):**A hipótese de geração espontânea postulava que os organismos vivos se desenvolvem a partir de matéria não viva. Esta ideia foi refutada após experiências conduzidas em 1668 pelo médico italiano Francesco Redi e em 1859 pelo químico e microbiologista francês Louis Pasteur.

O médico e poeta italiano Francesco Redi foi um dos primeiros a questionar a origem espontânea dos seres vivos. Tendo observado o desenvolvimento de larvas e moscas em carne em decomposição, Redi, em 1668, concebeu uma série de experiências, todas apontando para a mesma conclusão: se as moscas são excluídas da carne em decomposição, as larvas não se desenvolvem. Na carne exposta ao ar, no entanto, os ovos postos pelas moscas desenvolvem-se em larvas. No entanto, em 1745, o apoio à geração espontânea foi renovado com a publicação de *An Account of Some New Microscopical Discoveries* pelo naturalista inglês e divino católico romano John Turberville Needham. Needham descobriu que um grande número de organismos se desenvolveu

subsequentemente em infusões preparadas de muitas substâncias diferentes que tinham sido expostas a calor intenso em tubos selados durante 30 minutos. Assumindo que tal tratamento térmico deve ter matado quaisquer organismos anteriores, Needham explicou a presença da nova população com base na geração espontânea. As experiências pareciam irrefutáveis até que o fisiologista italiano Lazzaro Spallanzani as repetiu e obteve resultados contraditórios. Ele publicou as suas descobertas por volta de 1775, afirmando que Needham não tinha aquecido os seus tubos o tempo suficiente, nem os tinha selado de uma forma satisfatória. Embora os resultados de Spallanzani devessem ter sido convincentes, Needham teve o apoio do influente naturalista francês Buffon; por conseguinte, a questão da geração espontânea permaneceu por resolver.

### **A morte da geração espontânea**

Depois de várias outras investigações não terem conseguido resolver o problema, a Academia Francesa de Ciências ofereceu um prémio de investigação que "lançaria uma nova luz sobre a questão da geração espontânea". Em resposta a esse desafio, Louis Pasteur, que na altura era químico, submeteu frascos contendo uma solução de levedura açucarada a uma variedade de condições. Pasteur foi capaz de demonstrar conclusivamente que quaisquer microrganismos que se desenvolvessem em meios adequados provinham de microrganismos no ar, não do próprio ar, como

Needham tinha sugerido. O apoio às descobertas de Pasteur veio em 1876 do físico inglês John Tyndall, que concebeu um aparelho para demonstrar que o ar tinha a capacidade de transportar partículas em suspensão. Como tal matéria no ar reflecte a luz quando o ar é iluminado em condições especiais, o aparelho de Tyndall podia ser utilizado para indicar quando o ar era puro. Tyndall descobriu que não eram produzidos organismos quando o ar puro era introduzido em meios capazes de suportar o crescimento de microrganismos. Foram esses resultados, juntamente com as descobertas de Pasteur, que puseram um fim à doutrina da geração espontânea. Quando mais tarde Pasteur mostrou que os microrganismos progenitores geram apenas a sua própria espécie, ele estabeleceu assim o estudo da microbiologia. Além disso, ele não só conseguiu convencer o mundo científico de que os micróbios são seres vivos que provêm de formas pré-existentes, mas também mostrou que são um componente imenso e variado do mundo orgânico, um conceito que deveria ter implicações importantes para a ciência da ecologia. Além disso, ao isolar várias espécies de bactérias e leveduras em diferentes meios químicos, Pasteur foi capaz de demonstrar que elas provocaram mudanças químicas de uma forma característica e previsível, dando assim uma contribuição única para o estudo da fermentação e para a bioquímica.

## O desenvolvimento da teoria celular

Embora os microscopistas do século XVII tivessem feito descrições detalhadas da estrutura vegetal e animal e embora Hooke tivesse cunhado o termo *célula* para descrever os compartimentos que tinha observado no tecido de cortiça, as suas observações careciam de uma unidade teórica subjacente. Só em 1838 é que o botânico alemão Matthias Jacob Schleiden, interessado na anatomia das plantas, declarou que "as plantas inferiores são todas constituídas por uma célula, enquanto as superiores são compostas por (muitas) células individuais". Quando o fisiologista alemão Theodor Schwann, amigo de Schleiden, alargou a teoria celular para incluir os animais, ele trouxe assim uma aproximação entre a botânica e a zoologia. A formação da teoria celular, todas as plantas e animais são constituídos por células marcou um grande avanço conceptual em biologia, e resultou numa atenção renovada aos processos vivos que prosseguem nas células.

Em 1846, depois de vários investigadores terem descrito o movimento de fluxo do citoplasma em células vegetais, o botânico alemão Hugo von Mohl cunhou a palavra *protoplasma* para designar a substância viva da célula. O conceito de protoplasma como a base física da vida levou ao desenvolvimento da fisiologia celular.

Uma outra extensão da teoria celular foi o desenvolvimento da patologia celular pelo cientista alemão Rudolf Virchow, que estabeleceu a relação entre eventos anormais no corpo e actividades celulares invulgares. O trabalho de Virchow deu uma nova direcção ao estudo da patologia e resultou em avanços na medicina.

A descrição detalhada da divisão celular foi feita pelo citólogo vegetal alemão Eduard Strasburger, que observou o processo mitótico nas células vegetais e demonstrou ainda que os núcleos surgem apenas de núcleos pré-existentes. O trabalho paralelo em mamíferos foi realizado pelo anatomista alemão Walther Flemming, que publicou as suas descobertas mais importantes em *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* ("Cell Substance, Nucleus and Cell Division") em 1882.

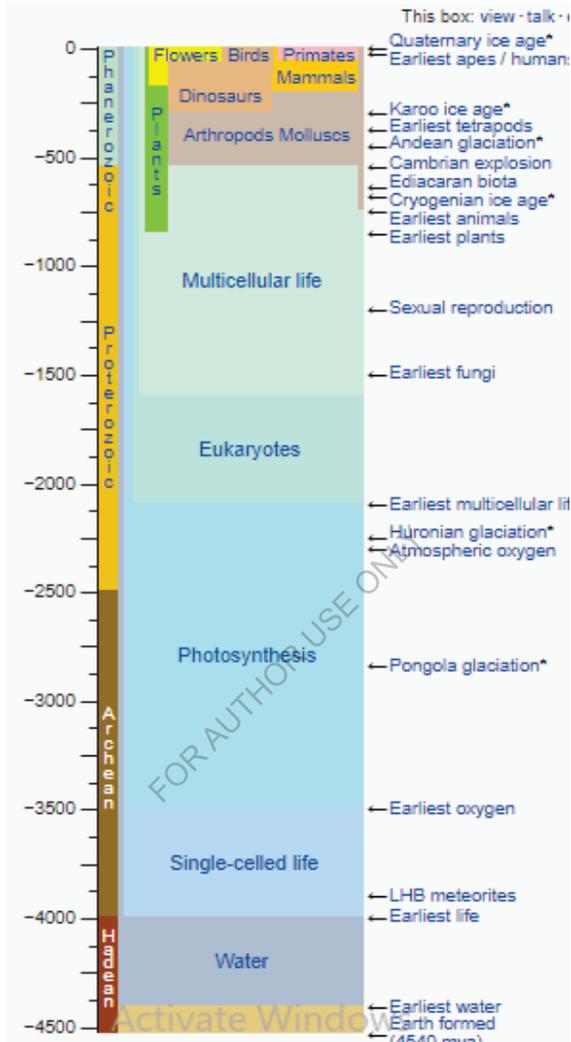


Figura (7): O desenvolvimento da teoria celular.

### A teoria da evolução

À medida que o conhecimento das formas vegetais e animais acumuladas durante os séculos XVI, XVII e XVIII, alguns biólogos começaram a especular sobre a ancestralidade desses organismos, embora a opinião predominante fosse a promulgada por Linnaeus, nomeadamente, a imutabilidade da espécie. Entre as primeiras especulações expressas durante o século XVIII, o médico britânico Erasmus Darwin (avô de Charles Darwin), concluiu que as espécies descendem de antepassados comuns e que existe uma luta pela existência entre os animais. O biólogo francês Jean-Baptiste Lamarck, entre os mais importantes evolucionistas do século XVIII, reconheceu o papel do isolamento na formação das espécies; ele também viu a unidade na natureza e concebeu a ideia da árvore evolucionária.

Uma teoria completa da evolução não foi, contudo, anunciada até à publicação, em 1859, de *On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (*Sobre a Origem das Espécies por Meios de Seleção Natural ou Preservação das Raças Favorecidas na Luta pela Vida*) de Charles Darwin. No seu livro Darwin declarou que todas as criaturas vivas se multiplicam tão rapidamente que se não fossem controladas, em breve sobrepovoariam o mundo. De acordo com Darwin, as verificações do tamanho da população são mantidas pela competição pelos meios de vida. Assim, se algum membro de uma espécie diferir de alguma forma que o torne mais

apto a sobreviver, então terá a vantagem de ser provável que a sua descendência se perpetue. O trabalho de Darwin reflecte a influência do economista britânico Thomas Robert Malthus, que em 1838 publicou um ensaio sobre a população, no qual alertava que se os seres humanos se multiplicarem mais rapidamente do que o seu abastecimento alimentar, a competição pela existência resultará na competição pela existência. Darwin foi também influenciado pelo geólogo britânico Charles Lyell, que percebeu pelos seus estudos de formações geológicas que a idade relativa dos depósitos podia ser estimada através da proporção de moluscos vivos e extintos. Mas foi só depois das suas viagens a bordo do *Beagle* (1831-36), durante as quais observou uma grande riqueza e diversidade da fauna insular, que Darwin começou a desenvolver a sua teoria da evolução. Alfred Russel Wallace tinha chegado a conclusões semelhantes às de Darwin na sequência dos seus estudos sobre plantas e animais no Arquipélago Malaio. Um breve artigo sobre este assunto enviado por Wallace a Darwin resultou finalmente na publicação das próprias teorias de Darwin.

Conceptualmente, a teoria era da maior importância, contabilizando como o fez para a formação de novas espécies. Após a descoberta subsequente da base cromossómica da herança e das leis da hereditariedade, pôde-se constatar que a selecção natural não envolve as alternativas bruscas de vida ou morte, mas resulta da sobrevivência diferencial das variantes. Actualmente, o

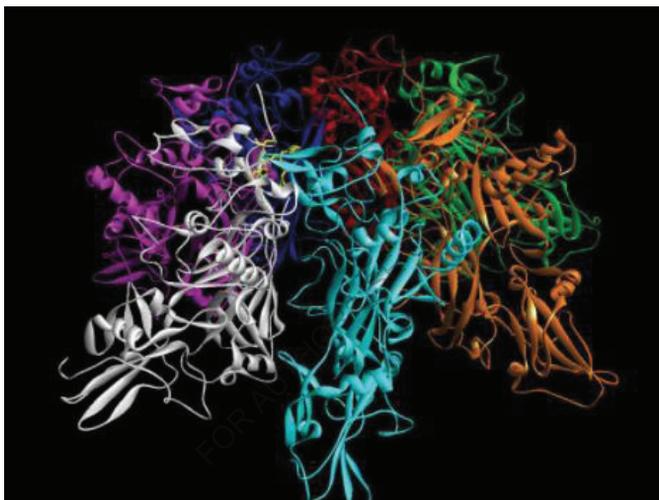
princípio universal da selecção natural, que é o conceito central da teoria de Darwin, está firmemente estabelecido.

### **Importantes desenvolvimentos conceptuais e tecnológicos**

Utilizando métodos modernos de investigação, tais como difracção de raios X e microscopia electrónica, para explorar níveis de organização celular para além do visível com um microscópio de luz, a ultraestrutura da célula, foram produzidos novos conceitos de função celular. Como resultado, o estudo da organização molecular da célula teve um tremendo impacto na biologia durante os séculos XX e XXI. Também levou directamente à convergência de muitas disciplinas científicas diferentes, a fim de adquirir uma melhor compreensão dos processos da vida.

Tecnologias como a sequenciação do ADN e a reacção em cadeia da polimerase também foram desenvolvidas, permitindo que os biólogos se aproximassem dos planos genéticos que dão origem aos organismos. As tecnologias de sequenciação de primeira geração surgiram na década de 1970 e foram seguidas várias décadas mais tarde pelas chamadas tecnologias de sequenciação de próxima geração, que eram superiores em velocidade e eficiência de custos. A sequenciação da próxima geração forneceu aos investigadores enormes quantidades de dados genéticos,

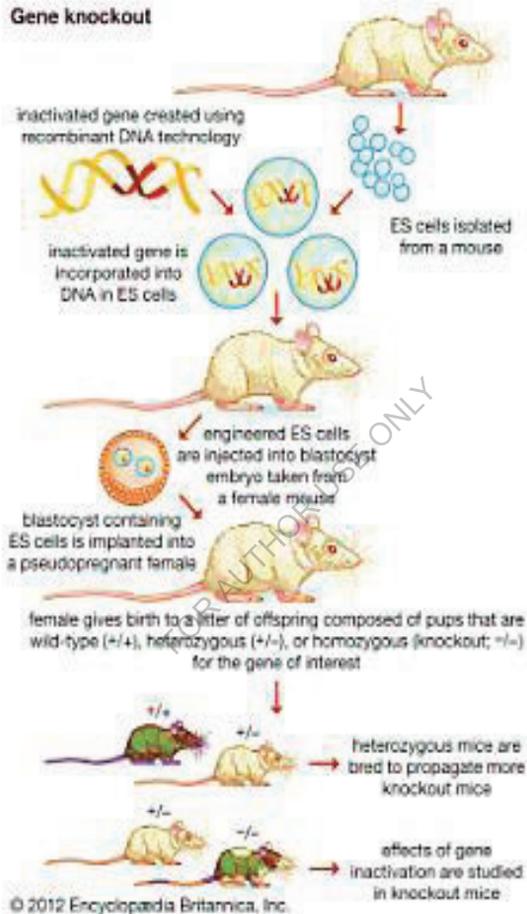
tipicamente gigabases em tamanho (1 gigabase = 1.000.000.000 de pares de bases de ADN). A bioinformática que associava dados biológicos com ferramentas e técnicas de análise, armazenamento e distribuição de dados, tornou-se uma parte cada vez mais importante dos estudos biológicos, particularmente aqueles que envolviam conjuntos muito grandes de dados genéticos.



**Figura (8): Importantes desenvolvimentos conceptuais e tecnológicos.**

Esta imagem computadorizada do antrax mostra as várias relações estruturais de sete unidades dentro da proteína e demonstra a interacção de uma droga (mostrada em amarelo) ligada à proteína para bloquear a chamada unidade de factor letal. A bioinformática desempenha um papel importante ao permitir aos cientistas prever

onde uma molécula de droga se irá ligar dentro de uma proteína, dadas as estruturas individuais das moléculas.



**Figura (9): Importante nos desenvolvimentos conceituais e tecnológicos do nocaute de genes.**

No knockout genético, um gene funcional é substituído por um gene inativado que é criado usando tecnologia de ADN recombinante. Quando um gene é "knock-out", o fenótipo mutante resultante (características observáveis) revela frequentemente a função biológica do gene.

Nos anos 90 e princípios dos anos 2000, os investigadores de todo o mundo reuniram-se cada vez mais em consórcios e outros grupos de colaboração para realizar grandes feitos em biologia. O primeiro grande sucesso desses esforços foi a sequenciação do genoma humano, que foi realizada através do Projecto Genoma Humano (HGP). O HGP teve início em 1990, apoiado pelo Departamento de Energia dos EUA e pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH). Os investigadores do NIH associaram-se mais tarde a Celera Genomics, uma empresa do sector privado, e o projecto foi concluído em 2003. Outros projectos de colaboração seguiram-se rapidamente, incluindo o Projecto Internacional HapMap, um resultado do HGP, e o Projecto 1000 Genomes, que se baseou em dados do esforço HapMap.

Os séculos XX e XXI também assistiram a grandes avanços em áreas da biologia que lidam com os ecossistemas, o ambiente e a conservação. No século XX, os cientistas perceberam que os seres humanos são tão dependentes dos recursos naturais da Terra como

os outros animais. Contudo, os humanos estavam a contribuir para a destruição progressiva do ambiente, em parte devido a um aumento da pressão populacional e a certos avanços tecnológicos. Os avanços da medicina, por exemplo, permitiram às pessoas viver mais tempo e resultaram numa queda dramática nas taxas de mortalidade (principalmente nos países desenvolvidos), contribuindo para um aumento explosivo da população humana. Os contaminantes químicos introduzidos no ambiente por processos de fabrico, pesticidas, emissões de automóveis, e outros meios, puseram seriamente em perigo todas as formas de vida. Assim, os biólogos começaram a prestar muito mais atenção às relações dos seres vivos entre si, bem como aos seus ambientes bióticos e abióticos.

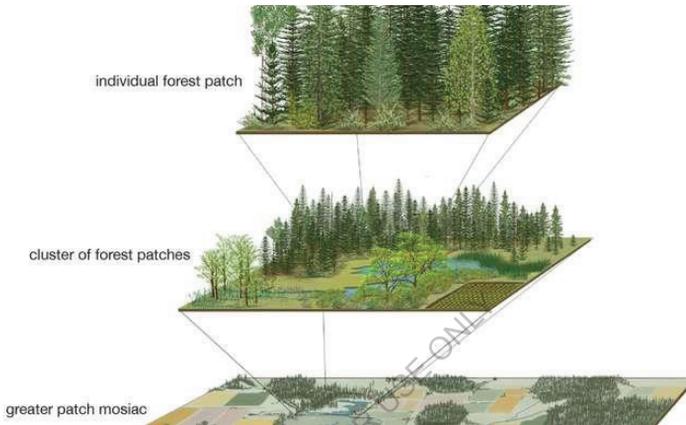
O crescente significado das alterações climáticas e o seu impacto nos ecossistemas alimentaram os avanços na ecologia, bem como o desenvolvimento de campos como a biologia da conservação e a genética da conservação. Como em quase todas as outras áreas da biologia, a biologia molecular veio a cumprir um papel importante nesses campos, com técnicas como a sequenciação de todo o genoma a serem utilizadas para recolher informações sobre a diversidade genética das populações de espécies ameaçadas e técnicas como a clonagem e a edição do genoma, aumentando a possibilidade de um dia ressuscitar espécies extintas (um processo conhecido como de-extinção). A informação sobre as sequências

de ADN de uma vasta gama de espécies também ajudou ao progresso na compreensão da evolução e da sistemática pelos cientistas (o estudo das relações evolutivas e a diversificação da vida).

### **Trabalho intradisciplinar e interdisciplinar**

No século XXI, existiam muitas categorias importantes nas ciências biológicas e, por conseguinte, numerosas especialidades dentro dos campos. A botânica, zoologia e microbiologia tratavam de tipos de organismos e das suas relações entre si. Tais disciplinas tinham sido há muito subdivididas em categorias mais especializadas, por exemplo, ictiologia, estudo de peixes, e algologia, estudo de algas. Disciplinas como a embriologia e fisiologia que tratavam do desenvolvimento e função de um organismo, foram ainda mais divididas de acordo com o tipo de organismo estudado, por exemplo, a embriologia invertebrada e a fisiologia dos mamíferos. Muitos desenvolvimentos em fisiologia e embriologia resultaram de estudos em biologia celular, biofísica, e bioquímica. Do mesmo modo, a investigação em fisiologia celular e citoquímica, juntamente com estudos ultra-estruturais, ajudou os cientistas a correlacionar a estrutura celular com a função. A ecologia, que se centrou nas relações entre os organismos e o seu ambiente, incluiu tanto as características físicas do ambiente como outros organismos que podem competir por

alimento e abrigo. A ênfase em diferentes ambientes e certas características dos organismos resultou na subdivisão do campo em várias especialidades, tais como a ecologia da água doce, a ecologia marinha e a ecologia populacional.



**Figura (10): Trabalho intradisciplinar e interdisciplinar.**

### **Escala em estudos ecológicos**

Uma mancha florestal aninhada dentro de um mosaico de paisagem.

Muitas áreas de estudo nas ciências biológicas atravessam as fronteiras que tradicionalmente separavam os vários ramos das ciências. Na biofísica, por exemplo, os investigadores aplicam os princípios e métodos da física para investigar e encontrar soluções para os problemas da biologia. Biólogos evolucionários e

paleontologistas estão familiarizados com os princípios da geologia e podem mesmo trabalhar de perto com geólogos enquanto tentam determinar a idade dos restos biológicos. Da mesma forma, antropólogos e arqueólogos aplicam o conhecimento da cultura humana e da sociedade às descobertas biológicas, a fim de compreenderem melhor a humanidade. A astrobiologia surgiu através das actividades dos cientistas e engenheiros preocupados com a exploração do espaço. Como resultado, o campo da biologia tem recebido e contribuído para muitas outras disciplinas, tanto no campo das ciências humanas como no das ciências.

Ao longo dos séculos XX e XXI, à medida que a biologia se foi interligando cada vez mais com outras áreas da ciência, passou também a abranger uma série de disciplinas em si. Em algumas dessas disciplinas, foram reconhecidos múltiplos níveis de organização - por exemplo, biologia populacional (o estudo das populações de seres vivos) e biologia do organismo (o estudo de todo o organismo) e biologia celular e biologia molecular. Na segunda metade do século XX, a biologia molecular gerou ainda mais disciplinas, e o advento da genómica levou à emergência de subdisciplinas sofisticadas, tais como a genómica do desenvolvimento e a genómica funcional. A genética continuou a expandir-se, dando origem a novas áreas, tais como a genética de conservação. Apesar do seu âmbito diversificado, contudo, no

século XXI, muitas áreas das ciências biológicas continuaram a recorrer a princípios e ideias unificadoras comuns, particularmente as que eram centrais para a taxonomia, genética, e evolução.

*Susan Heyner Joshi Edna R. Green Kara Rogers.*

### **Mudança de valores sociais e científicos**

Nos séculos XX e XXI, o papel dos biólogos na sociedade, bem como a sua responsabilidade moral e ética na descoberta e desenvolvimento de novas ideias, levaram a uma reavaliação dos sistemas de valores sociais e científicos individuais. Os cientistas não podem dar-se ao luxo de ignorar as consequências das suas descobertas; estão tão preocupados com a possível má utilização das suas descobertas como com a investigação básica em que estão envolvidos. No século XX, o papel social e político emergente do biólogo e de todos os outros cientistas exigia uma ponderação de valores que não podia ser feita com a exactidão ou objectividade de uma balança laboratorial. Como membros da sociedade, tornou-se necessário que os biólogos redefinissem as suas obrigações e funções sociais, particularmente no domínio do julgamento de problemas éticos, tais como o controlo humano do ambiente ou a manipulação de genes para orientar um maior desenvolvimento evolutivo.

### **Lidar com os problemas do futuro**

De particular consequência nas ciências biológicas foi o desenvolvimento da engenharia genética. Em casos de deficiências genéticas e doenças, a engenharia genética abriu a possibilidade de corrigir defeitos genéticos para restaurar a função fisiológica, melhorando potencialmente a qualidade de vida dos pacientes. A terapia genética, na qual um gene normal seria introduzido no genoma de um indivíduo a fim de reparar uma mutação causadora de doença, era um meio através do qual os investigadores podiam potencialmente alcançar esse objectivo. No entanto, as possibilidades de utilização abusiva da engenharia genética eram vastas. Havia uma preocupação significativa, por exemplo, sobre os organismos geneticamente modificados, particularmente as culturas modificadas, e os seus impactos na saúde humana e ambiental. A emergência de tecnologias de clonagem, incluindo a transferência nuclear de células somáticas, também suscitou preocupações. A Declaração sobre Clonagem Humana aprovada em 2005 pelas Nações Unidas apelou aos Estados membros para que proibissem a clonagem de seres humanos, embora deixasse em aberto a prossecução da clonagem terapêutica.

Do mesmo modo, em 2015, os investigadores que tinham desenvolvido tecnologias de edição genética, que permitiram aos cientistas personalizar a composição genética de um organismo alterando bases específicas na sua sequência de ADN, apelaram a uma moratória sobre a aplicação das tecnologias nos seres

humanos. Os impactos da edição genética sobre a genética humana eram desconhecidos, e não existiam regulamentos para orientar a sua utilização. De facto, na ausência de regulamentação rigorosa, um cientista chinês avançou com a edição de genes em humanos, em finais de 2018 reivindicando o nascimento dos primeiros bebês do mundo portadores dos genomas editados. O cientista alegou ter editado embriões humanos para desactivar um gene que normalmente facilita a entrada do VIH nas células; os embriões foram então implantados numa mulher e levados a termo. Entretanto, os investigadores nos Estados Unidos tentaram utilizar a edição de genes para alterar genes no esperma humano, o que permitiria que os genes editados fossem transmitidos às gerações seguintes. Em particular, os investigadores procuraram alterar genes que aumentam o risco de certos tipos de cancro, com o objectivo de reduzir o risco de cancro na descendência. O debate sobre a edição de genes renovou discussões anteriores sobre os impactos éticos e sociais da engenharia genética nos seres humanos, especialmente o seu potencial para ser utilizado para alterar traços como a inteligência e a aparência.

Outros desafios enfrentados pelos biólogos incluíram a procura de formas de conter a poluição ambiental sem interferir nos esforços para melhorar a qualidade de vida da humanidade. Contribuir para o problema da poluição era o problema do excesso de população humana. Um aumento da população humana global

tinha colocado maiores exigências à terra, especialmente na área da produção alimentar, e tinha exigido aumentos nas operações da indústria moderna, cujos produtos residuais contribuíram para a poluição do ar, água e solo. Para encontrar soluções para o aquecimento global, poluição e outros problemas ambientais, os biólogos trabalharam com cientistas sociais e outros membros da sociedade a fim de determinar os requisitos necessários para a manutenção de um planeta saudável e produtivo. Pois embora muitos dos problemas presentes e futuros da humanidade possam parecer ser essencialmente de natureza social, política ou económica, têm ramificações biológicas que podem afectar a própria existência da própria vida.

FOR AUTHOR USE ONLY

# 1-1 Tipos de células

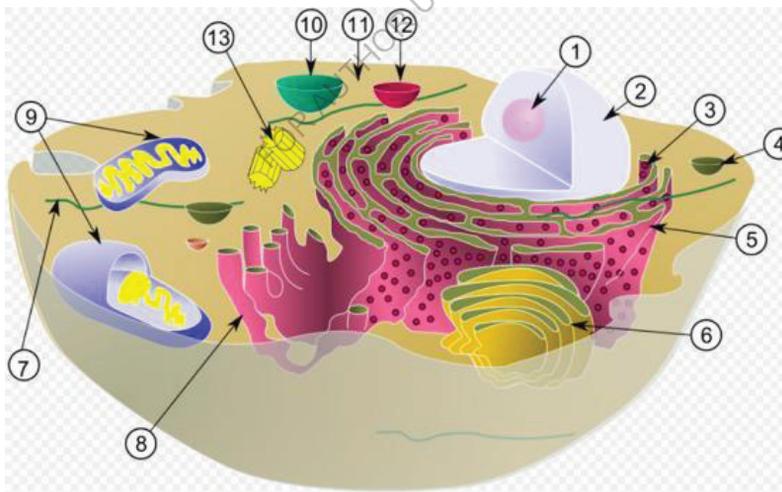
## Células

A teoria celular afirma que as células são as unidades fundamentais da vida, que todos os seres vivos são compostos por uma ou mais células, e que todas as células surgem de células preexistentes através da divisão celular. A maioria das células são muito pequenas, com diâmetros que variam entre 1 e 100 micrómetros e, portanto, só são visíveis sob um microscópio de luz ou de electrões. Existem geralmente dois tipos de células: as células eucarióticas, que contêm um núcleo, e as células procarióticas, que não o contêm. As procariotas são organismos unicelulares, tais como bactérias, enquanto que as eucariotas podem ser unicelulares ou multicelulares. Em organismos multicelulares, cada célula do corpo do organismo é derivada em última análise de uma única célula de um óvulo fertilizado.

## Estrutura celular

Cada célula está fechada dentro de uma membrana celular que separa o seu citoplasma do espaço extracelular. Uma membrana celular consiste num bocal lipídico, incluindo colesteróis que se encontram entre os fosfolípidos para manter a sua fluidez a várias temperaturas. As membranas celulares são semipermeáveis, permitindo a passagem de pequenas moléculas tais como oxigénio,

dióxido de carbono, e água, enquanto restringem o movimento de moléculas maiores e partículas carregadas tais como iões. As membranas celulares também contêm proteínas de membrana, incluindo proteínas de membrana integral que atravessam a membrana servindo como transportadores de membrana, e proteínas periféricas que se ligam frouxamente ao lado externo da membrana celular, actuando como enzimas que moldam a célula. As membranas celulares estão envolvidas em vários processos celulares tais como a adesão celular, armazenamento de energia eléctrica, e sinalização celular e servem como superfície de ligação para várias estruturas extracelulares tais como uma parede celular, glicocalyx, e citoesqueleto.



**Figura (11): Estrutura celular.**

Dentro do citoplasma de uma célula, existem muitas biomoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos.<sup>[46]</sup> Além das biomoléculas, as células eucarióticas têm estruturas especializadas chamadas organelas que têm as suas próprias camadas lipídicas ou são unidades espaciais. Estas organelas incluem o núcleo celular, que contém a informação genética de uma célula, ou mitocôndria, que gera trifosfato de adenosina (ATP) para alimentar os processos celulares. Outras organelas como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi desempenham um papel na síntese e no acondicionamento de proteínas, respectivamente. Biomoléculas como as proteínas podem ser engolidas por lisossomas, outra organela especializada. As células vegetais têm organelas adicionais que as distinguem das células animais, tais como uma parede celular, cloroplastos, e vacuole.

## **Metabolismo**

Todas as células necessitam de energia para sustentar os processos celulares. Energia é a capacidade de fazer trabalho, que, em termodinâmica, pode ser calculada utilizando energia livre de Gibbs. De acordo com a primeira lei da termodinâmica, a energia é conservada, ou seja, não pode ser criada ou destruída. Por conseguinte, as reacções químicas numa célula não criam nova energia, mas estão envolvidas na transformação e transferência de energia. No entanto, todas as transferências de energia conduzem a

alguma perda de energia utilizável, o que aumenta a entropia (ou estado de desordem), tal como estabelecido pela segunda lei da termodinâmica. Como resultado, um organismo requer uma entrada contínua de energia para manter um baixo estado de entropia. Nas células, a energia pode ser transferida como electrões durante reacções redox (redução-oxidação), armazenada em ligações covalentes e gerada pelo movimento de iões (por exemplo, hidrogénio, sódio, potássio) através de uma membrana.

Metabolismo é o conjunto de reacções químicas que sustentam a vida nos organismos. Os três principais objectivos do metabolismo são: a conversão de alimentos em energia para executar processos celulares; a conversão de alimentos/combustíveis em blocos de construção para proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, e alguns hidratos de carbono; e a eliminação de resíduos metabólicos. Estas reacções catalisadas por enzimas permitem aos organismos crescer e reproduzir-se, manter as suas estruturas e responder aos seus ambientes. As reacções metabólicas podem ser categorizadas como catabólicas, a decomposição de compostos (por exemplo, a decomposição da glicose para piruvato pela respiração celular); ou anabólicas, a acumulação (síntese) de compostos (tais como proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos). Normalmente, o catabolismo liberta energia, e o anabolismo consome energia.

As reacções químicas do metabolismo estão organizadas em vias metabólicas, nas quais uma substância química é transformada através de uma série de etapas em outra substância química, sendo cada etapa facilitada por uma enzima específica. As enzimas são cruciais para o metabolismo porque permitem que os organismos conduzam reacções desejáveis que requerem energia que não ocorrerão por si só, associando-as a reacções espontâneas que libertam energia. As enzimas actuam como catalisadores, permitem que uma reacção prossiga mais rapidamente sem ser consumida por ela, reduzindo a quantidade de energia de activação necessária para converter os reagentes em produtos. As enzimas também permitem a regulação da taxa de uma reacção metabólica, por exemplo em resposta a mudanças no ambiente da célula ou a sinais de outras células.

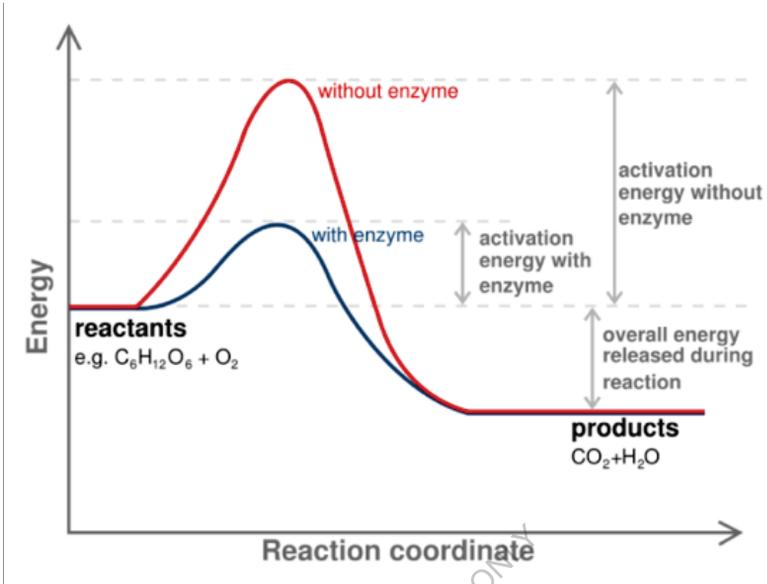


Figura (12): Metabolismo.

## Respiração celular

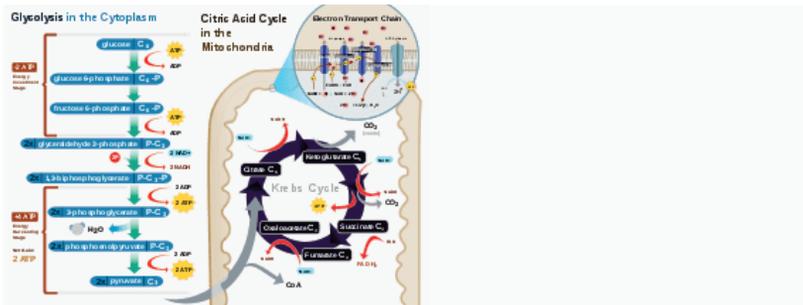


Figura (13): Respiração numa célula eucariótica

A respiração celular é um conjunto de reacções e processos metabólicos que ocorrem nas células dos organismos para converter a energia química dos nutrientes em trifosfato de adenosina (ATP), e depois libertar produtos residuais. As reacções envolvidas na respiração são reacções catabólicas, que quebram moléculas grandes em moléculas mais pequenas, libertando energia porque ligações fracas de alta energia, em particular no oxigénio molecular, são substituídas por ligações mais fortes nos produtos. A respiração é uma das principais formas de uma célula libertar energia química para alimentar a actividade celular. A reacção global ocorre numa série de etapas bioquímicas, algumas das quais são reacções redox. Embora a respiração celular seja tecnicamente uma reacção de combustão, não se assemelha claramente a uma quando ocorre numa célula devido à libertação lenta e controlada de energia da série de reacções.

O açúcar sob a forma de glucose é o principal nutriente utilizado pelas células animais e vegetais na respiração. A respiração celular envolvendo oxigénio é chamada respiração aeróbica, que tem quatro fases: glicólise, ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs), cadeia de transporte de electrões, e fosforilação oxidativa. A glicólise é um processo metabólico que ocorre no citoplasma em que a glucose é convertida em dois pirúvatos, com duas moléculas líquidas de ATP a serem produzidas ao mesmo tempo. Cada

piruvato é depois oxidado em acetil-CoA pelo complexo de piruvato desidrogenase, que também gera NADH e dióxido de carbono. A acetil-Coa entra no ciclo do ácido cítrico, que tem lugar no interior da matriz mitocondrial. No final do ciclo, o rendimento total de 1 glucose (ou 2 pirúvas) é de 6 NADH, 2 FADH<sub>2</sub>, e 2 moléculas de ATP. Finalmente, a fase seguinte é a fosforilação oxidativa, que em eucariotas, ocorre na crista mitocondrial. A fosforilação oxidativa compreende a cadeia de transporte de electrões, que é uma série de quatro complexos proteicos que transferem electrões de um complexo para outro, libertando assim energia de NADH e FADH<sub>2</sub> que é acoplada ao bombeamento de protões (iões de hidrogénio) através da membrana mitocondrial interna (quimiossímose), que gera uma força motriz de protões.<sup>[50]</sup> A energia da força motriz do protão impulsiona a enzima ATP synthase para sintetizar mais ATP através da fosforilação dos ADPs. A transferência de electrões termina com o oxigénio molecular a ser o último aceitador de electrões.

Se não houvesse oxigénio, o piruvato não seria metabolizado pela respiração celular, mas sim submetido a um processo de fermentação. O piruvato não é transportado para a mitocôndria, mas permanece no citoplasma, onde é convertido em produtos residuais que podem ser removidos da célula. Isto serve o propósito de oxidar os portadores de electrões para que possam realizar novamente a glicólise e remover o excesso de piruvato. A

fermentação oxida NADH a  $\text{NAD}^+$  para que possa ser reutilizada na glicólise. Na ausência de oxigénio, a fermentação impede a acumulação de NADH no citoplasma e fornece  $\text{NAD}^+$  para a glicólise. Este produto residual varia em função do organismo. Nos músculos esqueléticos, o produto residual é ácido láctico. Este tipo de fermentação é chamado fermentação com ácido láctico. No exercício extenuante, quando as necessidades energéticas excedem o fornecimento de energia, a cadeia respiratória não pode processar todos os átomos de hidrogénio unidos pelo NADH. Durante a glicólise anaeróbica, o  $\text{NAD}^+$  regenera quando os pares de hidrogénio se combinam com o pirúvio para formar o lactato. A formação de lactato é catalisada pela desidrogenase láctica numa reacção reversível. O lactato também pode ser utilizado como um precursor indirecto do glicogénio hepático. Durante a recuperação, quando o oxigénio se torna disponível, o  $\text{NAD}^+$  liga-se ao hidrogénio do lactato para formar o ATP. Na levedura, os produtos residuais são o etanol e o dióxido de carbono. Este tipo de fermentação é conhecido como fermentação alcoólica ou etanol. O ATP gerado neste processo é feito por fosforilação ao nível do substrato, que não necessita de oxigénio.

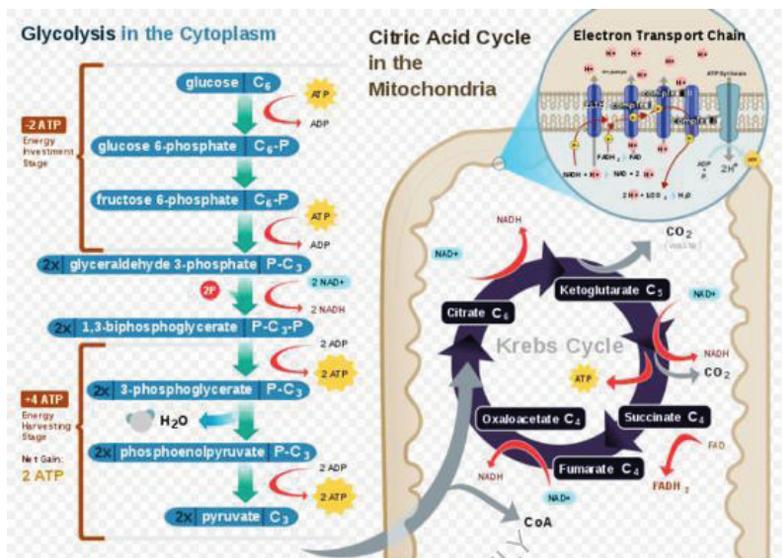


Figura (14): Respiração numa célula eucariótica.

## Sinalização celular

A comunicação celular (ou sinalização) é a capacidade das células de receber, processar e transmitir sinais com o seu ambiente e consigo próprias. Os sinais podem ser não químicos, tais como luz, impulsos eléctricos e calor, ou sinais químicos (ou ligandos) que interagem com os receptores, que podem ser encontrados embutidos na membrana celular de outra célula ou localizados no interior de uma célula. Existem geralmente quatro tipos de sinais químicos: autócrina, parácrina, justacrina, e hormonas.<sup>[58]</sup> Na sinalização autócrina, o ligando afecta a mesma célula que o

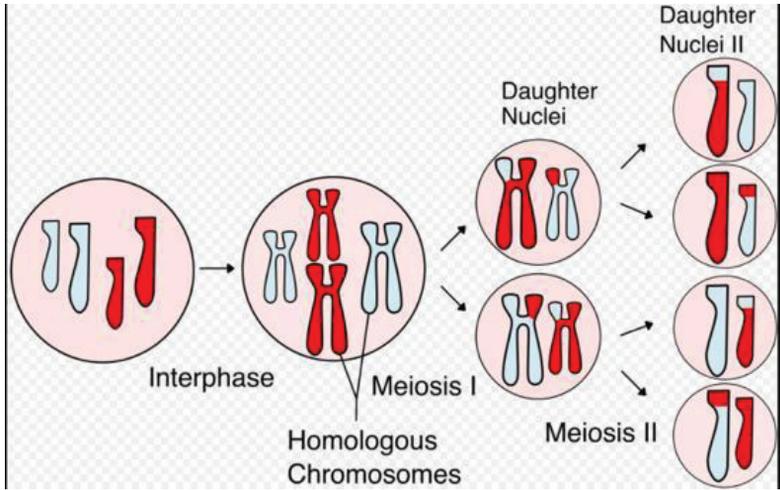
liberta. As células tumorais, por exemplo, podem reproduzir-se de forma incontrolável porque libertam sinais que iniciam a sua própria auto-divisão. Na sinalização parácrina, o ligando difunde-se para as células próximas e afecta-as. Por exemplo, as células cerebrais chamadas neurónios libertam ligandos chamados neurotransmissores que se difundem através de uma fenda sináptica para se ligarem com um receptor numa célula adjacente, tal como outro neurónio ou célula muscular. Na sinalização justacrina, há contacto directo entre as células de sinalização e de resposta. Finalmente, as hormonas são ligandos que viajam através dos sistemas circulatórios de animais ou sistemas vasculares de plantas para alcançar as suas células alvo. Uma vez que um ligando se liga com um receptor, pode influenciar o comportamento de outra célula, dependendo do tipo de receptor. Por exemplo, os neurotransmissores que se ligam com um receptor inotrópico podem alterar a excitabilidade de uma célula-alvo. Outros tipos de receptores incluem receptores de proteína cinase, por exemplo, receptor para a hormona insulina e receptores acoplados à proteína G. A activação de receptores acoplados à proteína G pode iniciar segundas cascatas de mensageiros. O processo pelo qual um sinal químico ou físico é transmitido através de uma célula, como uma série de eventos moleculares, é chamado de transdução de sinal.

## **Ciclo celular**

O ciclo celular é uma série de eventos que têm lugar numa célula que a divide em duas células filhas. Estes eventos incluem a duplicação do seu ADN e algumas das suas organelas, e a subsequente divisão do seu citoplasma em duas células filhas, num processo chamado divisão celular. Em eucariotas (ou seja, células animais, vegetais, fúngicas e protistas), existem dois tipos distintos de divisão celular: mitose e meiose.<sup>[60]</sup> A mitose faz parte do ciclo celular, no qual os cromossomas replicados são separados em dois novos núcleos. A divisão celular dá origem a células geneticamente idênticas, nas quais o número total de cromossomas é mantido. Em geral, a mitose (divisão do núcleo) é precedida pela fase S da interfase (durante a qual o ADN é replicado) e é frequentemente seguida pela telophase e citoquinase; que divide o citoplasma, organelas e membrana celular de uma célula em duas novas células contendo partes aproximadamente iguais destes componentes celulares. As diferentes fases da mitose, todas juntas, definem a fase mitótica de um ciclo celular animal, a divisão da célula mãe em duas células filhas geneticamente idênticas.<sup>[61]</sup> O ciclo celular é um processo vital pelo qual um óvulo fertilizado unicelular se desenvolve num organismo maduro, bem como o processo pelo qual o pêlo, a pele, as células sanguíneas, e alguns órgãos internos são renovados. Após a divisão celular, cada uma das células filhas inicia a interfase de um novo ciclo. Em contraste com a mitose, a

meiose resulta em quatro células filhas haplóides, ao serem submetidas a uma ronda de replicação de ADN seguida de duas divisões. Os cromossomas homólogos são separados na primeira divisão (meiose I), e os cromátídeos irmãos são separados na segunda divisão (meiose II). Ambos estes ciclos de divisão celular são utilizados no processo de reprodução sexual em algum momento do seu ciclo de vida. Acredita-se que ambos estejam presentes no último ancestral comum eucariótico.

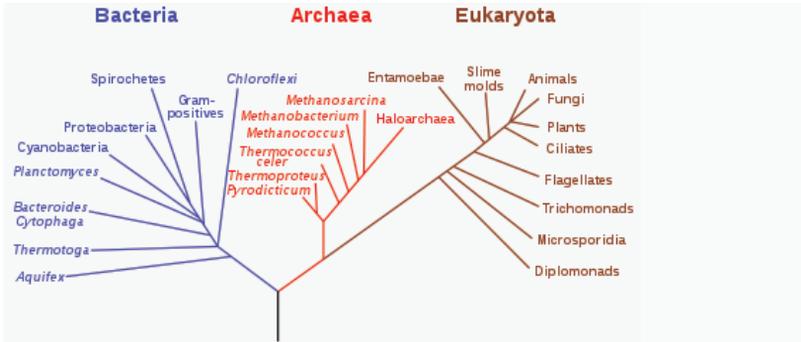
Os procariotas, p. ex. arcaicas e bactérias também podem ser submetidos a divisão celular (ou fissão binária). Ao contrário dos processos de mitose e meiose em eucariotas, a fissão binária ocorre em procariotas sem a formação de um aparelho de fuso na célula. Antes da fissão binária, o ADN na bactéria é bem enroscado. Depois de desenrolado e duplicado, é puxado para os pólos separados da bactéria à medida que aumenta o tamanho para se preparar para a fissão. O crescimento de uma nova parede celular começa a separar a bactéria (desencadeado pela polimerização FtsZ e formação do "anel Z"). A nova parede celular (septo) desenvolve-se totalmente, resultando na separação completa da bactéria. As novas células filhas têm hastes de ADN bem enroladas, ribossomas e plasmídeos.



**Figura (15): Ciclo celular.**

Na meiose, os cromossomas duplicados e os cromossomas homólogos trocam informação genética durante a meiose I. As células filhas dividem-se novamente na meiose II para formar gametas haplóides.

## Phylogenies



**Figura (16):** Árvore filogenética mostrando os domínios de bactérias, arqueobactérias e eucariotas.

Uma filogenia é uma história evolutiva de um grupo específico de organismos ou dos seus genes. Uma filogenia pode ser representada usando uma árvore filogenética, que é um diagrama mostrando linhas de descendência entre organismos ou os seus genes. Cada linha traçada no eixo temporal de uma árvore representa uma linhagem de descendentes de uma determinada espécie ou população. Quando uma linhagem se divide em duas, é representada como um nó ou divisão na árvore filogenética. Quanto mais divisões houver ao longo do tempo, mais ramos haverá na árvore, sendo o antepassado comum de todos os organismos dessa árvore representado pela raiz dessa árvore. As árvores filogenéticas podem retratar a história evolutiva de todas as formas de vida, um grande grupo evolutivo, por exemplo, insectos ou um grupo ainda mais pequeno de espécies intimamente relacionadas. Dentro de uma árvore, qualquer grupo de espécies designado por um nome é

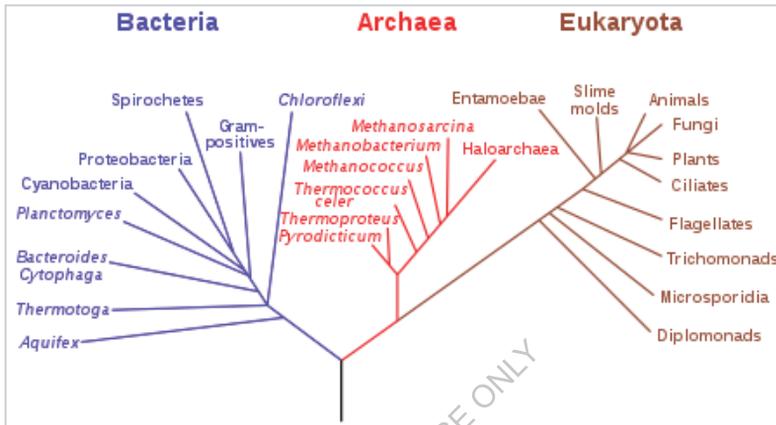
um táxon, por exemplo, humanos, primatas, mamíferos ou vertebrados e um táxon que consiste em todos os seus descendentes evolutivos é um clade, também conhecido como um táxon monofilético. As espécies estreitamente relacionadas são referidas como espécies irmãs e os clades estreitamente relacionados são clades irmãos. Ao contrário de um grupo monofilético, um grupo polifilético não inclui o seu antepassado comum, enquanto que um grupo parafilético não inclui todos os descendentes de um antepassado comum.

As árvores filogenéticas são a base para comparar e agrupar diferentes espécies. Diferentes espécies que partilham uma característica herdada de um antepassado comum são descritas como tendo características homólogas. As características homólogas podem ser quaisquer características hereditárias tais como sequência de ADN, estruturas proteicas, características anatómicas, e padrões de comportamento. Uma coluna vertebral é um exemplo de uma característica homóloga partilhada por todos os animais vertebrados. Traços que têm uma forma ou função semelhante, mas que não foram derivados de um antepassado comum, são descritos como traços análogos. As filogenias podem ser reconstruídas para um grupo de organismos de interesses primários, que são chamados de ingroup. Uma espécie ou grupo que está intimamente relacionado com o ingroup mas que está filogeneticamente fora dele é chamado o outgroup, que serve de

ponto de referência na árvore. A raiz da árvore situa-se entre o ingroup e o outgroup quando as árvores filogenéticas são reconstruídas, podem ser geradas múltiplas árvores com diferentes histórias evolutivas. Com base no princípio de Parsimony (ou navalha de Occam), a árvore que é favorecida é a que tem menos mudanças evolutivas a serem assumidas sobre todos os traços em todos os grupos. Os algoritmos computacionais podem ser utilizados para determinar como uma árvore pode ter evoluído dada a evidência.

Phylogeny fornece a base da classificação biológica, que se baseia na taxonomia Linnaean que foi desenvolvida por Carl Linnaeus no século XVIII.<sup>[117]</sup> Este sistema de classificação é baseado na classificação, sendo a classificação mais elevada o domínio seguido pelo reino, filo, classe, ordem, família, género e espécie. Todos os organismos podem ser classificados como pertencendo a um de três domínios: Archaea (originalmente Archaeobacteria); bactérias (originalmente eubacteria), ou eukarya (inclui os reinos protista, fungo, vegetal, e animal). Uma nomenclatura binomial é utilizada para classificar as diferentes espécies. Com base neste sistema, a cada espécie são dados dois nomes, um para o seu género e outro para a sua espécie. Por exemplo, os seres humanos são *Homo sapiens*, sendo o *Homo* o género e os *sapiens* a espécie. Por convenção, os nomes científicos

dos organismos estão em *itálico*, com apenas a primeira letra do gênero em maiúsculas.



**Figura (17):** **Árvore filogenética mostrando os domínios de bactérias, arqueobactérias e eucariotas**

## **Célula A-Eukaryotic**

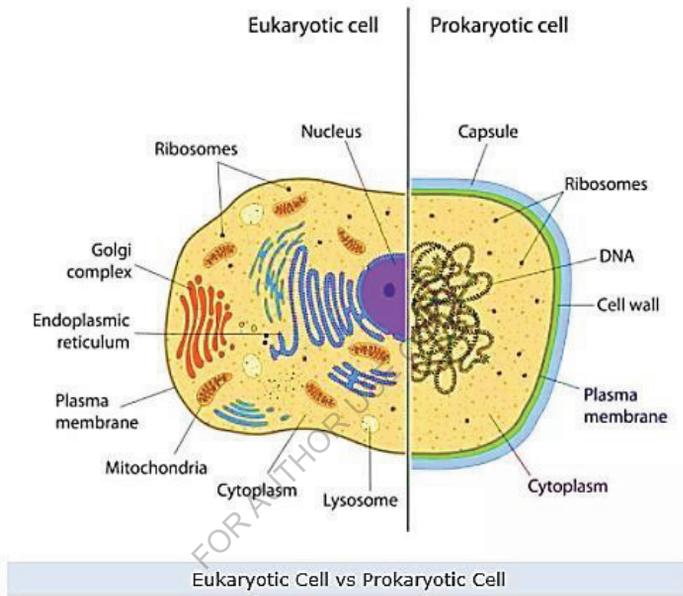
Uma célula eucariótica contém organelas ligadas à membrana, tais como um núcleo, mitocôndrias e um retículo endoplasmático. Os organismos baseados na célula eucariótica incluem protozoários, fungos, plantas, e animais. Estes organismos estão agrupados no domínio biológico Eukaryota. As células eucarióticas são maiores e mais complexas do que as células procarióticas encontradas nos domínios da Archaea e das Bactérias.

Uma célula eucariótica é um de dois tipos diferentes de células. Os organismos que são baseados na célula eucariótica são chamados "eucariotas" e incluem plantas, animais, fungos, e protistas. Os únicos organismos que não se baseiam na célula eucariótica são organismos baseados numa estrutura celular procariótica. Esses organismos encontram-se nos domínios da Archaea e das Bactérias. Existem várias diferenças entre uma célula eucariótica e uma célula procariótica que podem ajudá-lo a compreender plenamente o que torna uma célula eucariótica.

### **Célula eucariótica vs Célula procariótica**

A diferença entre uma célula eucariótica e uma célula procariótica é simples: as células eucarióticas têm organelas ligadas à membrana. Dentro de uma célula procariótica (tal como uma bactéria) o ADN flutua simplesmente em torno do citoplasma

enquanto que as células procarióticas têm um tipo de organela (ribossomas), estas organelas não são cobertas por uma membrana plasmática.



**Figura (18): Célula eucariótica vs Célula procariótica**

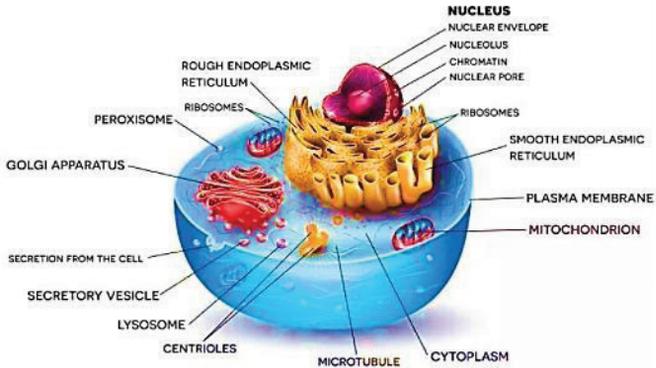
Pelo contrário, as células eucarióticas estão cheias de organelas de membrana que dividem a célula em muitos compartimentos diferentes. O núcleo aloja o ADN. O retículo endoplasmático cria muitas câmaras para realizar reacções bioquímicas específicas. O aparelho Golgi dobra e acondiciona várias proteínas e produtos celulares. Os lisossomas armazenam enzimas digestivas para decompor os alimentos recebidos. Além disso, as células

eucarióticas contêm mitocôndrias para criar moléculas de ATP a partir da glucose e cloroplastos para criar glucose a partir da luz solar (apenas em plantas e algas).

### **Características de uma Célula Eukaryotic**

As células eucarióticas contêm uma variedade de organelas, que desempenham várias funções dentro da célula (descritas em detalhe, abaixo). Todas as organelas são estabilizadas e recebem apoio físico através do citoesqueleto, que também está envolvido no envio de sinais de uma parte da célula para a outra. Nas células eucarióticas, o citoesqueleto é composto principalmente de três tipos de filamentos: microtubos, microfilamentos, e filamentos intermediários. A solução aquosa que envolve todas as organelas da célula é chamada citosol.

## ANATOMY OF A CELL



**Figura (19): Características de uma Célula Eukaryotic**

O ciclo da célula é o ciclo de vida de uma célula. Durante este ciclo, ele cresce e divide-se. Existem pontos de controlo entre todas as fases para que as proteínas possam determinar se a célula está pronta para iniciar a fase seguinte do ciclo.

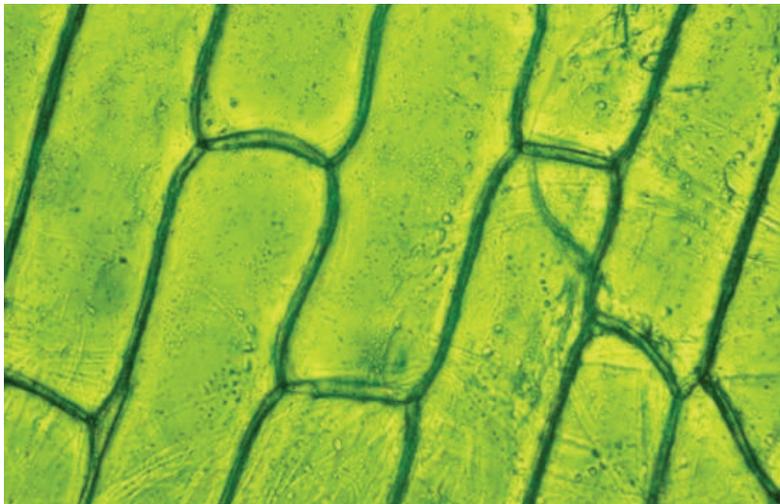
### **Mitose (M)**

A mitose, ou fase M, é quando a célula começa a organizar o seu ADN duplicado para separação em duas células filhas. Os cromossomas separam-se de modo a que um de cada cromossoma vá para cada célula filha. Isto faz com que as células filhas tenham cromossomas idênticos aos da célula mãe. A própria mitose é dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Cada fase marca

vários pontos no processo de separação do ADN. A mitose é então seguida por um processo chamado citocinese, durante o qual a célula separa os seus núcleos e outras organelas em preparação para a divisão e depois divide-se fisicamente em duas células.

### **Célula vegetal**

As células vegetais são únicas entre as células eucarióticas por várias razões. Têm paredes celulares reforçadas, relativamente espessas, feitas de celulose que ajudam a manter o suporte estrutural na planta. Cada célula vegetal tem um grande vacúolo no centro que lhe permite manter a pressão turgor. A pressão turgor resulta da água num vacúolo central empurrando para fora nas paredes das células. As células vegetais contêm também organelas chamadas cloroplastos que contêm a molécula clorofila. Esta importante molécula é utilizada no processo de fotossíntese, que é como as plantas produzem açúcar utilizando a energia encontrada na luz.

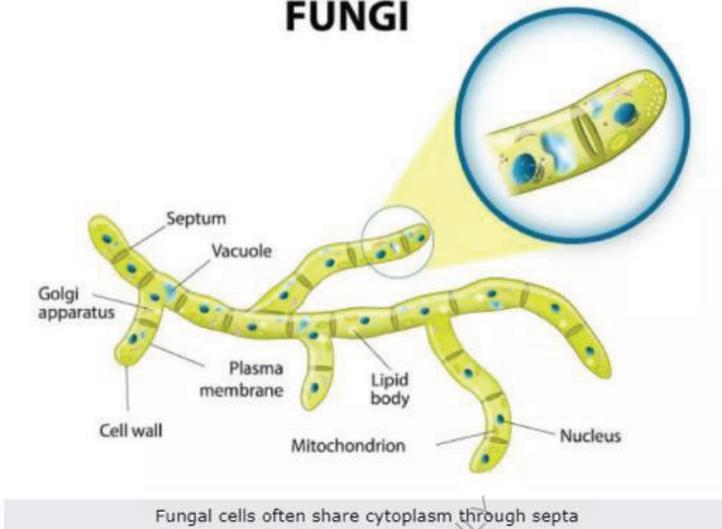


**Figura (20): As células vegetais são células eucarióticas.**

### **Células Fúngicas**

Tal como as células vegetais, as células fúngicas também têm uma parede celular, mas a sua parede celular é feita de quitina (a mesma substância encontrada nos exosqueletos de insectos). Alguns fungos têm septos, que são buracos que permitem a passagem de organelas e citoplasma entre eles. Isto torna os limites entre as diferentes células menos claros. A maioria dos fungos vive no subsolo ou em matéria orgânica em decomposição, onde a rede micelial pode conter milhões de células interligadas.

# FUNGI



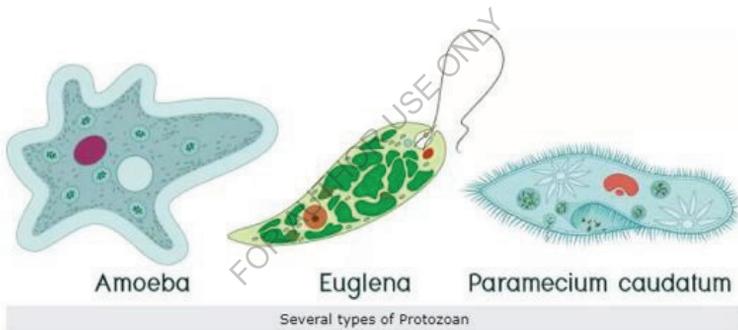
**Figura (21): As células fúngicas partilham frequentemente o citoplasma através de septos.**

## Células animais

As células animais não têm paredes celulares. Em vez disso, têm apenas uma membrana de plasma. A falta de uma parede celular permite que as células animais formem muitas formas diferentes. Isto permite que os processos de fagocitose ("comer células") e de pinocitose ("beber células") ocorram. As células animais diferem das células vegetais por não terem cloroplastos e terem muitos pequenos vacúolos em vez de um grande vacúolo central.

## Protozoa

Protozoários são organismos eucarióticos que consistem numa única célula. Podem mover-se, comer outros pequenos organismos, e digerir alimentos dentro de vacúolos. Alguns protozoários têm muitos **cílios**, que são pêlos pequenos e móveis que lhes permitem nadar. Outros utilizam grandes estruturas flagelantes que se assemelham a uma grande cauda - para nadar através da água. Alguns protozoários têm também uma camada fina chamada pelicular que fornece suporte à membrana celular.



**Figura (22): Vários tipos de protozoários.**

## **Célula B-Prokaryotic**

As células procarióticas são microrganismos unicelulares conhecidos por serem os mais precoces da Terra. Os procariotas incluem as Bactérias e a Archaea. Os procariotas fotossintéticos incluem as cianobactérias que realizam a fotossíntese.

Uma célula procariótica é constituída por uma única membrana e, portanto, todas as reacções ocorrem dentro do citoplasma. Podem ser de vida livre ou parasitas.

### **Características da Célula Procariótica**

As células procarióticas têm características diferentes. As características das células procarióticas são mencionadas abaixo.

1. Falta-lhes uma membrana nuclear.
2. Mitocôndria, corpos de Golgi, cloroplasto, e lisossomas estão ausentes.
3. O material genético está presente num único cromossoma.
4. Faltam-lhes as proteínas histónicas, os importantes constituintes dos cromossomas eucarióticos.
5. A parede celular é constituída por hidratos de carbono e aminoácidos.
6. A membrana plasmática actua como a membrana mitocondrial portadora de enzimas respiratórias.

7. Dividem-se assexualmente por fissão binária. O modo de reprodução sexual envolve a conjugação.

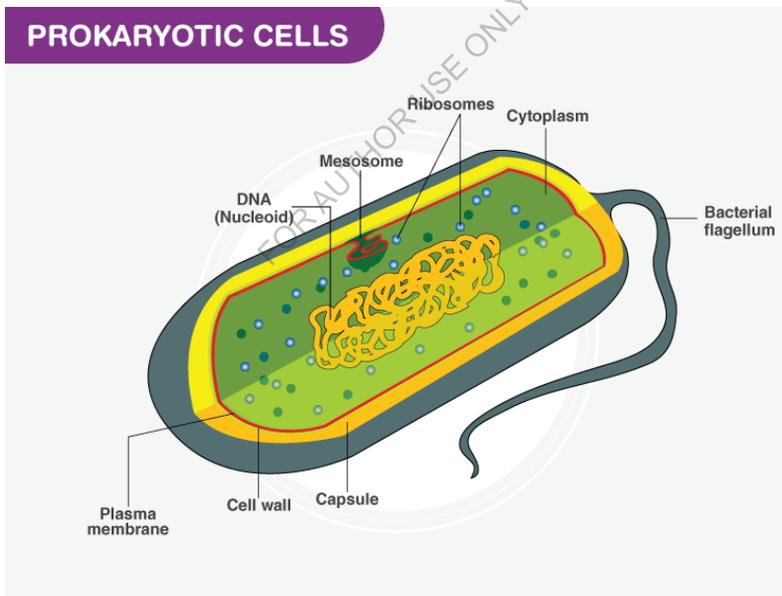
### **Estrutura de células procarióticas**

Uma célula procariótica não tem uma membrana nuclear. No entanto, o material genético está presente numa região do citoplasma conhecida como o nucleóide. Podem ser esféricos, em forma de vara, ou em espiral. Uma estrutura celular procariótica é a seguinte:

1. **Cápsula:** É um revestimento protector externo encontrado nas células bacterianas, para além da parede celular. Ajuda na retenção de humidade, protege a célula quando engolfada, e ajuda na fixação das células aos nutrientes e superfícies.
2. **Parede celular:** É a camada mais exterior da célula que dá forma à célula.
3. **Citoplasma:** O citoplasma é composto principalmente por enzimas, sais, organelas celulares e é um componente semelhante a um gel.
4. **Membrana celular:** Esta camada envolve o citoplasma e regula a entrada e saída de substâncias nas células.
5. **Pili:** Estes são pêlos em crescimento que se ligam à superfície de outras células bacterianas.

6. **Flagela:** São estruturas longas sob a forma de chicote, que ajudam na locomoção de uma célula.
7. **Ribossomas:** Estes estão envolvidos na síntese de proteínas.
8. **Plasmídeos:** Os plásmidas são estruturas de ADN não cromossômicas. Estes não estão envolvidos na reprodução.
9. **Região Núcleoide:** É a região do citoplasma onde o material genético está presente.

A uma célula procariótica faltam certas organelas como a mitocôndria, o retículo endoplasmático e os corpos de Golgi.



**Figura (23):** Diagrama de células procarióticas ilustra a ausência de um verdadeiro núcleo.

## 1-2 Componentes das células procarióticas

As células procarióticas têm quatro componentes principais:

**Plasma Membrane-** É uma cobertura protectora externa de moléculas de fosfolípidos que separa a célula do ambiente circundante.

**Citoplasma-** É uma substância gelatinosa presente no interior da célula. Todas as organelas da célula estão suspensas nela.

**ADN-** É o material genético da célula. Todos os procariotas possuem um ADN circular. Dirige as proteínas que a célula cria. Também regula as acções da célula.

**Ribossomas** - A síntese de proteínas ocorre aqui.

Algumas células procarióticas possuem cílios e flagelos que ajudam na locomoção.

### Reprodução em Prokaryotes

Um prokaryote reproduz-se de duas maneiras:

- Assexualmente por fissão binária
- Sexualmente por conjugação

Fissão binária

1. O ADN de um organismo replica-se e as novas cópias anexam-se à membrana celular.

2. A parede celular começa a aumentar em tamanho e começa a mover-se para dentro.
3. Forma-se então uma parede celular entre cada ADN, dividindo a célula em duas células filhas.

## **Recombinação**

Neste processo, os genes de uma bactéria são transferidos para o genoma de outras bactérias. Ocorre de três formas - conjugação, transformação, transdução.

- **A conjugação** é o processo em que os genes são transferidos entre duas bactérias através de uma estrutura de tubo proteico chamado pilus.
- **A transformação** é o modo de reprodução sexual em que o ADN do meio ambiente é retirado pela célula bacteriana e incorporado no seu ADN.
- **A transdução** é o processo em que o material genético é transferido para a célula bacteriana com a ajuda de vírus. Os bacteriófagos são o vírus que inicia o processo.

## **Exemplos de células procarióticas**

Os exemplos das células procarióticas são mencionados abaixo:

## **Células Bacterianas**

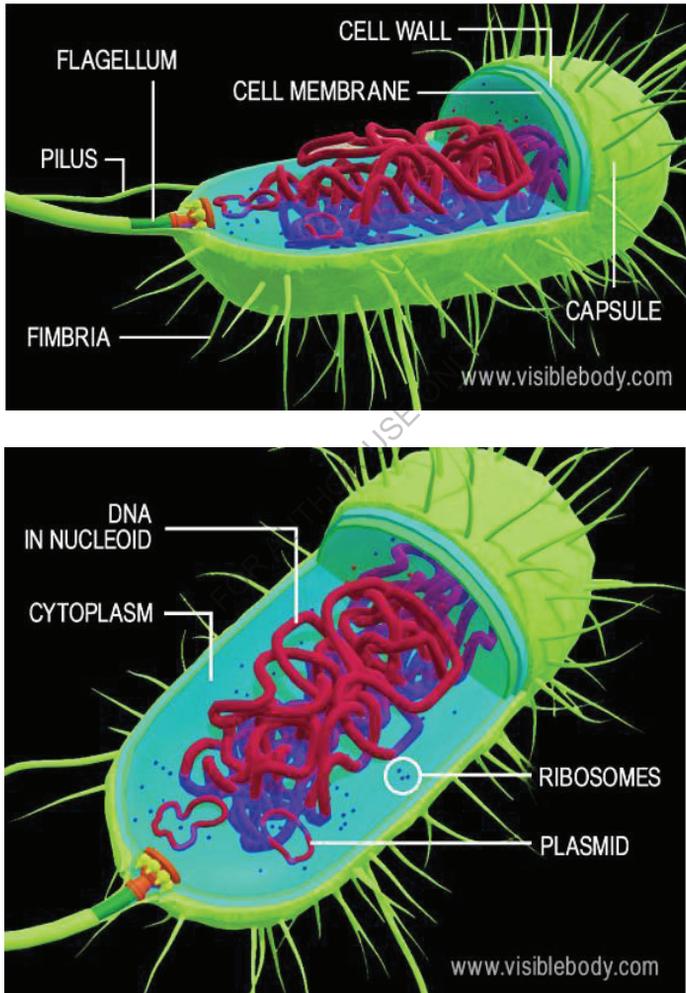
Estes são organismos unicelulares encontrados em todo o lado na terra, desde o solo até ao corpo humano. Têm formas e estruturas diferentes. A parede celular é composta de peptidoglicano que fornece estrutura à parede celular.

As bactérias têm algumas estruturas únicas tais como pili, flagella e cápsula. Possuem também ADN extracromossómico conhecido como plasmídeos. Têm a capacidade de formar estruturas resistentes e adormecidas conhecidas como endosporos que as ajudam a sobreviver em condições desfavoráveis. Os endosporos tornam-se activos quando as condições são novamente favoráveis.

## **Células Archeológicas**

As archaeobactérias são organismos unicelulares semelhantes a bactérias em forma e tamanho. Encontram-se em ambientes extremos, tais como fontes termais e outros locais como o solo, pântanos, e mesmo no interior dos seres humanos. Têm uma parede celular e flagelos. A parede celular do arqueobactéria não contém peptidoglicano. As membranas do arqueobactérias têm diferentes lípidos com uma estereoquímica completamente diferente. Tal como as bactérias, os arqueobactérias têm um cromossoma circular. Possuem também plasmídeos. Para mais informações sobre as células procarióticas, a sua definição, estrutura, características e

exemplos, continue a visitar o website de Biologia da BYJU ou descarregue a aplicação da BYJU'S para mais referências.



**Figura (24): Estruturas bacterianas.**

## Parede A-Cell

A **parede celular** é a parede de uma célula em plantas, bactérias, fungos, algas, e algumas arcaias. As células animais não têm paredes celulares, nem os protozoários. As paredes celulares protegem as células de danos. Também existe para tornar a célula forte, para manter a sua forma, e para controlar o crescimento da célula e da planta.

A parede celular é a camada resistente, geralmente flexível mas por vezes bastante rígida que envolve alguns tipos de células. Está fora da membrana celular e dá a estas células suporte e protecção, além de actuar como um filtro. A parede celular também actua como um recipiente de pressão, impedindo a expansão excessiva quando a água entra na célula por osmose.

O material na parede celular varia. Nas plantas e algas, a parede celular é feita de moléculas longas de celulose, pectina, e hemicelulose. A parede celular tem canais que deixam entrar algumas proteínas e mantêm outras fora. Água e pequenas moléculas podem atravessar a parede celular e a membrana celular. A parede celular tem resistência mecânica, e suporta a forma celular. Esta resistência mecânica é a sua função principal:

Pense na parede celular como um cesto de vime no qual um balão foi insuflado de modo a exercer pressão a partir do interior. Tal cesto é muito rígido e resistente a danos mecânicos. Assim, a célula

[organismos] que têm uma parede celular) ganha força de uma membrana de plasma flexível que pressiona contra uma parede celular rígida".

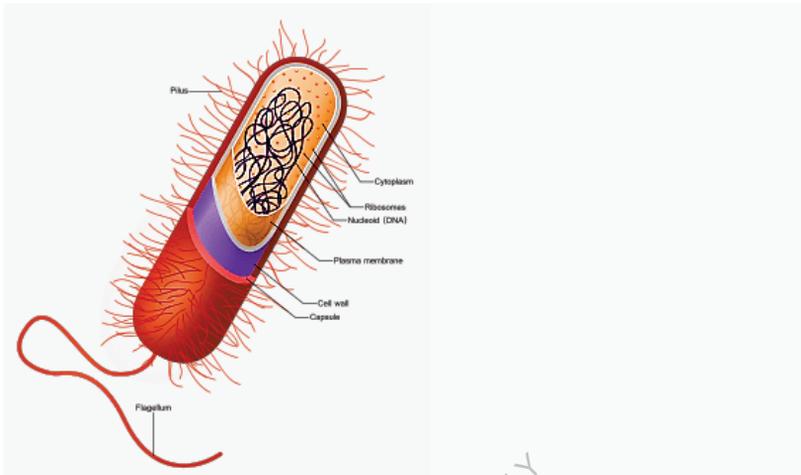
Embora a parede celular da planta seja forte, não é rígida ou rígida. A flexibilidade das paredes celulares é observada quando as plantas murcham, de modo que os caules e as folhas começam a cair.

Algumas plantas acrescentam material de endurecimento a algumas das suas paredes celulares. Uma parede celular *secundária* é uma camada adicional de celulose que aumenta a rigidez da parede. Mais camadas podem ser adicionadas contendo lignina em paredes celulares de xilema, ou contendo suberina em paredes celulares de cortiça. Estes compostos são rígidos e à prova de água. Eles tornam a parede secundária rígida. Tanto a madeira como as células de casca das árvores têm paredes secundárias. Outras partes das plantas, como o caule da folha, podem ser reforçadas para resistir à tensão das forças físicas.

### **Permeabilidade**

Pequenas moléculas, incluindo pequenas proteínas, podem facilmente atravessar a parede celular da planta primária. A água e o dióxido de carbono são distribuídos por toda a planta. O pH é um factor importante para o transporte de moléculas através das paredes celulares.

## Parede celular bacteriana



**Figura (25): Diagrama de uma bactéria Gram-positiva típica.**

O envelope celular tem uma membrana de plasma, verde, e um espesso peptidoglicano contendo a parede celular (a camada amarela). Não existe membrana lipídica exterior, tal como as bactérias Gram-negativas. A camada vermelha, a cápsula, é distinta do envelope da célula

À volta do exterior da membrana celular encontra-se a parede celular bacteriana. As paredes celulares bacterianas são feitas de peptidoglicano, que é feito de cadeias de polissacarídeos reticulados por peptídeos invulgares contendo D-aminoácidos. As paredes celulares bacterianas são diferentes das paredes celulares de plantas e fungos que são feitos de celulose e quitina, respectivamente.

A parede celular das bactérias é também distinta da da Archaea, que não contém peptidoglicano. A parede celular é essencial para a sobrevivência de muitas bactérias. A penicilina antibiótica é capaz de matar bactérias, impedindo a ligação cruzada do peptidoglicano e isto faz com que a parede celular se enfraqueça e se lise. A enzima lisozima também pode danificar as paredes celulares das bactérias

### **Lamela Média**

A lamela do meio dá à célula forma, suporte e força. É feita de cálcio e magnésio. Embora se chame lamela *intermédia*, é a parte exterior da célula. A lamela média é a primeira parede da célula a dar protecção.

### **Membrana das células animais**

As células animais não têm paredes celulares. Possuem microfilamentos (os filamentos mais finos do citoesqueleto).

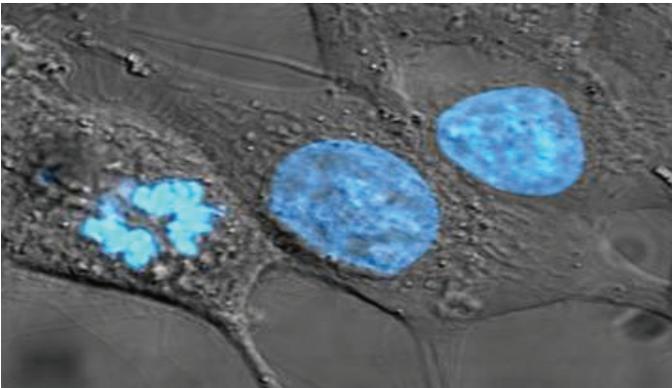
## B-Nucleus

Na biologia celular, o **núcleo** (*núcleo* pl.; do latim *nucleus* ou *nutculus*, que significa *núcleo* ou *semente*) é uma organela ligada à membrana encontrada em células eucarióticas. Os eucariotas têm geralmente um único núcleo, mas alguns tipos de células, como os glóbulos vermelhos de mamíferos, não têm núcleos, e alguns outros, incluindo os osteoclastos, têm muitos. As estruturas principais que compõem o núcleo são o envelope nuclear, uma membrana dupla que envolve toda a organela e isola o seu conteúdo do citoplasma celular; e a matriz nuclear (que inclui a lâmina nuclear), uma rede dentro do núcleo que acrescenta suporte mecânico, tal como o citoesqueleto suporta a célula como um todo.

O núcleo celular contém todo o genoma da célula, excepto a pequena quantidade de ADN mitocondrial e, nas células vegetais, o ADN plasmídeo. O ADN nuclear está organizado como múltiplas moléculas lineares longas num complexo com uma grande variedade de proteínas, tais como as histonas, para formar cromossomas. Os genes dentro destes cromossomas estão estruturados de forma a promover a função celular. O núcleo mantém a integridade dos genes e controla as actividades da célula através da regulação da expressão genética, o núcleo é, portanto, o centro de controlo da célula porque o envelope nuclear é impermeável a moléculas grandes, são necessários poros nucleares para regular o transporte nuclear das moléculas através do

envelope. Os poros atravessam ambas as membranas nucleares, fornecendo um canal através do qual moléculas maiores devem ser activamente transportadas por proteínas transportadoras, permitindo ao mesmo tempo a livre circulação de pequenas moléculas e iões. O movimento de moléculas grandes tais como proteínas e RNA através dos poros é necessário tanto para a expressão genética como para a manutenção dos cromossomas.

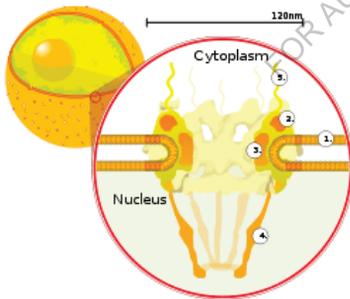
Embora o interior do núcleo não contenha quaisquer subcompartimentos ligados à membrana, o seu conteúdo não é uniforme, e existem vários corpos nucleares, constituídos por proteínas únicas, moléculas de RNA, e partes particulares dos cromossomas. O mais conhecido destes é o nucleolus, que está principalmente envolvido na montagem de ribossomas. Após serem produzidos no nucleolus, os ribossomas são exportados para o citoplasma onde traduzem o RNA mensageiro.



**Figura (26): Núcleo.**

O núcleo contém quase todo o ADN da célula, rodeado por uma rede de filamentos intermediários fibrosos e envolvido por uma membrana dupla chamada "envelope nuclear". O envelope nuclear separa o fluido dentro do núcleo, chamado nucleoplasma, do resto da célula. O tamanho do núcleo depende do tamanho da célula em que está contido, com um núcleo que ocupa tipicamente cerca de 8% do volume total da célula. O núcleo é a maior organela das células animais. Nas células de mamíferos, o diâmetro médio do núcleo é de aproximadamente 6 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

### Envelope e poros nucleares



**Figura (27): Invólucro e poros nucleares.**

Uma secção transversal de um poro nuclear na superfície do envelope nuclear (1). Outras etiquetas de diagrama mostram (2) o anel exterior, (3) raios, (4) cesto, e (5) filamentos.

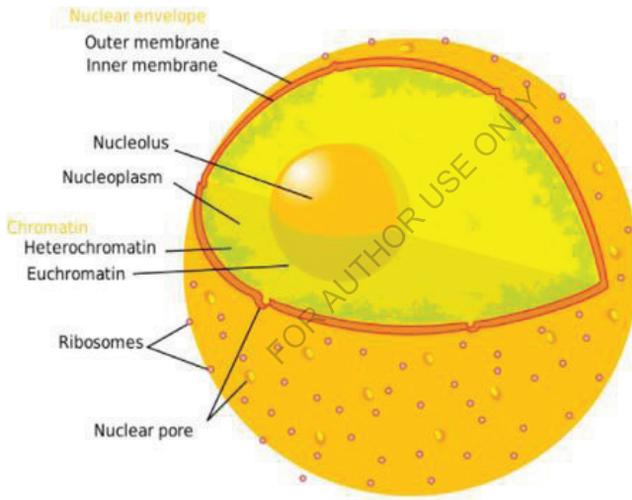
O envelope nuclear é composto por duas membranas, uma interior e uma exterior. Juntas, estas membranas servem para separar o material genético da célula do resto do seu conteúdo, e permitem ao núcleo manter um ambiente distinto do resto da célula. Apesar da sua estreita aposição em torno de grande parte do núcleo, as duas membranas diferem substancialmente em forma e conteúdo. A membrana interna envolve o conteúdo nuclear, fornecendo a sua borda definidora. Incorporadas na membrana interna, várias proteínas ligam os filamentos intermediários que dão ao núcleo a sua estrutura. A membrana externa envolve a membrana interna, e é contínua com a membrana reticulum endoplasmática adjacente. Como parte da membrana do retículo endoplásmico, a membrana nuclear externa é cravejada com ribossomas que traduzem activamente as proteínas através da membrana. O espaço entre as duas membranas, chamado "espaço perinuclear", é contínuo com o lúmen do retículo endoplásmico.

Os poros nucleares, que fornecem canais aquosos através do envelope, são compostos de múltiplas proteínas, colectivamente referidas como nucleoporinas. Os poros são cerca de 60-80 milhões de daltons em peso molecular e consistem em cerca de 50 (em levedura) a várias centenas de proteínas (em vertebrados). Os poros têm 100 nm de diâmetro total; contudo, a fenda através da qual as moléculas se difundem livremente tem apenas cerca de 9 nm de largura, devido à presença de sistemas reguladores dentro do centro

do poro. Este tamanho permite selectivamente a passagem de pequenas moléculas solúveis em água, ao mesmo tempo que evita que moléculas maiores, tais como ácidos nucleicos e proteínas maiores, entrem ou saiam inadequadamente do núcleo. Estas moléculas grandes devem, em vez disso, ser activamente transportadas para o núcleo. O núcleo de uma célula típica de mamífero terá cerca de 3000 a 4000 poros em todo o seu envelope, cada um dos quais contendo uma estrutura em forma de anel com oito vezes a mesma forma, numa posição em que as membranas interna e externa se fundem. Anexado ao anel está uma estrutura chamada **cesta nuclear** que se estende até ao nucleoplasma, e uma série de extensões filamentosas que atingem o citoplasma. Ambas as estruturas servem para mediar a ligação às proteínas de transporte nuclear.

A maioria das proteínas, subunidades ribossómicas, e alguns RNAs são transportados através dos complexos de poros num processo mediado por uma família de factores de transporte conhecidos como carioferinas. As carioferinas que medeiam o movimento para dentro do núcleo também são chamadas de importinas, enquanto que as que medeiam o movimento para fora do núcleo são chamadas de exportinas. A maioria das carioferinas interage directamente com a sua carga, embora algumas utilizem proteínas adaptadoras. As hormonas esteróides como o cortisol e aldosterona, bem como outras pequenas moléculas lipossolúveis

envolvidas na sinalização intercelular, podem difundir-se através da membrana celular e para o citoplasma, onde ligam proteínas receptoras nucleares que são traficadas para o núcleo. Aí servem como factores de transcrição quando ligadas ao seu ligando; na ausência de um ligando, muitos desses receptores funcionam como diáacetilases histónicas que reprimem a expressão genética



**Figura (28): Invólucro e poros nucleares.**

### **Lâmina nuclear**

Nas células animais, duas redes de filamentos intermédios fornecem ao núcleo o suporte mecânico: A lâmina nuclear forma uma malha organizada na face interna do envólucro, enquanto que

um suporte menos organizado é fornecido na face citosólica do envelope. Ambos os sistemas fornecem apoio estrutural ao envelope nuclear e locais de ancoragem para cromossomas e poros nucleares.

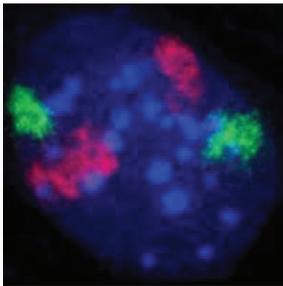
A lâmina nuclear é composta principalmente por proteínas de lamina. Como todas as proteínas, as laminas são sintetizadas no citoplasma e posteriormente transportadas para o interior do núcleo, onde são montadas antes de serem incorporadas na rede existente de lâminas nucleares. As laminas encontradas na face citosólica da membrana, como a emerina e a nesprina, ligam-se ao citoesqueleto para fornecer suporte estrutural. As laminas são também encontradas no interior do nucleoplasma onde formam outra estrutura regular, conhecida como o *véu nucleoplasmático* que é visível usando microscopia de fluorescência. A função real do véu não é clara, embora seja excluída do nucleoplasma e esteja presente durante a interfase. As estruturas de lamina que compõem o véu, como o LEM3, ligam a cromatina e perturbam a sua estrutura, inibindo a transcrição dos genes codificadores de proteínas.

Tal como os componentes de outros filamentos intermediários, o monómero da lâmina contém um domínio alfa-helical utilizado por dois monómeros para se enrolarem um ao outro, formando uma estrutura mais fraca chamada bobina enrolada. Duas destas estruturas de dímeros unem-se então lado a lado, num arranjo

antiparalelo, para formar um tetrâmero chamado *protofilamento*. Oito destes protofilamentos formam um arranjo lateral que é torcido para formar um *filamento ropelike*. Estes filamentos podem ser montados ou desmontados de uma forma dinâmica, o que significa que as alterações no comprimento do filamento dependem das taxas concorrentes de adição e remoção do filamento.

As mutações nos genes das laminas que levam a defeitos na montagem do filamento causam um grupo de doenças genéticas raras conhecidas como *laminopatias*. A laminopatia mais notável é a família de doenças conhecidas como progeria, que causa o aparecimento de envelhecimento prematuro nos seus portadores. O mecanismo exacto pelo qual as alterações bioquímicas associadas dão origem ao fenótipo de envelhecimento não é bem compreendido.

## Cromossomas



**Figura (28): Núcleo fibroblasto de um rato em que o ADN está manchado de azul. Os territórios distintos dos cromossomas do**

**cromossoma 2 (vermelho) e do cromossoma 9 (verde) estão corados com hibridização in situ fluorescente.**

O núcleo celular contém a maioria do material genético da célula sob a forma de múltiplas moléculas lineares de ADN organizadas em estruturas chamadas cromossomas. Cada célula humana contém cerca de dois metros de ADN. Durante a maior parte do ciclo celular, estes são organizados num complexo DNA-proteína conhecido como cromatina, e durante a divisão celular a cromatina pode ser vista a formar os cromossomas bem definidos, familiares a partir de um cariótipo. Uma pequena fracção dos genes da célula está localizada nas mitocôndrias.

Existem dois tipos de cromatina. A eucromatina é a forma de ADN menos compacta, e contém genes que são frequentemente expressos pela célula. O outro tipo, a heterocromatina, é a forma mais compacta, e contém ADN que é transcrito com pouca frequência. Esta estrutura é ainda categorizada em heterocromatina *facultativa*, consistindo em genes que são organizados como heterocromatina apenas em determinados tipos celulares ou em determinadas fases de desenvolvimento, e heterocromatina *constitutiva* que consiste em componentes estruturais dos cromossomas, tais como telómeros e centrómeros. Durante a interfase, a cromatina organiza-se em manchas individuais discretas chamadas *territórios cromossómicos*. Os genes activos, que se encontram geralmente na região eucromática do

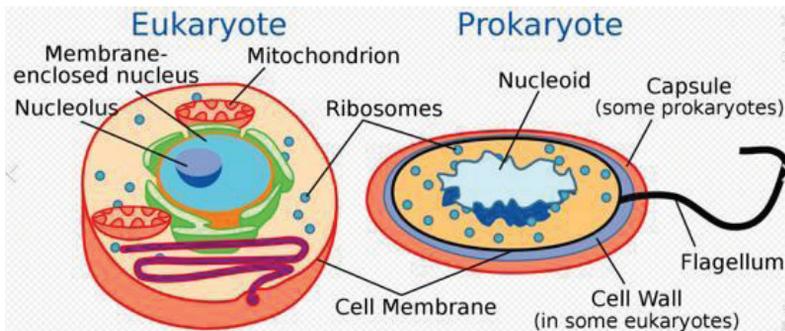
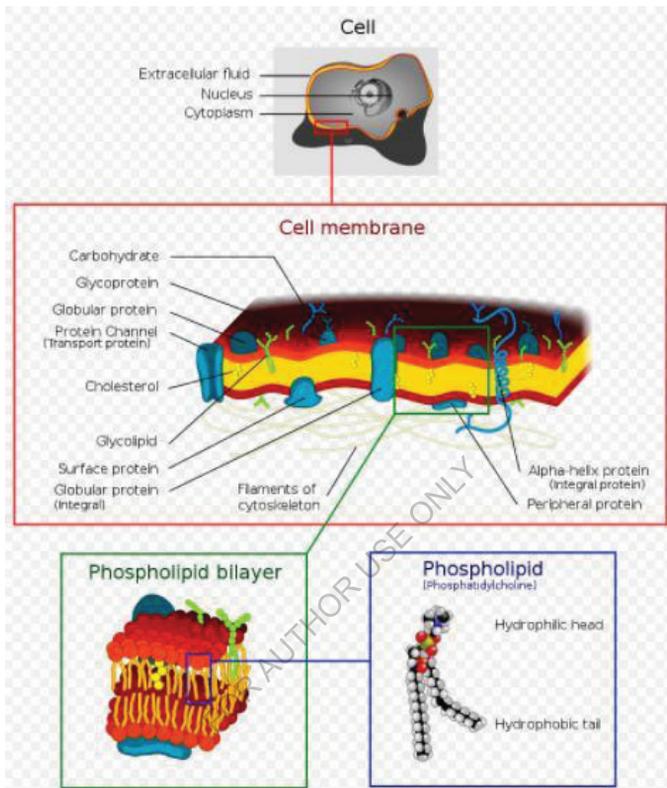
cromossoma, tendem a localizar-se em direcção ao limite do território cromossómico.

Os anticorpos para certos tipos de organização da cromatina, em particular os nucleossomas, têm sido associados a uma série de doenças auto-imunes, tais como o lúpus eritematoso sistémico. Estes são conhecidos como anticorpos anti-nucleares (ANA) e foram também observados em concertação com a esclerose múltipla como parte de uma disfunção geral do sistema imunitário.

FOR AUTHOR USE ONLY

## Membrana C-Cell

A membrana celular também conhecida como membrana plasmática (PM) ou membrana citoplasmática e historicamente referida como plasmalemma é uma membrana biológica que separa o interior de todas as células do ambiente exterior (o espaço extracelular) que protege a célula do seu ambiente. A membrana celular consiste numa camada lipídica, incluindo os colesteróis (um componente lipídico) que se encontram entre os fosfolípidos para manter a sua fluidez a várias temperaturas. A membrana também contém proteínas de membrana, incluindo proteínas integrais que atravessam a membrana servindo como transportadores de membrana e proteínas periféricas que se ligam frouxamente ao lado externo (periférico) da membrana da célula, actuando como enzimas que moldam a célula. A membrana celular controla o movimento das substâncias que entram e saem das células e organelas. Desta forma, é selectivamente permeável a iões e moléculas orgânicas.<sup>[4]</sup> Além disso, as membranas celulares estão envolvidas numa variedade de processos celulares tais como a adesão celular, condutividade iónica e sinalização celular e servem como superfície de fixação para várias estruturas extracelulares, incluindo a parede celular, a camada de hidratos de carbono chamada glicocalyx, e a rede intracelular de fibras proteicas chamada citoesqueleto. No campo da biologia sintética, as membranas celulares podem ser remontadas artificialmente.



**Figura (29): Célula eucariótica e célula procariótica.**

## Composição

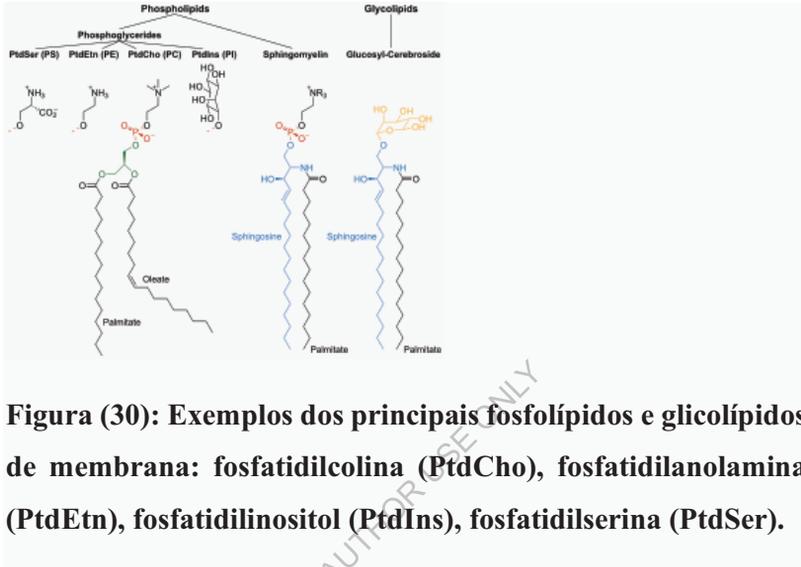
As membranas celulares contêm uma variedade de moléculas biológicas, nomeadamente lípidos e proteínas. A composição não é definida, mas está em constante mudança para fluidez e mudanças no ambiente, mesmo flutuando durante as diferentes fases de desenvolvimento celular. Especificamente, a quantidade de colesterol na membrana celular primária do neurónio humano muda, e esta mudança na composição afecta a fluidez ao longo das fases de desenvolvimento.

O material é incorporado na membrana, ou eliminado da mesma, por uma variedade de mecanismos:

- A fusão de vesículas intracelulares com a membrana (exocitose) não só excreta o conteúdo da vesícula como também incorpora os componentes da membrana da vesícula na membrana celular. A membrana pode formar bolhas em torno de material extracelular que se beliscam para se tornarem vesículas (endocitose).
- Se uma membrana é contínua com uma estrutura tubular feita de material de membrana, então o material do tubo pode ser arrastado para a membrana de forma contínua.
- Embora a concentração dos componentes da membrana na fase aquosa seja baixa (os componentes estáveis da membrana têm

baixa solubilidade na água), há uma troca de moléculas entre a fase lipídica e a aquosa.

## Lípidos



**Figura (30): Exemplos dos principais fosfolípidos e glicolípidos de membrana: fosfatidilcolina (PtdCho), fosfatidilanolamina (PtdEtn), fosfatidilinositol (PtdIns), fosfatidilserina (PtdSer).**

A membrana celular é constituída por três classes de lípidos anfípidos: fosfolípidos, glicolípidos, e esteróis. A quantidade de cada uma depende do tipo de célula, mas na maioria dos casos os fosfolípidos são os mais abundantes, contribuindo frequentemente para mais de 50% de todos os lípidos nas membranas plasmáticas. Os glicolípidos representam apenas uma quantidade ínfima de cerca de 2% e os esteróis constituem o resto. Em estudos de hemácias, 30% da membrana plasmática é lipídica. No entanto, para a maioria das células eucarióticas, a composição das membranas plasmáticas é cerca de metade de lípidos e metade de proteínas por peso.

As cadeias adiposas em fosfolípidos e glicolípidos contêm geralmente um número par de átomos de carbono, tipicamente entre 16 e 20. Os ácidos gordos de 16 e 18-carbono são os mais comuns. Os ácidos gordos podem estar saturados ou insaturados, com a configuração das ligações duplas quase sempre "cis". O comprimento e o grau de insaturação das cadeias de ácidos gordos têm um efeito profundo na fluidez da membrana, uma vez que os lípidos insaturados criam uma dobra, impedindo os ácidos gordos de se empacotarem tão apertadamente, diminuindo assim a temperatura de fusão (aumentando a fluidez) da membrana. A capacidade de alguns organismos de regular a fluidez das suas membranas celulares alterando a composição lipídica é chamada adaptação homeoviscosa.

Toda a membrana é mantida unida através da interacção não covalente de caudas hidrofóbicas, no entanto a estrutura é bastante fluida e não fixada rigidamente no lugar. Em condições fisiológicas, as moléculas de fosfolípidos na membrana celular encontram-se no estado líquido cristalino. Isto significa que as moléculas lipídicas são livres de se difundirem e exibem rápida difusão lateral ao longo da camada em que estão presentes. No entanto, a troca de moléculas de fosfolípidos entre os folhetos intracelulares e extracelulares do bico é um processo muito lento. Balsas lipídicas e caveolae são exemplos de microdomínios enriquecidos com colesterol na membrana celular. Além disso,

uma fracção do lípido em contacto directo com as proteínas da membrana integral, que está fortemente ligada à superfície proteica, é chamada casca lipídica anular; comporta-se como parte do complexo proteico.

Nas células animais, o colesterol encontra-se normalmente disperso em graus variáveis pelas membranas celulares, nos espaços irregulares entre as caudas hidrofóbicas dos lípidos das membranas, onde confere um efeito endurecedor e fortalecedor à membrana. Além disso, a quantidade de colesterol nas membranas biológicas varia entre organismos, tipos de células, e mesmo em células individuais. O colesterol, um componente importante das membranas plasmáticas animais, regula a fluidez da membrana global, o que significa que o colesterol controla a quantidade de movimento dos vários componentes da membrana celular com base nas suas concentrações. Em temperaturas elevadas, o colesterol inibe o movimento das cadeias de ácido gordo fosfolípido, causando uma permeabilidade reduzida a pequenas moléculas e uma fluidez reduzida da membrana. O oposto é verdadeiro para o papel do colesterol em temperaturas mais frias. A produção de colesterol, e portanto a concentração, é aumentada (aumentada) em resposta à temperatura fria. A temperaturas frias, o colesterol interfere com as interações da cadeia de ácidos gordos. Actuando como anticongelante, o colesterol mantém a fluidez da membrana. O colesterol é mais abundante em animais de clima frio do que em

animais de clima quente. Nas plantas, que não têm colesterol, os compostos relacionados chamados esteróis desempenham a mesma função que o colesterol.

### **Fosfolípidos formando vesículas lipídicas**

As vesículas lipídicas ou lipossomas são aproximadamente bolsas esféricas que são encerradas por um bico lipídico. Estas estruturas são utilizadas em laboratórios para estudar os efeitos dos químicos nas células, entregando estes químicos directamente à célula, bem como para obter mais informações sobre a permeabilidade da membrana celular. As vesículas lipídicas e os lipossomas são formados suspendendo primeiro um lípido numa solução aquosa e depois agitando a mistura através da sonicação, resultando numa vesícula. Ao medir a taxa de efluxo do interior da vesícula até à solução ambiente, permite ao investigador compreender melhor a permeabilidade da membrana. As vesículas podem ser formadas com moléculas e iões no interior da vesícula, formando a vesícula com a molécula ou ião desejado presente na solução. As proteínas também podem ser incorporadas na membrana através da solubilização das proteínas desejadas na presença de detergentes e da sua fixação aos fosfolípidos nos quais o lipossoma é formado. Estes proporcionam aos investigadores uma ferramenta para examinar várias funções das proteínas da membrana.

## **Hidratos de carbono**

As membranas plasmáticas também contêm hidratos de carbono, predominantemente glicoproteínas, mas com alguns glicolípidos (cerebrosídeos e gangliosídeos). Os hidratos de carbono são importantes no papel do reconhecimento de células em eucariotas; estão localizados na superfície da célula onde reconhecem células hospedeiras e partilham informação, vírus que se ligam às células utilizando estes receptores causam uma infecção. Na sua maioria, não ocorre glicosilação nas membranas dentro da célula; em geral, a glicosilação ocorre na superfície extracelular da membrana plasmática. A glicocalyx é uma característica importante em todas as células, especialmente os epitélios com microvilos. Dados recentes sugerem que a glicocalyx participa na aderência celular, na colocação de linfócitos e em muitas outras. O açúcar penúltimo é galactose e o açúcar terminal é ácido siálico, uma vez que a espinha dorsal do açúcar é modificada no aparelho Golgi. O ácido siálico transporta uma carga negativa, fornecendo uma barreira externa às partículas carregadas.

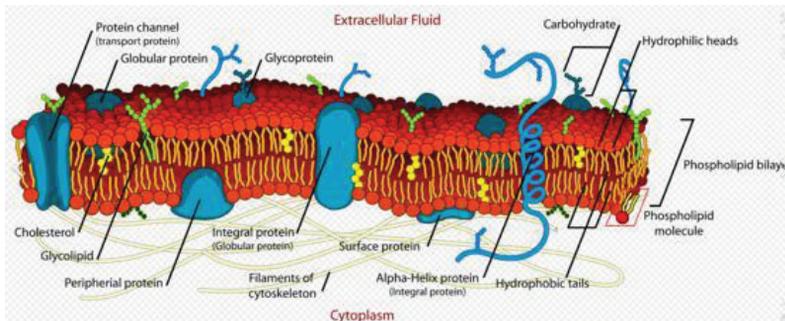
## **Proteínas**

A membrana celular tem um grande conteúdo de proteínas, normalmente cerca de 50% do volume da membrana. Estas proteínas são importantes para a célula porque são responsáveis por várias actividades biológicas. Aproximadamente um terço dos

genes em código de levedura especificamente para elas, e este número é ainda mais elevado em organismos multicelulares.<sup>[24]</sup> As proteínas de membrana consistem em três tipos principais: proteínas integrais, proteínas periféricas, e proteínas ancoradas em lípidos, as proteínas integrais são proteínas transmembranas amphipáticas. Exemplos de proteínas integrais incluem canais iônicos, bombas de prótons, e receptores acoplados à proteína g. Os canais iônicos permitem que iões inorgânicos, tais como sódio, potássio, cálcio ou cloro, se difundam pelo seu gradiente electroquímico através da camada lipídica através dos poros hidrofílicos através da membrana. O comportamento eléctrico das células, ou seja, as células nervosas são controladas por canais de iões.<sup>[4]</sup> As bombas de prótons são bombas de proteínas incorporadas no bocal lipídico que permitem aos prótons viajar através da membrana através da transferência de uma cadeia lateral de aminoácidos para outra. Processos como o transporte de electrões e a geração de ATP utilizam bombas de prótons. Um receptor acoplado à proteína G é uma única cadeia de polipéptidos que atravessa o bocal lipídico sete vezes respondendo a moléculas de sinal, ou seja, hormonas e neurotransmissores. Os receptores acoplados à proteína G são utilizados em processos tais como a sinalização célula a célula, a regulação da produção de cAMP, e a regulação dos canais de iões.

A membrana celular, estando exposta ao ambiente exterior, é um importante local de comunicação entre células. Como tal, está presente na superfície da membrana uma grande variedade de receptores de proteínas e proteínas de identificação, tais como antígenos. As funções das proteínas da membrana também podem incluir contacto célula-célula, reconhecimento de superfície, contacto citoesqueleto, sinalização, actividade enzimática, ou transporte de substâncias através da membrana.

A maioria das proteínas da membrana deve ser inserida de alguma forma na membrana. Para que isto ocorra, uma "sequência de sinal" de aminoácidos N-terminus direciona as proteínas para o retículo endoplasmático, que insere as proteínas num bocal lipídico. Uma vez inseridas, as proteínas são então transportadas para o seu destino final em vesículas, onde a vesícula se funde com a membrana alvo.



**Figura (30): Membrana plasmática.**

A membrana celular envolve o citoplasma das células vivas, separando fisicamente os componentes intracelulares do ambiente extracelular. A membrana celular também desempenha um papel na ancoragem do citoesqueleto para dar forma à célula, e na fixação à matriz extracelular e a outras células para as manter unidas para formar tecidos. Fungos, bactérias, a maioria das artérias e plantas têm também uma parede celular, que fornece um suporte mecânico à célula e impede a passagem de moléculas maiores.

A membrana celular é selectivamente permeável e capaz de regular o que entra e sai da célula, facilitando assim o transporte de materiais necessários para a sobrevivência. O movimento das substâncias através da membrana pode ser "passivo", ocorrendo sem a entrada de energia celular, ou "activo", requerendo a célula para gastar energia no seu transporte. A membrana também mantém o potencial da célula. A membrana da célula funciona assim como um filtro selectivo que permite que apenas certas coisas entrem ou saiam da célula. A célula emprega uma série de mecanismos de transporte que envolvem membranas biológicas:

1. Osmose passiva e difusão: Algumas substâncias (pequenas moléculas, iões) como o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e o oxigénio ( $\text{O}_2$ ), podem mover-se através da membrana plasmática por difusão, que é um processo de transporte passivo. Como a membrana funciona como uma barreira para certas moléculas e iões, estes podem ocorrer em diferentes concentrações nos dois

lados da membrana. A difusão ocorre quando pequenas moléculas e iões se movem livremente de alta concentração para baixa concentração, a fim de equilibrar a membrana. É considerado um processo de transporte passivo porque não requer energia e é impulsionado pelo gradiente de concentração criado por cada lado da membrana. Tal gradiente de concentração através de uma membrana semipermeável estabelece um fluxo osmótico para a água. A osmose, nos sistemas biológicos envolve um solvente, movendo-se através de uma membrana semipermeável de forma semelhante à difusão passiva, uma vez que o solvente ainda se move com o gradiente de concentração e não necessita de energia. Embora a água seja o solvente mais comum na célula, também pode ser outros líquidos, bem como líquidos e gases supercríticos.

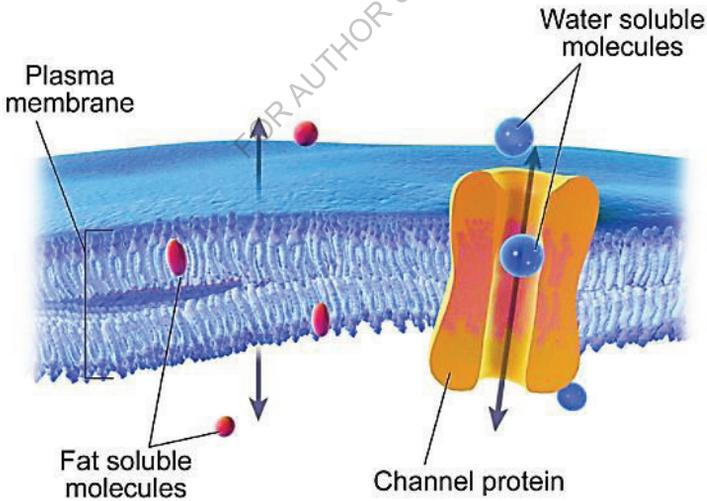
2. Canais e transportadores de proteínas transmembranas: As proteínas transmembranas estendem-se através da camada lipídica das membranas; funcionam em ambos os lados da membrana para transportar moléculas através dela. Nutrientes, tais como açúcares ou aminoácidos, devem entrar na célula, e certos produtos do metabolismo devem sair da célula. Tais moléculas podem difundir-se passivamente através de canais de proteínas, tais como aquaporinas em difusão facilitada ou são bombeadas através da membrana por transportadores de transmembranas. As proteínas dos canais proteicos, também chamadas *permeases*, são geralmente bastante específicas, e apenas reconhecem e transportam uma

variedade limitada de substâncias químicas, muitas vezes limitadas a uma única substância. Outro exemplo de uma proteína transmembrana é um receptor de superfície celular, que permite que moléculas de sinalização celular comuniquem entre células.

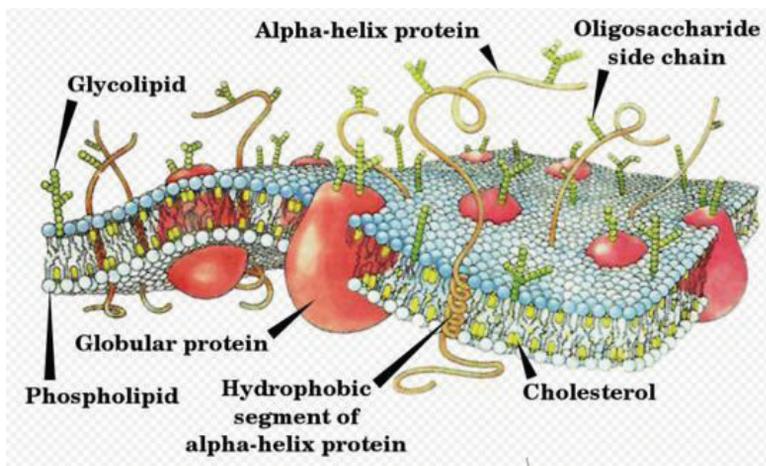
3. Endocitose: Endocitose é o processo em que as células absorvem as moléculas, engolindo-as. A membrana plasmática cria uma pequena deformação para dentro, chamada invaginação, na qual a substância a ser transportada é capturada. Esta invaginação é causada por proteínas no exterior da membrana celular, actuando como receptores e aglomerando-se em depressões que eventualmente promovem a acumulação de mais proteínas e lípidos no lado citosólico da membrana. A deformação é então pinçada da membrana no interior da célula, criando uma vesícula contendo a substância capturada. A endocitose é uma via de internalização de partículas sólidas "comendo células" ou fagocitose, pequenas moléculas e íões "bebendo células" ou pinocitose e macromoléculas. A endocitose requer energia e é, portanto, uma forma de transporte activa.

4. Exocitose: Tal como o material pode ser introduzido na célula por invaginação e formação de uma vesícula, a membrana de uma vesícula pode ser fundida com a membrana de plasma, extrudando o seu conteúdo para o meio circundante. Este é o processo de exocitose. A exocitose ocorre em várias células para remover resíduos não digeridos de substâncias trazidas pela endocitose, para

secretar substâncias tais como hormonas e enzimas, e para transportar uma substância completamente através de uma barreira celular. No processo de exocitose, o vacúolo alimentar não digerido que contém resíduos ou a vesícula secretora que brota do aparelho de Golgi, é primeiro movido pelo citoesqueleto do interior da célula para a superfície. A membrana da vesícula entra em contacto com a membrana plasmática. As moléculas lipídicas dos dois bñlis reorganizam-se e as duas membranas são, assim, fundidas. Forma-se uma passagem na membrana fundida e as vesículas descarregam o seu conteúdo fora da célula.



**Figura (31): Difusão através da membrana plasmática.**



**Figura (32): Glicolípido, proteína alfa-helix, colesterol, segmento hidrofóbico da proteína alfa-helix e cadeia lateral Oligossacarídeo da membrana plasmática.**

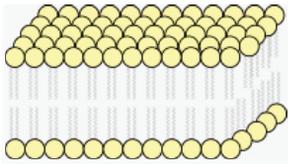
## **Estruturas**

### **Modelo de mosaico fluido**

De acordo com o modelo de mosaico fluido de S. J. Singer e G. L. Nicolson (1972), que substituiu o modelo anterior de Davson e Danielli, as membranas biológicas podem ser consideradas como um líquido bidimensional em que as moléculas lipídicas e proteicas se difundem mais ou menos facilmente. Embora as camadas lipídicas que formam a base das membranas formem de facto por si próprias líquidos bidimensionais, a membrana plasmática

também contém uma grande quantidade de proteínas, que fornecem mais estrutura. Exemplos de tais estruturas são complexos proteína-proteína, piquetes e vedações formadas pelo citoesqueleto à base de actina e potencialmente jangadas lipídicas.

### Bico lipídico



**Figura (33): Diagrama da disposição das moléculas lipídicas anfipáticas para formar uma camada lipídica. Os grupos polares amarelos da cabeça separam as caudas cinzas hidrofóbicas dos ambientes aquosos citosólicos e extracelulares.**

As camadas lipídicas formam-se através do processo de auto-montagem. A membrana celular consiste principalmente numa fina camada de fosfolípidos anfipáticos que se dispõem espontaneamente de modo a que as regiões "caudas" hidrofóbicas fiquem isoladas da água circundante enquanto as regiões "cabeças" hidrofílicas interagem com as faces intracelulares (citosólicas) e extracelulares do bico resultante. Isto forma um contínuo bocal lipídico esférico. As interações hidrofóbicas (também conhecidas como efeito hidrofóbico) são as principais forças motrizes na formação de

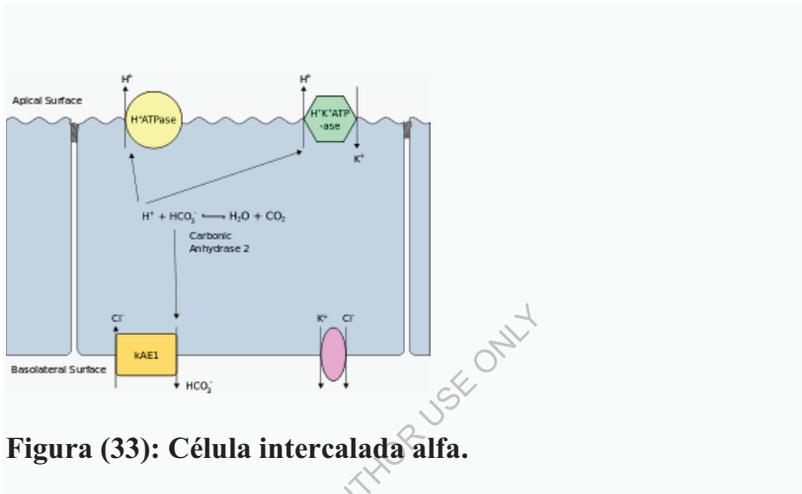
camadas de b́ilis lipídicos. Um aumento das interacções entre moléculas hidrofóbicas (causando o agrupamento de regiões hidrofóbicas) permite que as moléculas de água se liguem mais livremente umas às outras, aumentando a entropia do sistema. Esta complexa interacção pode incluir interacções não-vigalentes como van der Waals, ligações electrostáticas e de hidrogénio.

As camadas de lípidos são geralmente impermeáveis aos iões e moléculas polares. A disposição das cabeças hidrofílicas e caudas hidrofóbicas do bico lipídico impede que os solutos polares ex. aminoácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, proteínas e iões se difundam através da membrana, mas geralmente permite a difusão passiva das moléculas hidrofóbicas. Isto confere à célula a capacidade de controlar o movimento destas substâncias através de complexos proteicos transmembrana, tais como poros, canais e portões. Flippases e scramblases concentram serina fosfatidil, que transporta uma carga negativa, na membrana interna. Juntamente com o NANA, isto cria uma barreira extra para as moléculas carregadas que se movimentam através da membrana.

As membranas servem diversas funções em células eucarióticas e procarióticas. Um papel importante é regular o movimento de materiais para dentro e para fora das células. A estrutura do bocal fosfolipídeo (modelo de mosaico fluido) com proteínas de membrana específicas é responsável pela permeabilidade selectiva da membrana e pelos mecanismos de transporte passivos e activos.

Além disso, as membranas em procariotas e nas mitocôndrias e cloroplastos de eucariotas facilitam a síntese de ATP através da quimiossíntese.

### Polaridade das membranas

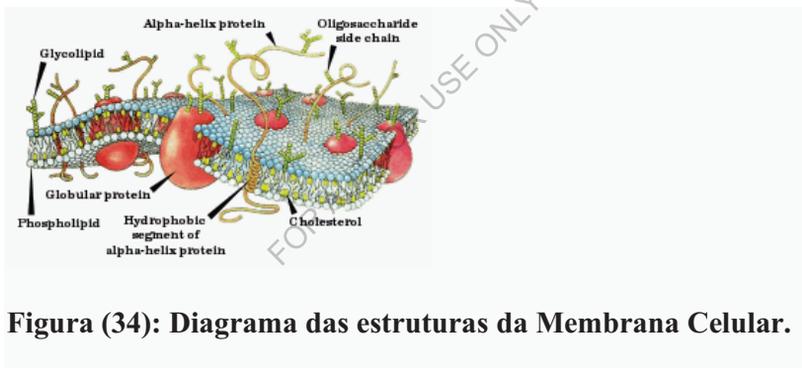


**Figura (33): Célula intercalada alfa.**

A membrana apical de uma célula polarizada é a superfície da membrana plasmática que está virada para o interior do lúmen. Isto é particularmente evidente nas células epiteliais e endoteliais, mas também descreve outras células polarizadas, tais como os neurónios. A membrana basolateral de uma célula polarizada é a superfície da membrana plasmática que forma a sua superfície basal e lateral. Está virada para o exterior, em direcção ao interstício, e afastada do lúmen. A membrana basolateral é uma frase composta que se refere aos termos "membrana basal (base)" e "membrana lateral (lateral)", que, especialmente em células epiteliais, são idênticas em composição e actividade. As proteínas

(tais como canais iônicos e bombas) são livres de se moverem da superfície basal para a superfície lateral da célula ou vice-versa, de acordo com o modelo de mosaico fluídico. Junções estreitas unem células epiteliais perto da sua superfície apical para evitar a migração de proteínas da membrana basolateral para a membrana apical. As superfícies basal e lateral permanecem assim aproximadamente equivalentes umas às outras, mas distintas da superfície apical.

### Estruturas de membranas



**Figura (34): Diagrama das estruturas da Membrana Celular.**

A membrana celular pode formar diferentes tipos de estruturas "supramembranas" tais como caveola, densidade pós-sináptica, podossoma, invadopódio, aderência focal, e diferentes tipos de junções celulares. Estas estruturas são geralmente responsáveis pela adesão celular, comunicação, endocitose e exocitose. Podem ser visualizadas por microscopia electrónica ou por microscopia de

fluorescência. São compostas por proteínas específicas, tais como integrinas e caderinas.

## **Cytoskeleton**

O citoesqueleto é encontrado subjacente à membrana celular no citoplasma e fornece um andaime para as proteínas da membrana ancorarem, bem como para formar organelas que se estendem da célula. De facto, os elementos citoesqueléticos interagem extensiva e intimamente com a membrana da célula. As proteínas de ancoragem restringem-nas a uma determinada superfície celular - por exemplo, a superfície apical das células epiteliais que revestem o intestino do vertebrado - e limitam a sua difusão no interior do bico. O citoesqueleto é capaz de formar apêndices, como organelas, tais como cílios, que são extensões baseadas em microtubos cobertos pela membrana celular e filopódios, que são extensões baseadas em actina. Estas extensões são ensaiadas em membrana e projectadas a partir da superfície da célula, a fim de detectar o ambiente externo e/ou fazer contacto com o substrato ou outras células. As superfícies apicais das células epiteliais são densas com projecções à base de actina em forma de dedos, conhecidas como microvilli, que aumentam a superfície celular e, assim, aumentam a taxa de absorção de nutrientes. O desacoplamento localizado do citoesqueleto e da membrana celular resulta na formação de uma bolha.

## Membranas intracelulares

O conteúdo da célula, dentro da membrana celular, é composto por numerosas organelas ligadas à membrana, que contribuem para a função global da célula. A origem, estrutura e função de cada organela leva a uma grande variação na composição celular devido à singularidade individual associada a cada organela.

- Considera-se que as mitocôndrias e os cloroplastos evoluíram a partir de bactérias, conhecidas como a teoria endossimbiótica. Esta teoria surgiu da ideia de que *Paracoccus* e *Rhodospseudomonas*, tipos de bactérias, partilham funções semelhantes às mitocôndrias e algas azul-esverdeadas, ou cianobactérias, partilham funções semelhantes aos cloroplastos. A teoria endossimbiótica propõe que, através do curso da evolução, uma célula eucariótica engoliu estes 2 tipos de bactérias, levando à formação de mitocôndrias e cloroplastos dentro das células eucarióticas. Este engolfamento conduziu aos 2 sistemas de membranas destas organelas, em que a membrana exterior teve origem na membrana plasmática do hospedeiro e a membrana interior foi a membrana plasmática do endossimbionte. Considerando que as mitocôndrias e os cloroplastos contêm o seu próprio ADN, ambas as organelas evoluíram a partir de bactérias engolfadas que prosperaram dentro de uma célula eucariótica.

- Nas células eucarióticas, a membrana nuclear separa o conteúdo do núcleo do citoplasma da célula. A membrana nuclear é formada por uma membrana interna e externa, proporcionando a regulação rigorosa dos materiais que entram e saem do núcleo. Os materiais movem-se entre o citosol e o núcleo através dos poros nucleares da membrana nuclear. Se o núcleo de uma célula é mais activo na transcrição, a sua membrana terá mais poros. A composição proteica do núcleo pode variar muito do citosol, uma vez que muitas proteínas são incapazes de atravessar os poros através da difusão. Dentro da membrana nuclear, as membranas interna e externa variam na composição proteica, e apenas a membrana externa é contínua com a membrana do retículo endoplasmático (ER). Tal como a ER, a membrana externa também possui ribossomas responsáveis pela produção e transporte de proteínas para o espaço entre as duas membranas. A membrana nuclear desmonta durante as fases iniciais da mitose e remonta em fases posteriores da mitose.
- O ER, que faz parte do sistema de endomembrana, que constitui uma porção muito grande do conteúdo total da membrana da célula. A ER é uma rede fechada de túbulos e sacos, e as suas principais funções incluem a síntese de proteínas, e o metabolismo lipídico. Existem 2 tipos de ER, suaves e rugosas. A ER rugosa tem ribossomas ligados a ela utilizados para a síntese de proteínas, enquanto a ER lisa é mais utilizada para o processamento de toxinas e regulação de cálcio na célula.

- O aparelho de Golgi tem duas cisternas redondas de Golgi interligadas. Os compartimentos do aparelho formam múltiplas redes tubulares-reticulares responsáveis pela organização, ligação em pilha e transporte de carga que exibem uma vesícula contínua de corda de uva que varia entre 50-60 nm. O aparelho consiste em três compartimentos principais, uma cisterna plana em forma de disco com redes tubular-reticulares e vesículas.

### **Variações**

A membrana celular tem diferentes composições lipídicas e proteicas em diferentes tipos de células e pode, portanto, ter nomes específicos para certos tipos de células.

- Sarcolemma em células musculares: Sarcolemma é o nome dado à membrana celular das células musculares. Embora o sarcolemma seja semelhante a outras membranas celulares, tem outras funções que o distinguem. Por exemplo, o sarcolemma transmite sinais sinápticos, ajuda a gerar potenciais de acção, e está muito envolvido na contracção muscular. Ao contrário de outras membranas celulares, o sarcolemma compõe pequenos canais chamados tubos T que passam através da totalidade das células musculares. Verificou-se também que o sarcolemma médio tem uma espessura de 10 nm em oposição aos 4 nm de espessura de uma membrana celular geral.

- Oolemma é a membrana celular em oócitos: O oolemma dos oócitos, (óvulos imaturos) não são consistentes com um bólido lipídico, uma vez que lhes falta um bólido e não consistem em lípidos. Pelo contrário, a estrutura tem uma camada interior, o envelope de fertilização, e o exterior é constituído pela camada vitelina, que é constituída por glicoproteínas; contudo, os canais e as proteínas ainda estão presentes pelas suas funções na membrana.
- Axolemma: A membrana plasmática especializada sobre os axónios das células nervosas, responsável pela geração do potencial de acção. É constituída por um bocal lipídico granular, densamente embalado, que trabalha de perto com os componentes do citoesqueleto espectrina e actina. Estes componentes do citoesqueleto são capazes de se ligar e interagir com as proteínas transmembrana no axolemma.

## **Permabilidade**

A permeabilidade de uma membrana é a taxa de difusão passiva das moléculas através da membrana. Estas moléculas são conhecidas como moléculas permeantes. A permeabilidade depende principalmente da carga eléctrica e da polaridade da molécula e, em menor grau, da massa molar da molécula. Devido à natureza hidrofóbica da membrana celular, pequenas moléculas electricamente neutras passam através da membrana mais

facilmente do que as grandes moléculas carregadas. A incapacidade das moléculas carregadas de passar através da membrana celular resulta na divisão do pH das substâncias em todos os compartimentos fluidos do corpo.

FOR AUTHOR USE ONLY

## D- Organelas

Em biologia celular, uma organela é uma subunidade especializada, geralmente dentro de uma célula, que tem uma função específica. O nome organela vem da ideia de que estas estruturas são partes de células, uma vez que os órgãos são para o corpo, daí organela, sendo o sufixo - organela um diminutivo. As organelas ou são encerradas separadamente dentro das suas próprias camadas lipídicas (também chamadas organelas ligadas à membrana) ou são unidades funcionais espacialmente distintas sem uma camada lipídica circundante (organelas não ligadas à membrana). Embora a maioria das organelas sejam unidades funcionais dentro das células, algumas unidades funcionais que se estendem fora das células são frequentemente denominadas organelas, tais como a cilia, o flagelo e o archaellum, e o tricócito.

As organelas são identificadas por microscopia, e também podem ser purificadas por fracionamento celular. Existem muitos tipos de organelas, particularmente em células eucarióticas. Incluem estruturas que compõem o sistema endomembrana interno (tais como o envelope nuclear, retículo endoplasmático, e aparelho de Golgi) e outras estruturas tais como mitocôndrias e plastídeos. Embora os procariotas não possuam organelas eucarióticas, alguns contêm microcompartimentos bacterianos de película proteica, que se pensa funcionarem como organelas procarióticas primitivas e há também provas de outras estruturas ligadas à membrana. Além

disso, o flagelo procariótico que se projeta fora da célula, e o seu motor, bem como o pila amplamente extracelular, são frequentemente falados como organelas.

Em biologia, os órgãos são definidos como unidades funcionais confinadas dentro de um organismo.<sup>[3]</sup> A analogia dos órgãos do corpo a subestruturas celulares microscópicas é óbvia, uma vez que, mesmo nos primeiros trabalhos, os autores dos respectivos manuais raramente se debruçam sobre a distinção entre os dois.

Na década de 1830, Félix Dujardin refutou a teoria de Ehrenberg que dizia que os microrganismos têm os mesmos órgãos de animais multicelulares, apenas menores.

Creditado como o primeiro a usar um diminutivo de órgão, por exemplo, pequeno órgão para estruturas celulares foi o zoólogo alemão Karl August Möbius (1884) que usou o termo organula (plural de organulum, o diminutivo do latim organum). Numa nota de rodapé, que foi publicada como correção no número seguinte da revista, justificou a sua sugestão de chamar "organella" aos órgãos de organismos unicelulares, uma vez que são apenas partes formadas de forma diferente de uma célula, ao contrário dos órgãos multicelulares de organismos multicelulares.

## **Tipos**

Enquanto a maioria dos biólogos celulares considera o termo organela como sinónimo de compartimento celular, um espaço frequentemente delimitado por uma ou duas camadas lipídicas, alguns biólogos celulares escolhem limitar o termo para incluir apenas os compartimentos celulares que contêm ácido desoxirribonucleico (ADN), tendo tido origem em organismos microscópicos anteriormente autónomos adquiridos através da endosimbiose.

Segundo esta definição, haveria apenas duas amplas classes de organelas, por exemplo, as que contêm o seu próprio ADN, e que têm origem em bactérias endosimbóticas:

- mitocôndria (em quase todos os eucariotas)
- plastídeos (por exemplo, em plantas, algas, e alguns protistas).

Sugere-se também que outras organelas tenham origem endosimbótica, mas não contenham o seu próprio ADN.

Uma segunda definição, menos restritiva, de organelas é que são estruturas ligadas por membranas. No entanto, mesmo utilizando esta definição, algumas partes da célula que demonstraram ser unidades funcionais distintas não se qualificam como organelas. Portanto, o uso de organelas para se referir também a estruturas não ligadas à membrana, como os ribossomas, é comum e aceite. Isto levou muitos textos a delinear entre organelas ligadas por membranas e organelas não ligadas por membranas. As organelas

não ligadas por membranas, também chamadas grandes complexos biomoleculares, são grandes conjuntos de macromoléculas que desempenham funções particulares e especializadas, mas que carecem de limites de membrana. Muitas delas são referidas como "organelas proteináceas", uma vez que a sua estrutura principal é feita de proteínas. Tais estruturas celulares incluem:

- grandes complexos de RNA e proteínas: ribossomo, spliceosomo, abóbada
- grandes complexos proteicos: proteasoma, holoenzima DNA polimerase III, holoenzima RNA polimerase II, capsids virais simétricos, complexo de GroEL e GroES; complexos proteicos de membrana: porosoma, fotossistema I, ATP synthase
- grandes complexos de ADN e proteínas: nucleosoma
- centriole e centro organizador de microtubos (MTOC)
- citoesqueleto
- flagellum
- nucleolus
- grânulo de stress
- grânulo de célula germinal
- grânulo de transporte neuronal

Os mecanismos pelos quais tais organelas não ligadas à membrana formam e mantêm a sua integridade espacial foram comparados à separação da fase líquido-líquida.

As células eucarióticas são estruturalmente complexas, e por definição são organizadas, em parte, por compartimentos interiores que são eles próprios fechados por membranas lipídicas que se assemelham à membrana celular mais externa. As organelas maiores, tais como o núcleo e os vacúolos, são facilmente visíveis com o microscópio de luz. Elas foram das primeiras descobertas biológicas feitas após a invenção do microscópio.

Nem todas as células eucarióticas têm cada uma das organelas listadas abaixo. Os organismos excepcionais têm células que não incluem algumas organelas que de outra forma poderiam ser consideradas universais às eucariotas (tais como as mitocôndrias). Existem também exceções ocasionais ao número de membranas em redor das organelas, listadas nas tabelas abaixo, por exemplo, algumas que estão listadas como de membrana dupla são por vezes encontradas com membranas simples ou triplas. Além disso, o número de organelas individuais de cada tipo encontradas numa determinada célula varia em função da função dessa célula.

Tabela (1): Principais organelas eucarióticas				
Organelle	Função principal	Estrutura	Organismos	Notas
<b>Membrana celular</b>	separa o interior de todas as células do ambiente exterior (o espaço extracelular) que protege a célula do seu ambiente.	líquido bidimensional	todos os eucariotas	

<b>Parede celular</b>	A parede celular é uma estrutura rígida composta de celulose que dá forma à célula, ajuda a manter as organelas dentro da célula, e não deixa a célula rebentar por pressão osmótica.	vários	plantas, protists, organismos cleptoplásticos raros	
<b>Chloroplast (plastídeo)</b>	fotossíntese, aprisiona a energia da luz solar	compartimento com duas membranas	plantas, protists, organismos cleptoplásticos raros	tem ADN próprio; teorizado para ser engolido pela célula eucariótica ancestral (endosymbiosi)
<b>Reticulo endoplasmico</b>	tradução e dobragem de novas proteínas (retículo endoplasmático rugoso), expressão de lípidos (retículo endoplasmico liso)	compartimento com uma única membrana	todos os eucariotas	o retículo endoplasmático rugoso é coberto com ribossomas, tem dobras que são sacos planos; o retículo endoplasmático liso tem dobras que são tubulares
<b>Flagellum</b>	locomoção, sensorial	proteína	alguns eucariotas	
<b>Aparelho Golgi</b>	triagem, embalagem, processamento e modificação de proteínas	compartimento com uma única membrana	todos os eucariotas	cis-face (convexa) mais

				próxima do retículo endoplasmático rugoso; trans-face (côncava) mais afastada do retículo endoplasmático rugoso
<b>Mitochondrion</b>	produção de energia a partir da oxidação das substâncias da glucose e da libertação de trifosfato de adenosina	compartimento com duas membranas	a maioria dos eucariotas	elemento constituinte do condrómio; tem ADN próprio; teorizado para ter sido engolido por uma célula eucariótica ancestral (endossimbiose) <sup>[20]</sup>
<b>Núcleo</b>	manutenção do ADN, controla todas as actividades da célula, transcrição do ARN	compartimento com duas membranas	todos os eucariotas	contém a maior parte do genoma
<b>Vacuole</b>	armazenamento, transporte, ajuda a manter a homeostase	compartimento com uma única membrana	eukaryotes	

Mitocôndrias e plastídeos, incluindo cloroplastos, têm membranas duplas e o seu próprio ADN. De acordo com a teoria endosymbiotic, acredita-se que tiveram origem em organismos procarióticos incompletamente consumidos ou invasores.

**Tabela (2): Organelas eucarióticas menores e componentes celulares**

Organelle/Macromolécula	Função principal	Estrutura	Organismos
<b>Acrosome</b>	ajuda os espermatozoides a fundirem-se com o óvulo	compartimento com uma única membrana	a maioria dos animais
<b>Autofagossoma</b>	vesícula que sequestra material citoplasmático e organelas para degradação	compartimento com duas membranas	todos os eucariotas
<b>Centriole</b>	âncora para o citoesqueleto, organiza a divisão celular através da formação de fibras de fuso	Proteína de microtubo	animais
<b>Cilium</b>	movimento em ou do meio externo; "via de sinalização crítica de desenvolvimento". <sup>[21]</sup>	Proteína de microtubo	animais, protists, poucas plantas

<b>Cnidocisto</b>	pungir	túbulo oco espiralado	cnidários
<b>Aparelho de visão</b>	detecta a luz, permitindo a realização de fototaxis		algas verdes e outros organismos fotossintético s unicelulares tais como os euglenídeos
<b>Glycosome</b>	realiza a glicólise	comparti mento com uma única membrana	Alguns protozoários, tais como os Trypanosom as.
<b>Glyoxysom e</b>	conversão de gordura em açúcares	comparti mento com uma única membrana	plantas
<b>Hidrogenos oma</b>	produção de energia e hidrogénio	comparti mento com duas membrana s	alguns eukaryotes unicelulares
<b>Lysosome</b>	decomposição de moléculas grandes (por exemplo, proteínas + polissacáridos)	comparti mento com uma	animais

		única membrana	
<b>Melanosome</b>	armazenamento de pigmentos	compartimento com uma única membrana	animais
<b>Mitosome</b>	provavelmente desempenha um papel na montagem do aglomerado de enxofre de ferro (Fe-S)	compartimento com duas membranas	alguns eucariotas unicelulares que carecem de mitocôndrias
<b>Myofibril</b>	contração de miócitos	filamentos empacotados	animais
<b>Nucleolus</b>	produção pré-ribossômica	proteína-DNA-RNA	a maioria dos eucariotas
<b>Ocelóide</b>	detecta luz e possivelmente formas, permitindo a realização de fototaxis	compartimento com duas membranas	membros da família Warnowiaceae
<b>Parenthosome</b>	não caracterizado	não caracterizado	fungos

<b>Peroxisoma</b>	decomposição do peróxido de hidrogénio metabólico	compartimento com uma única membrana	todos os eucariotas
<b>Porosome</b>	portal de secretariado	compartimento com uma única membrana	todos os eucariotas
<b>Proteasome</b>	degradação de proteínas desnecessárias ou danificadas por proteólise	complexo proteico muito grande	todos os eucariotas, todos os arcaicos, e algumas bactérias
<b>Ribosome (80S)</b>	tradução do ARN em proteínas	RNA-proteína	todos os eucariotas
<b>grânulo de stress</b>	armazenamento de mRNA <sup>[22]</sup>	sem membrana (complexos mRNP)	a maioria dos eucariotas
<b>Domínio TIGER</b>	proteínas codificadoras de mRNA	sem membrana	a maioria dos organismos
<b>Vesícula</b>	transporte de material	compartimento com uma	todos os eucariotas

		única membrana	
--	--	-------------------	--

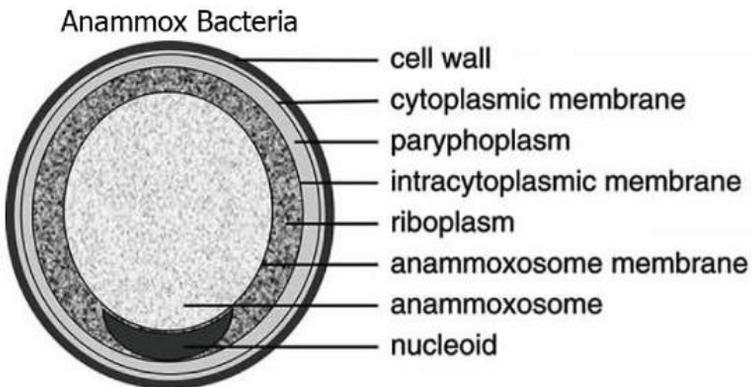
Os procariotas não são tão complexos estruturalmente como os eucariotas e outrora pensou-se que tinham pouca organização interna e faltavam compartimentos celulares e membranas internas, mas lentamente, estão a surgir detalhes sobre as estruturas internas procariotas que derrubam estes pressupostos. Uma falsa reviravolta inicial foi a ideia desenvolvida nos anos 70 de que as bactérias poderiam conter dobras de membranas celulares denominadas mesossomas, mas que mais tarde se demonstrou serem artefactos produzidos pelos químicos utilizados para preparar as células para microscopia electrónica.

No entanto, há cada vez mais provas de compartimentação em pelo menos alguns procariotas. Pesquisas recentes revelaram que pelo menos alguns procariotas têm microcompartimentos, tais como os carboxysomes. Estes compartimentos subcelulares têm 100-200 nm de diâmetro e são encerrados por uma casca de proteínas. Ainda mais marcante é a descrição de magnetosomas ligados por membranas em bactérias, relatada em 2006.

O filo bacteriano Planctomycetes revelou uma série de características de compartimentação. O plano celular do Planctomycetes inclui uma membrana intracitoplasmática que separa o citoplasma em pariplasma (um espaço exterior livre de

ribossomas) e pirelulosoma (ou riboplasma, um espaço interior que contém ribossomas). Foram descobertos anammoxomas ligados por membranas em cinco géneros Planctomycetes "anammox", que realizam a oxidação anaeróbica do amónio. Na espécie Planctomycetes Gemmata obscuriglobus, foi relatada uma estrutura do tipo núcleo rodeado por membranas lipídicas.

A compartimentação é uma característica das estruturas fotossintéticas procarióticas. As bactérias roxas têm "cromatóforos", que são centros de reação encontrados em invaginações da membrana celular. As bactérias verdes de enxofre têm clorossomas, que são complexos de antenas fotossintéticas encontradas ligadas às membranas celulares. As cianobactérias têm membranas internas tiakoides para fotossíntese dependente da luz; estudos revelaram que a membrana celular e as membranas tiakoides não são contínuas uma com a outra.



**Figura (35): Bactérias anammox.**

Tabela (3): organelas procarióticas e componentes celulares			
Organelle/ macromole cule	Função principal	Estrutura	Organismos
Anammox osome	oxidação anaeróbica do amônio	membrana lipídica de escada	Bactérias "candidatas" dentro de Planctomycetes
Carboxyso me	fixação de carbono	microcompartimento de bactérias proteicas de concha	algumas bactérias
<b><u>Chlorosom</u></b> <b>ē</b>	fotossíntese	complexo de colheita de luz ligado à membrana celular	bactérias verdes de enxofre
Flagellum	movimento em meio externo	filamento de proteínas	alguns prokaryotes
Magnetoso ma	orientação magnética	cristal inorgânico, membrana lipídica	bactérias magnetotáticas
Nucleoid	Manutenção do ADN, transcrição para RNA	DNA-proteína	prokaryotes

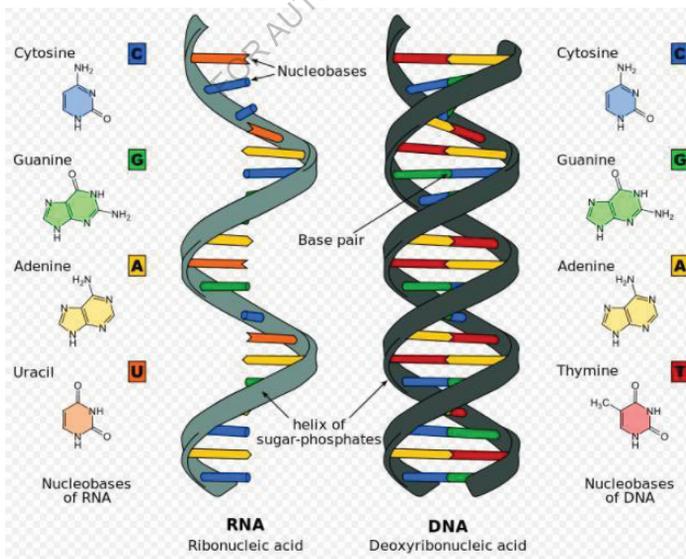
Pilus	Aderência a outras células para conjugação ou a um substrato sólido para criar forças móveis.	um apêndice semelhante a um fio de cabelo que se destaca (embora parcialmente embutido) na membrana plasmática	células procarióticas
Plasmid	Troca de ADN	ADN circular	algumas bactérias
Ribosome (70S)	tradução do ARN em proteínas	RNA-proteína	bactérias e arcaias
Membranas tilacóides	fotossíntese	proteínas e pigmentos do fotossistema	principalmente cianobactérias

## **E - Ácidos nucleicos**

Os ácidos nucleicos são biopolímeros, ou grandes biomoléculas, essenciais a todas as formas de vida conhecidas. São compostos por nucleótidos, que são os monómeros feitos de três componentes: um açúcar de 5-carbono, um grupo fosfato e uma base azotada. As duas principais classes de ácidos nucleicos são o ácido desoxirribonucleico (ADN) e o ácido ribonucleico (ARN). Se o açúcar é ribose, o polímero é RNA; se o açúcar é a desoxirribose derivada da ribose, o polímero é ADN.

Os ácidos nucleicos são compostos químicos que ocorrem naturalmente e que servem como moléculas principais de transporte de informação nas células e maquiagem do material genético. Os ácidos nucleicos são encontrados em abundância em todos os seres vivos onde criam, codificam, e depois armazenam informação de cada célula viva de cada forma de vida na Terra. Por sua vez, funcionam para transmitir e expressar essa informação dentro e fora do núcleo celular para as operações interiores da célula e, por fim, para a próxima geração de cada organismo vivo. A informação codificada é contida e transmitida através da sequência de ácido nucleico, que fornece a ordem de "escada" dos nucleótidos dentro das moléculas de RNA e ADN. Estes desempenham um papel especialmente importante na direcção da síntese proteica.

Cordas de nucleótidos são ligadas para formar espinhas dorsais helicoidais - tipicamente, uma para RNA, duas para ADN - e montadas em cadeias de pares de bases seleccionadas a partir das cinco bases primárias, ou canónicas, que são: adenina, citosina, guanina, timina, e uracil. A timina ocorre apenas no ADN e o uracilo apenas no ARN. Usando aminoácidos e o processo conhecido como síntese de proteínas,<sup>[1]</sup> a sequenciação específica no ADN destes pares de nucleobases permite armazenar e transmitir instruções codificadas como genes. No RNA, a sequenciação de pares de bases prevê o fabrico de novas proteínas que determinam os quadros e partes e a maioria dos processos químicos de todas as formas de vida.



### **Figura (36): Estruturas de ADN e ARN.**

- A Nucleína foi descoberta por Friedrich Miescher em 1869 na Universidade de Tübingen, Alemanha.
- No início da década de 1880, Albrecht Kossel purificou ainda mais a substância e descobriu as suas propriedades altamente ácidas. Mais tarde, identificou também as nucleobases.
- Em **1889** Richard Altmann cria o termo ácido nucleico
- Em **1938**, Astbury e Bell publicaram o primeiro padrão de difracção de raios X do ADN.
- Em **1944**, a experiência Avery-MacLeod-McCarty mostrou que o ADN é o portador de informação genética.
- Em **1953**, Watson e Crick apresentaram a estrutura do ADN.

Os estudos experimentais dos ácidos nucleicos constituem uma parte importante da investigação biológica e médica moderna, e formam uma base para o genoma e a ciência forense, e para as indústrias biotecnológica e farmacêutica.

Os ácidos nucleicos são geralmente moléculas muito grandes. De facto, as moléculas de ADN são provavelmente as maiores moléculas individuais conhecidas. As moléculas de ácido nucleico biológico bem estudadas variam em tamanho desde 21 nucleótidos (pequeno RNA interferente) a grandes cromossomas (o cromossoma humano 1 é uma única molécula que contém 247 milhões de pares de bases).

Na maioria dos casos, as moléculas de ADN naturais são de cadeia dupla e as moléculas de ARN são de cadeia simples. Há numerosas exceções, contudo, alguns vírus têm genomas feitos de RNA de cadeia dupla e outros vírus têm genomas de DNA de cadeia simples e, em algumas circunstâncias, podem formar-se estruturas de ácido nucleico com três ou quatro cordões.

Os ácidos nucleicos são polímeros lineares (cadeias) de nucleótidos. Cada nucleótido consiste em três componentes: uma nucleobase purina ou pirimidina (por vezes denominada *base nitrogenada* ou simplesmente *base*), um açúcar pentose, e um grupo fosfato que torna a molécula ácida. A subestrutura constituída por uma nucleobase mais açúcar é denominada nucleósido. Os tipos de ácido nucleico diferem na estrutura do açúcar nos seus nucleótidos-DNA contém 2'-deoxirribose enquanto que o RNA contém ribose (onde a única diferença é a presença de um grupo hidroxil). Além disso, as nucleobases encontradas nos dois tipos de ácido nucleico são diferentes: adenina, citosina, e guanina são encontradas tanto no RNA como no ADN, enquanto a timina ocorre no ADN e o uracilo ocorre no RNA.

Os açúcares e fosfatos nos ácidos nucleicos estão ligados entre si numa cadeia alternada (espinha dorsal de fosfato de açúcar) através de ligações fosfodiésteres. Na nomenclatura convencional, os carbonos a que os grupos fosfatos se ligam são os carbonos de

3'-fins e os carbonos de 5'-fins do açúcar. Isto dá direccionalidade aos ácidos nucleicos, e as extremidades das moléculas de ácido nucleico são referidas como 5'-extremidade e 3'-extremidade. As nucleobases são unidas aos açúcares através de uma ligação N-glicosídica envolvendo um anel nucleobase de azoto (N-1 para as pirimidinas e N-9 para as purinas) e o carbono de 1' do anel de açúcar pentose.

Os nucleósidos não-padrão também se encontram tanto no ARN como no ADN e normalmente resultam da modificação dos nucleósidos padrão dentro da molécula de ADN ou da transcrição primária (inicial) do ARN. As moléculas de RNA de transferência (tRNA) contêm um número particularmente grande de nucleósidos modificados.

- Alguns dos últimos itens foram rotulados como ácidos nucleicos quando na realidade não são ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos ocorrem nos núcleos das células, mas moléculas tais como PNAs ou Morpholinos são puramente análogos sintéticos. Devem ser rotulados como tal ou removidos desta lista por completo (embora eu pense que têm interesse suficiente para serem retidos).
- Fiz uma página "experimentando" análogos de ácido nucleico para ligar os análogos, há muitos artigos órfãos, categorizados sob a genética ou bioquímica (que se prendem com a disciplina

dos autores?). seria um "outros" decente para o modelo? Squidonius (palestra) 14:58, 20 de Novembro de 2007 (UTC) resolvido.

- cpDNA (ADN cloroplástico) deve ser adicionado; contudo ainda não há página para ele (cpDNA redirecciona para chloroplast). - tameeria (conversa) 04:28, 11 de Dezembro de 2007 (UTC)

Uma molécula de ADN ou RNA difere da outra principalmente na sequência de nucleótidos. As sequências de nucleótidos são de grande importância em biologia, uma vez que contêm as instruções finais que codificam todas as moléculas biológicas, conjuntos moleculares, estruturas subcelulares e celulares, órgãos e organismos, e permitem directamente a cognição, memória e comportamento. Enormes esforços foram investidos no desenvolvimento de métodos experimentais para determinar a sequência nucleotídica das moléculas biológicas de ADN e RNA,<sup>[24][25]</sup> e actualmente centenas de milhões de nucleótidos são sequenciados diariamente em centros de genoma e laboratórios mais pequenos em todo o mundo. Para além de manter a base de dados da sequência de ácidos nucleicos do GenBank, a NCBI fornece recursos de análise e recuperação dos dados do GenBank e outros dados biológicos disponibilizados através do website da NCBI.<sup>[26]</sup>

## Ácido desoxirribonucleico

O ácido desoxirribonucleico (ADN) é um ácido nucleico que contém as instruções genéticas utilizadas no desenvolvimento e funcionamento de todos os organismos vivos conhecidos. Os segmentos de ADN portadores desta informação genética são chamados genes. Do mesmo modo, outras sequências de ADN têm objectivos estruturais ou estão envolvidas na regulação da utilização desta informação genética. Juntamente com o ARN e as proteínas, o ADN é uma das três principais macromoléculas que são essenciais para todas as formas de vida conhecidas. O ADN consiste em dois polímeros longos de unidades simples chamadas nucleótidos, com espinhas dorsais feitas de açúcares e grupos fosfatados unidos por ligações ésteres. Estas duas cordas correm em direcções opostas uma à outra e são, portanto, antiparalelas. Anexado a cada açúcar está um de quatro tipos de moléculas chamadas nucleobases (informalmente, bases). É a sequência destas quatro nucleobases ao longo da espinha dorsal que codifica a informação. Esta informação é lida utilizando o código genético que especifica a sequência dos aminoácidos dentro das proteínas. O código é lido através da cópia de extensões de ADN para o RNA ácido nucleico relacionado, num processo chamado transcrição. Dentro das células, o ADN é organizado em estruturas longas chamadas cromossomas. Durante a divisão celular, estes cromossomas são duplicados no processo de replicação do ADN,

fornecendo a cada célula o seu próprio conjunto completo de cromossomas. Organismos eucarióticos animais, plantas, fungos e protistas armazenam a maior parte do seu ADN dentro do núcleo celular e parte do seu ADN em organelas, tais como mitocôndrias ou cloroplastos. Em contraste, os procariotas (bactérias e arqueobactérias) armazenam o seu ADN apenas no citoplasma. Dentro dos cromossomas, proteínas cromatinosas, tais como as histonas, compactam e organizam o ADN. Estas estruturas compactas guiam as interações entre o ADN e outras proteínas, ajudando a controlar quais as partes do ADN que são transcritas.

### **Ácido ribonucleico**

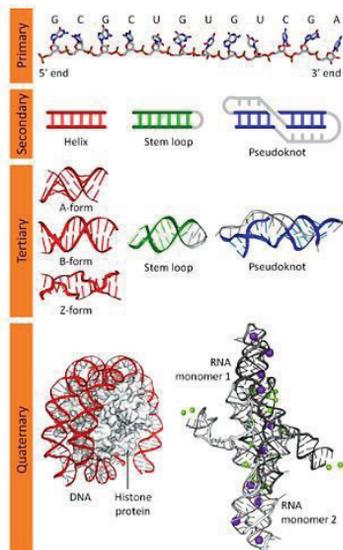
O ácido ribonucleico (RNA) funciona na conversão da informação genética dos genes em sequências de aminoácidos de proteínas. Os três tipos universais de RNA incluem RNA transferido (tRNA), RNA mensageiro (mRNA), e RNA ribossomal (rRNA). O RNA mensageiro actua para transportar informação da sequência genética entre o ADN e os ribossomas, dirigindo a síntese proteica e transporta instruções do ADN no núcleo para o ribossoma. O RNA ribossómico lê a sequência de ADN, e catalisa a formação de ligação peptídeo. O RNA transferido serve como molécula portadora de aminoácidos a serem utilizados na síntese proteica, e é responsável pela descodificação do mRNA. Além disso, muitas outras classes de RNA são agora conhecidas.

## **Ácido nucleico artificial**

Os análogos artificiais de ácido nucleico foram concebidos e sintetizados por químicos, e incluem ácido nucleico peptídeo, ácido morfolino- e ácido nucleico bloqueado, ácido nucleico glicólico, e ácido nucleico tríplice. Cada um destes é distinguido do ADN ou RNA natural por alterações na espinha dorsal das moléculas.

## **Estruturas de ácido nucleico**

A estrutura do ácido nucleico refere-se à estrutura dos ácidos nucleicos como o ADN e o ARN. Quimicamente falando, o ADN e o ARN são muito semelhantes. A estrutura dos ácidos nucleicos é frequentemente dividida em quatro níveis diferentes: primário, secundário, terciário, e quaternário.



Size of this preview: 377 x 598 pixels. Other resolutions: 151 x 240 pixels | 302 x 480 pixels | 378 x 600 pixels | 484 x 768 pixels | 1.253 x 1.989 pixels.  
 Original file (1,253 x 1,989 pixels, file size: 798 KB, MIME type: image/png)

**Figura (37): A estrutura primária consiste de uma sequência linear de nucleótidos.**

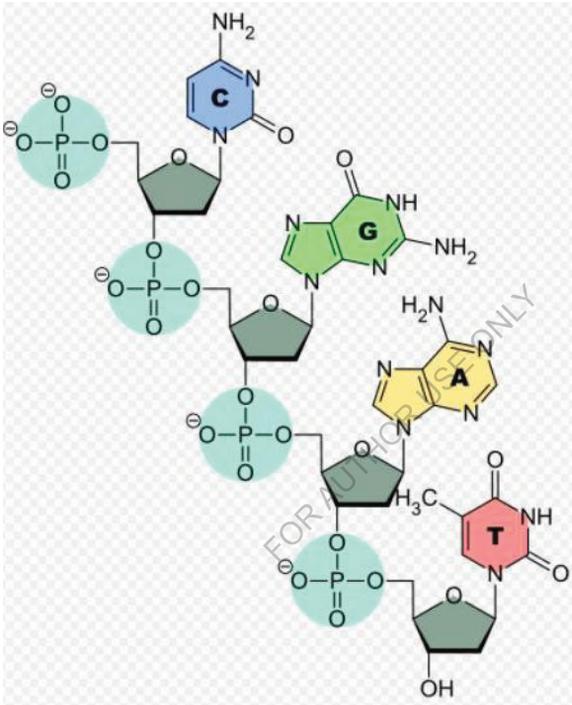
A estrutura primária consiste numa sequência linear de nucleótidos que estão ligados entre si por ligação fosfodiéster. É esta sequência linear de nucleótidos que constitui a estrutura primária do ADN ou RNA. Os nucleótidos consistem em 3 componentes:

1. Base nitrogenada
  1. Adenine
  2. Guanine
  3. Citosina

4. Thymine (presente apenas no ADN)
5. Uracil (presente apenas no RNA)
2. açúcar de 5-carbono que se chama deoxirribose (encontrado no ADN) e ribose (encontrado no ARN).
3. Um ou mais grupos de fosfatos.<sup>[1]</sup>

As bases nitrogenadas adenina e guanina são purinas em estrutura e formam uma ligação glicosídica entre o seu 9 nitrogénio e o grupo 1' -OH da desoxirribose. Citosina, timina, e uracil são pirimidinas, daí as ligações glicosídicas formarem entre o seu 1 nitrogénio e o 1' -OH da desoxirribose. Tanto para as bases purina como pirimidina, o grupo fosfato forma uma ligação com o açúcar de desoxirribose através de uma ligação de éster entre um dos seus grupos de oxigénio carregado negativamente e o 5' -OH do açúcar. A polaridade no ADN e RNA é derivada dos átomos de oxigénio e azoto na espinha dorsal. Os ácidos nucleicos formam-se quando os nucleótidos se juntam através de ligações fosfodiésteres entre os átomos de carbono de 5' -OH e 3' -OH. Uma sequência de ácidos nucleicos é a ordem dos nucleótidos dentro de uma molécula de ADN (GACT) ou RNA (GACU) que é determinada por uma série de letras. As sequências são apresentadas da extremidade de 5' a 3' e determinam a estrutura covalente de toda a molécula. As sequências podem ser complementares a outra sequência, na medida em que a base em cada posição é complementar, bem como na ordem inversa. Um exemplo de uma sequência complementar à

AGCT é o TCGA. O ADN é de dupla cadeia contendo tanto uma cadeia de sentido como uma cadeia antisense. Por conseguinte, a sequência complementar será para a vertente de sentido.



**Figura (38): Estruturas de base nitrogenada.**

## ADN

A estrutura secundária é o conjunto de interações entre bases, ou seja, que partes dos fios estão ligadas umas às outras. Na dupla

hélice do ADN, as duas vertentes de ADN são mantidas juntas por ligações de hidrogénio. Os nucleótidos de um par de bases de um cordão com o nucleótido do outro cordão. A estrutura secundária é responsável pela forma que o ácido nucléico assume. As bases no ADN são classificadas como purinas e pirimidinas. As purinas são adenina e guanina. As purinas consistem numa estrutura de anel duplo, um anel de seis membros e um anel de cinco membros contendo azoto. As pirimidinas são a citosina e a timina. Tem uma estrutura de anel único, um anel de seis membros contendo nitrogénio. Uma base purina sempre em pares com uma base pirimidina (guanina (G) em pares com citosina (C) e adenina (A) em pares com timina (T) ou uracil (U)). A estrutura secundária do ADN é predominantemente determinada pelo emparelhamento de base dos dois fios de polinucleótidos enrolados um ao outro para formar uma dupla hélice. Embora as duas cordas estejam alinhadas por ligações de hidrogénio em pares de bases, as forças mais fortes que mantêm as duas cordas juntas são as interações de empilhamento entre as bases. Estas interações de empilhamento são estabilizadas por forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, e mostram uma grande variabilidade estrutural local. Há também duas ranhuras na dupla hélice, que são chamadas ranhura maior e ranhura menor, com base no seu tamanho relativo.

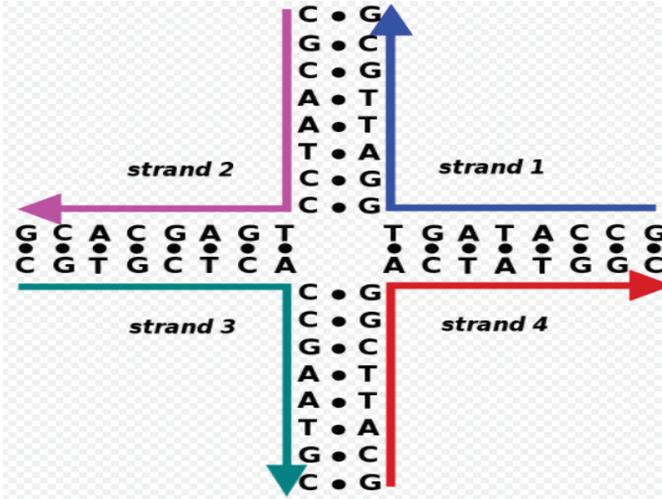
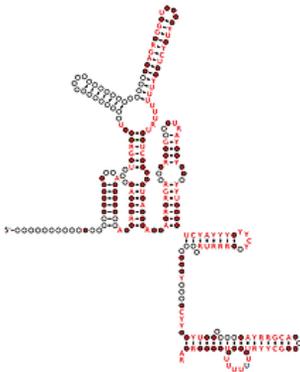


Figura (39): Cordão 1, cordão 2, cordão 3 e cordão 4 de ácido nucleico (ADN).

## RNA



### **Figura (40): Estrutura secundária do ARN.**

Um exemplo de estrutura secundária do ARN. Esta imagem inclui vários elementos estruturais, incluindo; áreas de fio simples e de fio duplo, bojos, loops internos e loops de gancho de cabelo. O RNA de dupla corda forma uma estrutura helicoidal do tipo A, ao contrário da conformação comum do tipo B tomada pelas moléculas de ADN de dupla corda.

A estrutura secundária do RNA consiste de um único polinucleótido. O emparelhamento básico no RNA ocorre quando o RNA se dobra entre regiões de complementaridade. Tanto as regiões de cordão simples como as de cordão duplo são frequentemente encontradas em moléculas de RNA.

Os quatro elementos básicos na estrutura secundária do RNA são:

- **Helices**
- **Bulges**
- **Laços**
- **Junções**

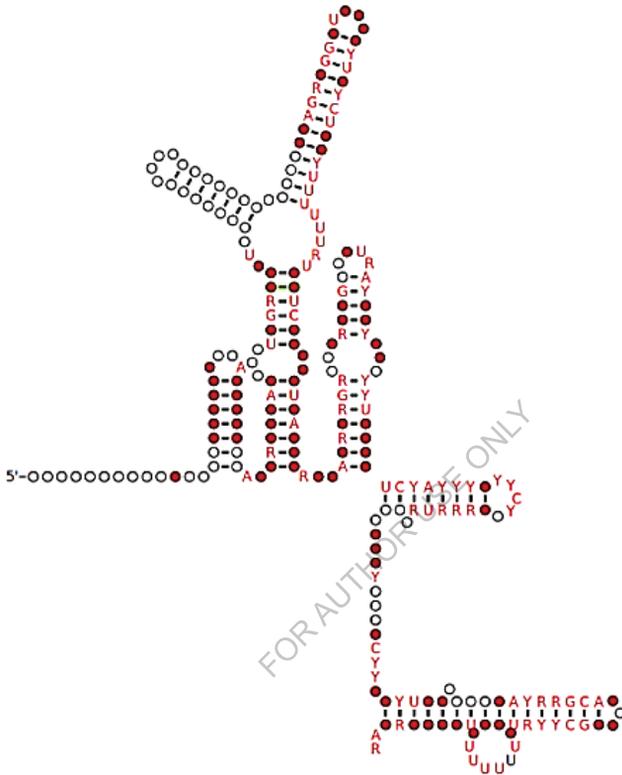
Os cordões antiparalelos formam uma forma helicoidal.<sup>[3]</sup> Os bojos e os loops internos são formados pela separação do tracto helicoidal duplo num dos fios (bulge) ou em ambos os fios (loops internos) por nucleótidos não emparelhados.

O laço de haste ou laço de gancho capilar é o elemento mais comum da estrutura secundária do ARN. O loop de haste é formado quando as cadeias de ARN se dobram sobre si próprias para formar um tracto helicoidal duplo chamado "haste", os nucleótidos não emparelhados formam uma única região encalhada chamada "loop". Um tetraloop é uma estrutura de RNA com quatro pares de bases de RNA. Há três famílias comuns de tetraloop em RNA ribossomal: UNCG, GNRA e CUUG (*N* é um dos quatro nucleótidos e *R* é um purina). O UNCG é o tetraloop mais estável.

Pseudoknot é uma estrutura secundária de ARN identificada pela primeira vez no vírus do mosaico amarelo nabo. Os pseudo nós são formados quando os nucleótidos do par de fios de cabelo são formados com uma única região de fios fora do fio de cabelo para formar um segmento helicoidal. Os pseudo nós de pregas do tipo H são melhor caracterizados. Na dobra do tipo H, os nucleótidos do par de fios de cabelo com as bases fora da haste do fio de cabelo formam uma segunda haste e um laço. Isto causa a formação de pseudo nós com duas hastes e dois loops. Os pseudo nós são elementos funcionais na estrutura do RNA que têm funções diversas e que se encontram na maioria das classes de RNA.

A estrutura secundária do ARN pode ser prevista por dados experimentais sobre os elementos da estrutura secundária, helices, loops, e bulges. O método DotKnot-PW é utilizado para a previsão comparativa de pseudo nós. Os pontos principais no método

DotKnot-PW são a pontuação das semelhanças encontradas em hastes, elementos secundários e pseudo nós do tipo H.



**Figura (41): Estrutura terciária do RNA.**

A estrutura terciária refere-se à localização dos átomos no espaço tridimensional, tendo em consideração os constrangimentos geométricos e estéreis. É uma ordem superior à da estrutura secundária, na qual ocorre uma dobragem em grande escala num polímero linear e toda a cadeia é dobrada numa forma

tridimensional específica. Existem 4 áreas em que as formas estruturais do ADN podem diferir.

1. Mão - direita ou esquerda
2. Comprimento da curva da hélice
3. Número de pares de bases por volta
4. Diferença no tamanho entre as ranhuras maiores e menores<sup>[3]</sup>

A disposição terciária da dupla hélice do ADN no espaço inclui B-DNA, A-DNA, e Z-DNA.

O B-DNA é a forma mais comum de ADN in vivo e é uma hélice mais estreita e alongada do que o A-DNA. A sua grande ranhura larga torna-o mais acessível às proteínas. Por outro lado, tem uma ranhura menor estreita. As conformações favorecidas do B-DNA ocorrem em altas concentrações de água; a hidratação da ranhura menor parece favorecer o B-DNA. Os pares de bases de B-DNA são quase perpendiculares ao eixo da hélice. A broca de açúcar que determina a forma da hélice A, quer a hélice exista na forma A ou na forma B, ocorre no ponto C2'-endo.

A-DNA, é uma forma do ADN duplex observado em condições de desidratação. É mais curto e mais largo do que o B-DNA. O RNA adopta esta forma helicoidal dupla, e os duplex de RNA-DNA são maioritariamente de forma A, mas foram observados duplex de RNA-DNA de forma B. Em contextos localizados de

dinucleótidos de fio único, o RNA também pode adotar a forma B sem emparelhar com o ADN. O A-DNA tem uma ranhura maior profunda e estreita que não o torna facilmente acessível às proteínas. Por outro lado, o seu sulco largo e pouco profundo torna-o acessível às proteínas, mas com um conteúdo de informação inferior ao do sulco principal. A sua conformação favorecida está em baixas concentrações de água. Os pares de bases A-DNAs são inclinados em relação ao eixo da hélice, e são deslocados do eixo. O empurrador de açúcar ocorre no C3'-endo e no RNA 2'-OH inibe a conformação C2'-endo.<sup>[14]</sup> Há muito considerado pouco mais do que um artifício de laboratório, o A-DNA é agora conhecido por ter várias funções biológicas.

Z-DNA é uma dupla hélice relativamente rara de canhoto. Dada a sequência adequada e a tensão super-helical, pode ser formada in vivo, mas a sua função não é clara. Tem uma hélice mais estreita, mais alongada do que A ou B. A ranhura maior do Z-DNA não é realmente uma ranhura, e tem uma ranhura menor estreita. A conformação mais favorecida ocorre quando há altas concentrações de sal. Há algumas substituições de base mas requerem uma sequência alternada de purina-pirimidina. O N2-amino das ligações G H a 5' PO, o que explica a lenta troca de protões e a necessidade da purina G. Os pares de bases Z-DNA são quase perpendiculares ao eixo da hélice. Z-DNA não contém pares de base únicos, mas sim uma repetição GpC com distâncias P-P

variáveis para GpC e CpG. Na pilha de GpC há uma boa sobreposição de bases, enquanto na pilha de CpG há menos sobreposição. A espinha dorsal em zigzag do Z-DNA deve-se à conformação do açúcar C, que compensa a conformação da ligação glicosídica G. A conformação de G é sincronia, C2'-endo; para C é anti, C3'-endo.

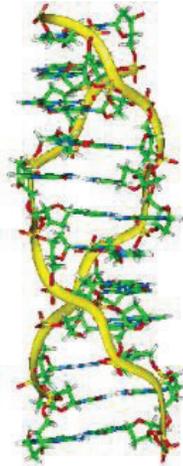
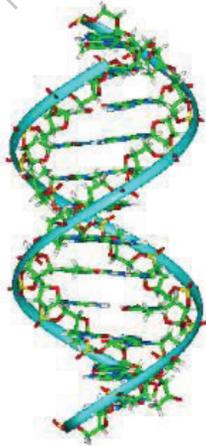
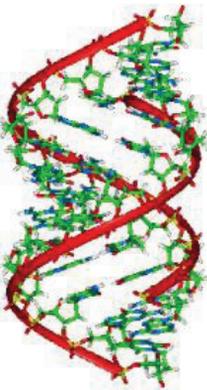
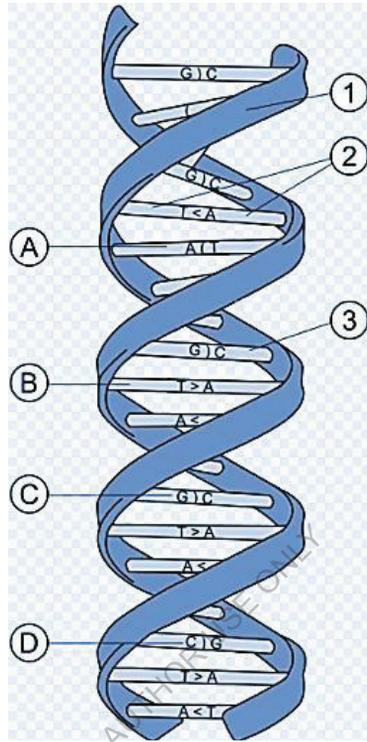
Uma molécula de ADN linear com extremidades livres pode rodar, para se ajustar às mudanças de vários processos dinâmicos na célula, alterando quantas vezes as duas cadeias da sua dupla hélice giram uma em torno da outra. Algumas moléculas de ADN são circulares e estão condicionadas topologicamente. Mais recentemente o RNA circular também foi descrito como sendo uma classe natural de ácidos nucleicos, expressa em muitos organismos.

Um DNA circular, covalentemente fechado, também conhecido como cccDNA é topologicamente limitado uma vez que o número de vezes que as cadeias se enrolam em torno de uma outra não pode mudar. Este cccDNA pode ser super enrolado, que é a estrutura terciária do ADN. O super-enrolamento é caracterizado pelo número de ligação, torção e escrita. O número de ligação (Lk) do ADN circular é definido como o número de vezes que uma cadeia teria de passar através da outra para separar completamente as duas cadeias. O número de ligação para ADN circular só pode ser alterado através da quebra de uma ligação covalente numa das duas

cordas. Sempre um inteiro, o número de ligação de um cccDNA é a soma de dois componentes: torções ( $T_w$ ) e contorções ( $W_r$ ).

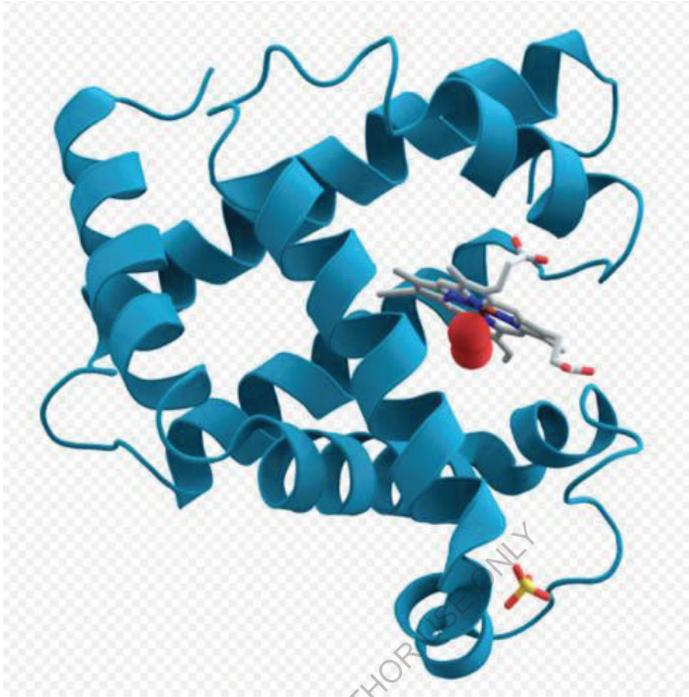
As torções são o número de vezes que as duas vertentes de ADN são torcidas uma à outra. As contorções são o número de vezes que a hélice de ADN se atravessa a si própria. O ADN nas células é negativamente super enrolado e tem a tendência para se desenrolar. Assim, a separação das cordas é mais fácil no ADN negativamente super-branqueado do que no ADN relaxado. Os dois componentes do ADN super-recozido são solenóide e plectonémico. A superbobina plectonémica é encontrada em procariotas, enquanto que a superbobina solenoidal é vista principalmente em eucariotas.

FOR AUTHOR USE ONLY



**Figura (42): Estrutura quaternária do ácido nucleico.**

A estrutura quaternária dos ácidos nucleicos é semelhante à da estrutura quaternária das proteínas. Embora alguns dos conceitos não sejam exactamente os mesmos, a estrutura quaternária refere-se a um nível superior de organização dos ácidos nucleicos. Além disso, refere-se a interacções dos ácidos nucleicos com outras moléculas. A forma mais comumente vista de organização de nível mais elevado dos ácidos nucleicos é vista na forma de cromatina que leva às suas interacções com as pequenas histórias de proteínas. Além disso, a estrutura quaternária refere-se às interacções entre unidades de RNA separadas no ribossoma ou spliceosoma .



**Figura (43): Estrutura quaternária do ácido nucleico.**

Os métodos de ácido nucleico são as técnicas utilizadas para estudar os ácidos nucleicos: ADN e ARN.

- Purificação
- Extracção de ADN
- Extracção de fenol-clorofórmio
- Purificação de minicolunas
- Extracção de ARN
- Método Boom
- Coeficiente síncrono de alteração de arrastamento (SCODA)  
Purificação do ADN

### **Quantificação**

- Abundância em peso: quantificação espectroscópica do ácido nucleico
- Abundância absoluta em número: reacção em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativa)
- Abundância relativa de alto rendimento: Microarranjo de ADN
- Abundância absoluta de alto rendimento: análise em série da expressão genética (SAGE)
- Tamanho: electroforese em gel

## Síntese

- *De novo*: síntese de oligonucleotídeos
- Amplificação: reacção em cadeia da polimerase (PCR).

## Cinética

- Ressonância plasmónica de superfície multi-paramétrica
- Interferometria de dupla polarização
- Microbalança de cristal de quartzo com monitorização da dissipação (QCM-D).

## Função Gene

### Interferência do ARN

## Outros

- Sequenciação de bissulfitos
- Sequenciação de ADN
- Clonagem por expressão
- Fluorescência hibridização in situ
- Lab-on-a-chip

- Comparação de software de simulação de ácido nucleico
- Mancha do Norte
- Ensaio de funcionamento nuclear
- Radioactividade nas ciências da vida
- Mancha do Sul
- Centrífuga diferencial (gradiente de sacarose)
- Ensaio de impressão do dedo do pé
- Vários métodos bioinformáticos, como se pode ver na lista de software de previsão de estrutura RNA

### **Técnica utilizada em genética molecular**

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é um método amplamente utilizado para fazer rapidamente milhões a biliões de cópias (cópias completas ou parciais) de uma amostra específica de ADN, permitindo aos cientistas colher uma amostra muito pequena de ADN e amplificá-la (ou uma parte dela) a uma quantidade suficientemente grande para ser estudada em pormenor. A PCR foi inventada em 1983 pelo bioquímico americano Kary Mullis na Cetus Corporation. É fundamental para muitos dos procedimentos utilizados em testes e investigação genética, incluindo a análise de amostras antigas de ADN e a identificação de agentes infecciosos. Utilizando a PCR, cópias de quantidades muito pequenas de seqüências de ADN são exponencialmente amplificadas numa série de ciclos de alterações de temperatura. A PCR é agora uma

técnica comum e frequentemente indispensável utilizada na investigação laboratorial médica para uma ampla variedade de aplicações, incluindo a investigação biomédica e a investigação criminal forense.

A maioria dos métodos de PCR depende do ciclismo térmico. O ciclo térmico expõe os reagentes a ciclos repetidos de aquecimento e arrefecimento para permitir diferentes reacções especificamente dependentes da temperatura, derretimento do ADN e replicação de ADN enzimático. A PCR emprega dois reagentes principais - primários que são fragmentos curtos de ADN de cadeia única conhecidos como oligonucleótidos que são uma sequência complementar à região de ADN alvo e uma DNA polimerase. Na primeira etapa da PCR, as duas vertentes da dupla hélice do ADN são separadas fisicamente a uma temperatura elevada num processo chamado desnaturação do ácido nucleico. Na segunda etapa, a temperatura é baixada e os iniciadores ligam-se às sequências complementares do ADN. As duas cadeias de ADN tornam-se então modelos para a polimerase do ADN, a fim de montar enzimaticamente uma nova cadeia de ADN a partir de nucleótidos livres, os blocos de construção do ADN. À medida que a PCR progride, o ADN gerado é ele próprio utilizado como modelo para replicação, desencadeando uma reacção em cadeia na qual o modelo original de ADN é exponencialmente amplificado.

Quase todas as aplicações de PCR utilizam uma polimerase de ADN termo-estável, como a *Taq* polimerase, uma enzima originalmente isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. Se a polimerase utilizada fosse termo-susceptível, desnaturaria sob as altas temperaturas da etapa de desnaturação. Antes da utilização da *Taq* polimerase, a DNA polimerase tinha de ser adicionada manualmente a cada ciclo, o que era um processo fastidioso e dispendioso.

As aplicações da técnica incluem a clonagem de ADN para sequenciação, clonagem e manipulação de genes, mutagénesse genética; construção de filogenias baseadas no ADN, ou análise funcional de genes; diagnóstico e monitorização de doenças genéticas; amplificação de ADN antigo, análise de impressões digitais genéticas para a caracterização do ADN (por exemplo, em ciência forense e testes de parentesco); e detecção de agentes patogénicos em testes de ácido nucleico para o diagnóstico de doenças infecciosas.



**Figura (44): A PCR amplifica uma região específica de uma fita de ADN.**

### **Princípios**

A PCR amplifica uma região específica de uma fita de ADN (o alvo de ADN). A maioria dos métodos de PCR amplifica fragmentos de ADN com comprimento entre 0,1 e 10 kbp, embora algumas técnicas permitam a amplificação de fragmentos até 40 kbp. A quantidade de produto amplificado é determinada pelos substratos disponíveis na reacção, que se torna limitada à medida que a reacção progride.

Uma instalação básica de PCR requer vários componentes e reagentes, incluindo:

- Modelo de ADN que contém a região alvo de ADN a amplificar.
- DNA polimerase uma enzima que polimeriza novos fios de ADN; a *Taq* polimerase resistente ao calor é especialmente comum, pois é mais provável que se mantenha intacta durante o processo de desnaturação do ADN a altas temperaturas.
- Dois primários de ADN que são complementares aos 3' (três primários) de cada uma das vertentes de sentido e anti-senso do ADN alvo (a DNA polimerase só pode ligar-se e alongar-se a partir de uma região de dupla cadeia de ADN; sem primários, não há um local de iniciação de dupla cadeia em que a polimerase possa ligar-se), os primários específicos que são complementares à região de ADN alvo são seleccionados previamente, e são muitas vezes feitos à medida num laboratório ou comprados a fornecedores bioquímicos comerciais.
- trifosfatos de desoxinucleótidos ou dNTPs, por vezes chamados trifosfatos de desoxinucleótidos, nucleótidos contendo grupos de trifosfato, os blocos de construção a partir dos quais a DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia de ADN
- uma solução tampão que proporciona um ambiente químico adequado para uma óptima actividade e estabilidade da DNA polimerase

- catiões bivalentes, normalmente iões de magnésio (Mg) ou de manganês (Mn); o  $Mg^{2+}$  é o mais comum, mas o  $Mn^{2+}$  pode ser utilizado para a mutagénesse do ADN mediada por PCR, uma vez que uma concentração mais elevada de  $Mn^{2+}$  aumenta a taxa de erro durante a síntese do ADN e *catiões monovalentes*, normalmente iões de potássio (K).

A reacção é geralmente realizada num volume de 10-200  $\mu$ L em pequenos tubos de reacção (volumes de 0,2-0,5 mL) num termociclador. O termociclador aquece e arrefece os tubos de reacção para atingir as temperaturas necessárias em cada etapa da reacção. Muitos termocicladores modernos fazem uso do efeito Peltier, que permite tanto o aquecimento como o arrefecimento do bloco que retém os tubos PCR, simplesmente invertendo a corrente eléctrica. Os tubos de reacção de parede fina permitem uma condutividade térmica favorável para permitir um rápido equilíbrio térmico. A maioria dos termocicladores têm tampas aquecidas para evitar a condensação na parte superior do tubo de reacção. Os termocicladores mais antigos sem tampa aquecida requerem uma camada de óleo no topo da mistura de reacção ou uma bola de cera no interior do tubo.



**Figura (45):** Tipicamente, a PCR consiste numa série de 20-40 mudanças de temperatura repetidas chamadas ciclos térmicos.

### **Procedimento**

Tipicamente, a PCR consiste numa série de 20-40 mudanças de temperatura repetidas, chamadas ciclos térmicos, sendo cada ciclo geralmente constituído por dois ou três passos de temperatura discretos (ver figura abaixo). O ciclo é frequentemente precedido por um único passo de temperatura a uma temperatura muito elevada ( $>90\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $194\text{ }^{\circ}\text{F}$ )), e seguido por um reter no final para extensão do produto final ou breve armazenamento. As temperaturas utilizadas e a duração da sua aplicação em cada ciclo

dependem de uma variedade de parâmetros, incluindo a enzima utilizada para a síntese do ADN, a concentração de iões bivalentes e dNTPs na reacção, e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos iniciadores. As etapas individuais comuns à maioria dos métodos de PCR são as seguintes:

- Inicialização: Esta etapa só é necessária para as polimerases de ADN que requerem activação de calor por PCR de arranque a quente. Consiste em aquecer a câmara de reacção a uma temperatura de 94-96 °C (201-205 °F), ou 98 °C (208 °F) se forem utilizadas polimerases extremamente termoestáveis, que é depois mantida durante 1-10 minutos.
- Desnaturação: Esta etapa é a primeira prova de ciclismo regular e consiste em aquecer a câmara de reacção a 94-98 °C (201-208 °F) durante 20-30 segundos. Isto provoca o derretimento, ou desnaturação do modelo de ADN de cadeia dupla, quebrando as ligações de hidrogénio entre bases complementares, produzindo duas moléculas de ADN de cadeia simples.
- Recozimento: No passo seguinte, a temperatura de reacção é reduzida para 50-65 °C (122-149 °F) durante 20-40 segundos, permitindo o recozimento dos primários para cada um dos modelos de ADN de fio único. Dois iniciadores diferentes são tipicamente incluídos na mistura de reacção: um para cada um dos dois complementos de corda única contendo a região alvo. Os iniciadores são sequências de corda única em si, mas são

muito mais curtos do que o comprimento da região alvo, complementando apenas sequências muito curtas no final de cada filamento 3'.

É fundamental determinar uma temperatura adequada para a etapa de recozimento porque a eficiência e a especificidade são fortemente afectadas pela temperatura de recozimento. Esta temperatura deve ser suficientemente baixa para permitir a hibridação do primário ao cordão, mas suficientemente alta para que a hibridação seja específica, por exemplo, o primário deve ligar-se apenas a uma parte perfeitamente complementar do cordão, e em nenhum outro lugar. Se a temperatura for demasiado baixa, a pré-camada pode ligar-se imperfeitamente. Se for demasiado alta, a pré-camada pode não se ligar de todo. Uma temperatura típica de recozimento é cerca de 3-5 °C abaixo do  $T_m$  dos primários utilizados. As ligações estáveis de hidrogénio entre bases complementares são formadas apenas quando a sequência de primer coincide muito de perto com a sequência do modelo. Durante esta etapa, a polimerase liga-se ao híbrido primer-template e inicia a formação de ADN.

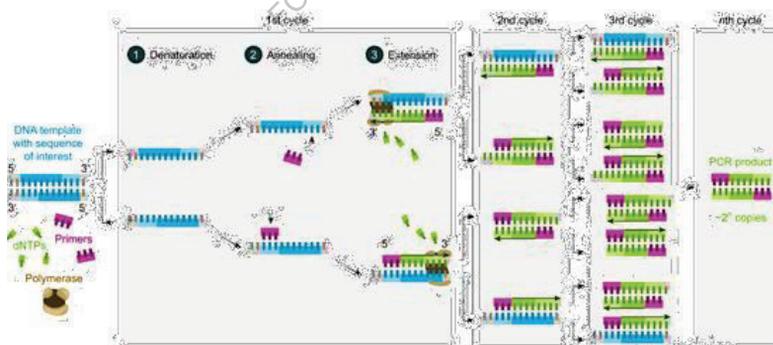
- Extensão/elongamento: A temperatura nesta etapa depende da DNA polimerase utilizada; a temperatura óptima de actividade para a DNA polimerase termoestável da *Taq* polimerase é aproximadamente 75-80 °C (167-176 °F),<sup>[13][14]</sup> embora uma temperatura de 72 °C (162 °F) seja normalmente

utilizada com esta enzima. Nesta etapa, a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de ADN complementar à fita de ADN modelo, adicionando dNTPs livres da mistura de reacção complementar ao modelo na direcção 5'-para-3', condensando o grupo 5'-fosfato dos dNTPs com o grupo 3'-hidroxi no final da fita de ADN nascente (elongante). O tempo exacto necessário para o alongamento depende tanto da polimerase de ADN utilizada como do comprimento da região alvo de ADN a amplificar. Como regra geral, à sua temperatura óptima, a maioria das polimerases de ADN polimerizam mil bases por minuto. Em condições óptimas, por exemplo, se não houver limitações devido à limitação de substratos ou reagentes em cada etapa de extensão/alongamento, o número de sequências alvo de ADN é duplicado. Em cada ciclo sucessivo, as vertentes de modelo original mais todas as vertentes recém-geradas tornam-se vertentes de modelo para o próximo ciclo de alongamento, levando a uma amplificação exponencial (geométrica) da região alvo específica de ADN.

Os processos de desnaturação, recozimento e alongamento constituem um ciclo único. São necessários múltiplos ciclos para amplificar o alvo de ADN a milhões de cópias. A fórmula utilizada para calcular o número de cópias de ADN formadas após um determinado número de ciclos é  $2^n$ , onde  $n$  é o número de ciclos. Assim, um conjunto de reacção para

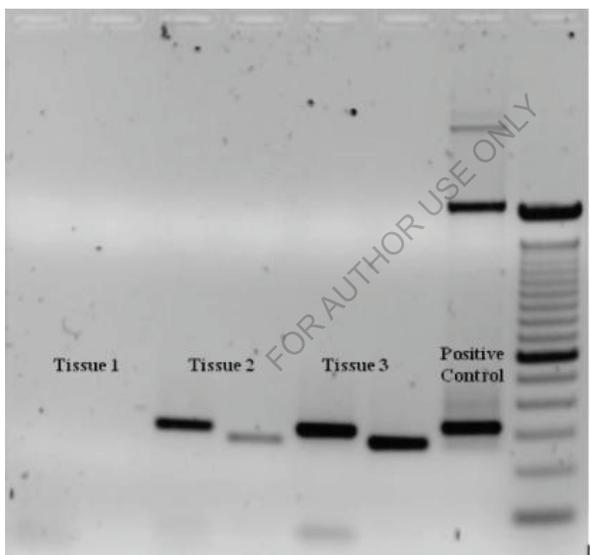
30 ciclos resulta em  $2^{30}$ , ou 1.073.741.824, cópias da região alvo original de ADN de fio duplo.

- Alongamento final: Esta etapa única é opcional, mas é realizada a uma temperatura de 70-74 °C (158-165 °F) (o intervalo de temperatura necessário para a actividade óptima da maioria das polimerases utilizadas na PCR) durante 5-15 minutos após o último ciclo de PCR para assegurar que qualquer ADN de cadeia única restante seja completamente alongado.
- Última paragem: O passo final arrefece a câmara de reacção a 4-15 °C (39-59 °F) por um tempo indefinido, e pode ser utilizado para armazenamento a curto prazo dos produtos da PCR.



**Figura (46): Passos da PCR.**

Para verificar se a PCR gerou com sucesso a região alvo de ADN prevista também por vezes referida como amplificador ou amplicon, pode ser utilizada a electroforese em gel de agarose para a separação do tamanho dos produtos PCR. O tamanho dos produtos PCR é determinado por comparação com uma escada de ADN, um marcador de peso molecular que contém fragmentos de ADN de tamanhos conhecidos, que corre no gel juntamente com os produtos PCR.



**Figura (47): Electroforese em gel.**

## **Fases**

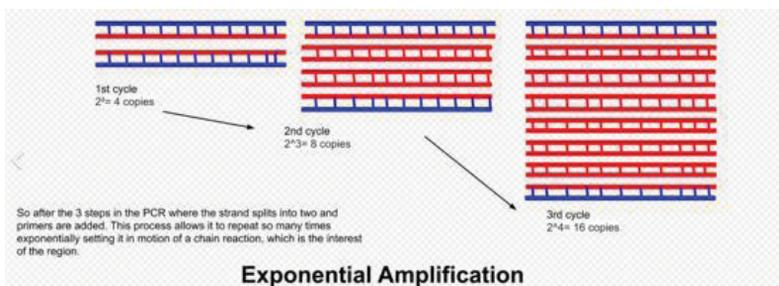
Tal como com outras reacções químicas, a taxa de reacção e a eficácia da PCR são afectadas por factores limitantes. Assim, todo o processo de PCR pode ainda ser dividido em três fases, com base no progresso da reacção:

- **Amplificação exponencial:** Em cada ciclo, a quantidade de produto é duplicada (assumindo 100% de eficiência de reacção). Após 30 ciclos, uma única cópia de ADN pode ser aumentada até 1.000.000.000 (um bilião) de cópias. Em certo sentido, então, a replicação de uma fita discreta de ADN está a ser manipulada num tubo em condições controladas.<sup>[15]</sup> A reacção é muito sensível: apenas quantidades mínimas de ADN devem estar presentes.
- **Nivelamento fora do palco:** A reacção abranda à medida que a polimerase do ADN perde actividade e que o consumo de reagentes, tais como dNTPs e primários, faz com que estes se tornem mais limitados.
- **Platô:** Não se acumula mais produto devido à exaustão de reagentes e enzimas.

## **Optimização**

Na prática, a PCR pode falhar por várias razões, em parte devido à sua sensibilidade à contaminação causando a amplificação de

produtos de ADN espúrios. Devido a isto, foram desenvolvidas várias técnicas e procedimentos para otimizar as condições de PCR. A contaminação com ADN estranho é tratada com protocolos e procedimentos de laboratório que separam misturas pré-PCR de potenciais contaminantes de ADN. Isto envolve normalmente a separação espacial das áreas de preparação de PCR de áreas para análise ou purificação de produtos de PCR, utilização de artigos de plástico descartáveis e limpeza completa da superfície de trabalho entre as configurações de reacção. As técnicas de concepção de primers são importantes para melhorar o rendimento dos produtos de PCR e para evitar a formação de produtos espúrios, e a utilização de componentes tampão alternativos ou enzimas de polimerase pode ajudar na amplificação de regiões longas ou problemáticas de ADN. A adição de reagentes, tais como formol, em sistemas tampão pode aumentar a especificidade e o rendimento da PCR. Podem ser realizadas simulações informáticas dos resultados teóricos da PCR (Electronic PCR) para ajudar na concepção de primers.



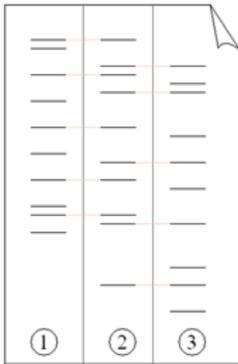
## **Figura (48): Amplificação exponencial.**

### **Isolamento selectivo do ADN**

A PCR permite o isolamento de fragmentos de ADN do ADN genómico através da amplificação selectiva de uma região específica de ADN. Esta utilização da PCR aumenta muitas formas, tais como a geração de sondas de hibridação para hibridação Sul ou Norte e clonagem de ADN, que requerem maiores quantidades de ADN, representando uma região específica de ADN. A PCR fornece estas técnicas com elevadas quantidades de ADN puro, permitindo a análise de amostras de ADN mesmo a partir de quantidades muito pequenas de material de base.

Outras aplicações da PCR incluem a sequenciação de ADN para determinar sequências amplificadas por PCR desconhecidas em que um dos primários de amplificação pode ser utilizado na sequenciação Sanger, isolamento de uma sequência de ADN para acelerar tecnologias de ADN recombinante envolvendo a inserção de uma sequência de ADN num plasmídeo, fago, ou cosmídeo dependendo do tamanho ou do material genético de outro organismo. Colónias bacterianas como a *E. coli* podem ser rapidamente rastreadas por PCR para construções vectoriais de ADN correctas. A PCR também pode ser utilizada para a recolha de impressões digitais genéticas; uma técnica forense utilizada para

identificar uma pessoa ou organismo através da comparação de DNAs experimentais através de diferentes métodos baseados na PCR.



**Figura (49): Electroforese de fragmentos de ADN amplificados por PCR:**

Pai

1. Criança
2. Mãe

A criança herdou algumas, mas não todas as impressões digitais de cada um dos seus pais, dando-lhe uma impressão digital nova e única.

Alguns métodos de impressões digitais PCR têm alto poder discriminatório e podem ser utilizados para identificar relações genéticas entre indivíduos, tais como pai-filho ou entre irmãos, e são utilizados em testes de paternidade. Esta técnica também pode

ser utilizada para determinar relações evolutivas entre organismos quando se utilizam certos relógios moleculares, por exemplo *16SrRNA* e genes *recA* de microrganismos).

### **Amplificação e quantificação do ADN**

Como a PCR amplifica as regiões de ADN que visa, a PCR pode ser utilizada para analisar quantidades extremamente pequenas de amostra. Isto é frequentemente crítico para a análise forense, quando apenas uma quantidade vestigiais de ADN está disponível como prova. A PCR também pode ser utilizada na análise de ADN antigo com dezenas de milhares de anos de idade. Estas técnicas baseadas na PCR têm sido utilizadas com sucesso em animais, tais como um mamute de quarenta mil anos, e também no ADN humano, em aplicações que vão desde a análise de múmias egípcias até à identificação de um czar russo e do corpo do rei inglês Ricardo III.

Os métodos PCR quantitativos ou PCR em Tempo Real (qPCR não confundir com RT-PCR) permitem a estimativa da quantidade de uma dada sequência presente numa amostra - uma técnica frequentemente aplicada para determinar quantitativamente os níveis de expressão genética. A PCR quantitativa é uma ferramenta estabelecida para a quantificação do ADN que mede a acumulação de produto de ADN após cada ronda de amplificação da PCR.

qPCR permite a quantificação e detecção de uma sequência específica de ADN em tempo real, uma vez que mede a concentração enquanto o processo de síntese está a ter lugar. Existem dois métodos para a detecção e quantificação simultânea. O primeiro método consiste na utilização de corantes fluorescentes que são retidos de forma não específica entre os fios duplos. O segundo método envolve sondas que codificam sequências específicas e que são fluorescentemente rotuladas. A detecção de ADN utilizando estes métodos só pode ser vista após a hibridação das sondas com o seu ADN complementar. Uma combinação técnica interessante é a PCR em tempo real e a transcrição inversa. Esta técnica sofisticada, chamada RT-qPCR, permite a quantificação de uma pequena quantidade de RNA. Através desta técnica combinada, o mRNA é convertido em cDNA, que é posteriormente quantificado utilizando qPCR. Esta técnica diminui a possibilidade de erro no ponto final da PCR,<sup>[24]</sup> aumento das hipóteses de detecção de genes associados a doenças genéticas, tais como o cancro.<sup>[4]</sup> Os laboratórios utilizam RT-qPCR com o objectivo de medir sensivelmente a regulação genética. As bases matemáticas para a quantificação fiável da PCR e RT-qPCR facilitam a implementação de procedimentos de ajuste precisos de dados experimentais na investigação, medicina, diagnóstico e aplicações de doenças infecciosas.

## **Aplicações médicas e de diagnóstico**

Os futuros pais podem ser testados por serem portadores de genética, ou os seus filhos podem ser testados por serem realmente afectados por uma doença.<sup>[1]</sup> As amostras de ADN para testes pré-natais podem ser obtidas por amniocentese, vilosidade coriónica, ou mesmo pela análise de células fetais raras que circulam na corrente sanguínea da mãe. A análise PCR é também essencial para o diagnóstico genético pré-implantatório, onde as células individuais de um embrião em desenvolvimento são testadas para detectar mutações.

- A PCR também pode ser utilizada como parte de um teste sensível de tipagem de tecidos, vital para o transplante de órgãos. A partir de 2008, existe mesmo uma proposta para substituir os testes tradicionais baseados em anticorpos para o tipo de sangue por testes baseados em PCR.
- Muitas formas de cancro envolvem alterações de oncogenes. Ao utilizar testes baseados em PCR para estudar estas mutações, os regimes terapêuticos podem por vezes ser personalizados individualmente a um paciente. A PCR permite o diagnóstico precoce de doenças malignas, tais como leucemia e linfomas, que é actualmente o mais desenvolvido na investigação do cancro e já está a ser utilizado rotineiramente. Os ensaios de PCR podem ser realizados directamente em amostras de ADN

genómico para detectar células malignas específicas da translocação a uma sensibilidade pelo menos 10.000 vezes superior à de outros métodos. A PCR é muito útil no campo médico, uma vez que permite o isolamento e amplificação dos supressores tumorais. A PCR quantitativa, por exemplo, pode ser utilizada para quantificar e analisar células únicas, bem como reconhecer confirmações e combinações de ADN, mRNA e proteínas.

### **Aplicações de doenças infecciosas**

A PCR permite o diagnóstico rápido e altamente específico de doenças infecciosas, incluindo as causadas por bactérias ou vírus.<sup>[33]</sup> A PCR também permite a identificação de microrganismos não cultiváveis ou de crescimento lento, tais como micobactérias, bactérias anaeróbias, ou vírus a partir de ensaios de cultura de tecidos e modelos animais. A base para aplicações de diagnóstico por PCR em microbiologia é a detecção de agentes infecciosos e a discriminação de não patogénicos de estirpes patogénicas em virtude de genes específicos.

A caracterização e detecção de organismos de doenças infecciosas foram revolucionadas pela PCR das seguintes formas:

- O vírus da imunodeficiência humana ou VIH, é um alvo difícil de encontrar e erradicar. Os primeiros testes de infecção

dependeram da presença de anticorpos para o vírus que circulava na corrente sanguínea. No entanto, os anticorpos só aparecem muitas semanas após a infecção, os anticorpos maternos mascaram a infecção de um recém-nascido, e os agentes terapêuticos para combater a infecção não afectam os anticorpos. Foram desenvolvidos testes PCR que podem detectar tão pouco como um genoma viral entre o ADN de mais de 50.000 células hospedeiras. As infecções podem ser detectadas mais cedo, o sangue doado pode ser rastreado directamente para o vírus, os recém-nascidos podem ser imediatamente testados quanto à infecção e os efeitos dos tratamentos antivirais podem ser quantificados.

- Alguns organismos patogénicos como o da tuberculose são difíceis de amostrar dos doentes e lentos a serem cultivados em laboratório. Os testes baseados em PCR permitiram a detecção de pequenos números de organismos da doença (tanto vivos como mortos), em amostras convenientes. A análise genética detalhada também pode ser utilizada para detectar resistência aos antibióticos, permitindo uma terapia imediata e eficaz. Os efeitos da terapia também podem ser imediatamente avaliados.
- A propagação de um organismo transmissor de doenças através de populações de animais domésticos ou selvagens pode ser monitorizada através de testes PCR. Em muitos casos, o aparecimento de novos subtipos virulentos pode ser detectado e monitorizado. Os subtipos de um organismo que foram

responsáveis por epidemias anteriores também podem ser determinados através da análise por PCR.

- O ADN viral pode ser detectado por PCR. Os iniciadores utilizados devem ser específicos para as sequências alvo no ADN de um vírus, e a PCR pode ser utilizada para análises de diagnóstico ou sequenciação do ADN do genoma viral. A alta sensibilidade da PCR permite a detecção do vírus logo após a infecção e mesmo antes do início da doença.<sup>[33]</sup> Esta detecção precoce pode dar aos médicos um tempo significativo de avanço no tratamento. A quantidade de vírus ("carga viral") num doente também pode ser quantificada através de técnicas de quantificação de ADN baseadas na PCR. Uma variante de PCR (RT-PCR) é utilizada para detectar RNA viral em vez de ADN: neste teste, a enzima transcriptase inversa é utilizada para gerar uma sequência de ADN que corresponda ao RNA viral; este ADN é depois amplificado de acordo com o método habitual de PCR. RT-PCR é amplamente utilizado para detectar o genoma viral do SRA-CoV-2.
- Doenças como a tosse convulsa (ou tosse convulsa) são causadas pela bactéria *Bordetella pertussis*. Esta bactéria é marcada por uma grave infecção respiratória aguda que afecta vários animais e seres humanos e tem levado à morte de muitas crianças pequenas. A tosse convulsa é uma exotoxina proteica que se liga aos receptores celulares por dois dímeros e reage com diferentes tipos celulares, tais como linfócitos T que

desempenham um papel na imunidade celular. A PCR é uma importante ferramenta de teste que pode detectar sequências dentro do gene para a toxina da tosse convulsa. Uma vez que a PCR tem uma alta sensibilidade à toxina e um tempo de resposta rápido, é muito eficiente para o diagnóstico da tosse convulsa quando comparada com a cultura.

### **Aplicações forenses**

O desenvolvimento de protocolos de recolha de impressões digitais com base em PCR (ou ADN) tem tido uma aplicação generalizada na medicina legal:

- Na sua forma mais discriminatória, a *recolha de impressões digitais genéticas* pode discriminar de forma única qualquer pessoa de toda a população do mundo. Amostras minuciosas de ADN podem ser isoladas de uma cena de crime, e comparadas com as de suspeitos, ou de uma base de dados de ADN de provas ou condenados anteriores. Versões mais simples destes testes são frequentemente utilizadas para excluir rapidamente os suspeitos durante uma investigação criminal. As provas de crimes com décadas de existência podem ser testadas, confirmando ou exonerando as pessoas originalmente condenadas.
- A tipagem de DNA forense tem sido uma forma eficaz de identificar ou exonerar suspeitos de crime devido à análise de

provas descobertas no local de um crime. O genoma humano tem muitas regiões repetitivas que podem ser encontradas dentro de sequências genéticas ou em regiões não codificantes do genoma. Especificamente, até 40% do ADN humano é repetitivo. Existem duas categorias distintas para estas regiões repetitivas e não codificantes do genoma. A primeira categoria é chamada repetição em tandem de números variáveis (VNTR) que são 10-100 pares de base longos e a segunda categoria é chamada repetição em tandem curta (STR) e estas consistem em repetidas secções de 2-10 pares de base. A PCR é utilizada para amplificar várias VNTRs e STRs bem conhecidas, utilizando primários que flanqueiam cada uma das regiões repetitivas. Os tamanhos dos fragmentos obtidos de qualquer indivíduo para cada uma das STRs indicarão quais os alelos que estão presentes. Ao analisar várias STR para um indivíduo, será encontrado um conjunto de alelos para cada pessoa que, estatisticamente, será provavelmente único. Os investigadores identificaram a sequência completa do genoma humano. Esta sequência pode ser facilmente acessada através do website do NCBI e é utilizada em muitas aplicações da vida real. Por exemplo, o FBI compilou um conjunto de sítios de marcadores de ADN utilizados para identificação, e estes são chamados de base de dados de ADN do Sistema Combinado de Índice de ADN (CODIS). A utilização desta base de dados permite a análise estatística para determinar a probabilidade de que uma

amostra de ADN corresponda. A PCR é uma ferramenta analítica muito poderosa e significativa a utilizar para a tipagem forense de ADN porque os investigadores apenas necessitam de uma quantidade muito pequena do ADN alvo para serem utilizados na análise. Por exemplo, um único cabelo humano com folículo piloso preso tem ADN suficiente para realizar a análise. Da mesma forma, alguns espermatozóides, amostras de pele de debaixo das unhas ou uma pequena quantidade de sangue podem fornecer ADN suficiente para uma análise conclusiva.

- Formas menos discriminatórias de recolha de impressões digitais de ADN podem ajudar nos testes de paternidade de ADN onde um indivíduo é comparado com os seus familiares mais próximos. O ADN de restos humanos não identificados pode ser testado, e comparado com o de possíveis pais, irmãos, ou filhos. Testes semelhantes podem ser utilizados para confirmar os pais biológicos de uma criança adoptada ou raptada. O pai biológico real de um recém-nascido também pode ser confirmado (ou excluído).
- A concepção da PCR AMGX/AMGY tem sido facilitada na amplificação de sequências de ADN a partir de uma quantidade muito minúscula de genoma. No entanto, também pode ser utilizado para a determinação de sexo em tempo real a partir de amostras ósseas forenses. Isto proporciona uma forma poderosa

e eficaz de determinar o sexo em casos forenses e espécimes antigos.

## **Aplicações**

A PCR tem sido aplicada a muitas áreas de investigação em genética molecular:

- A PCR permite a produção rápida de pedaços curtos de ADN, mesmo quando não se conhece mais do que a sequência dos dois iniciadores. Esta capacidade de PCR aumenta muitos métodos, tais como a geração de sondas de hibridização para hibridização de manchas do sul ou do norte. A PCR fornece estas técnicas com grandes quantidades de ADN puro, por vezes como um único fio, permitindo a análise mesmo a partir de quantidades muito pequenas de material de base.
- A tarefa de sequenciação do ADN também pode ser assistida por PCR. Segmentos conhecidos de ADN podem facilmente ser produzidos a partir de um paciente com uma mutação de doença genética. As modificações da técnica de amplificação podem extrair segmentos de um genoma completamente desconhecido, ou podem gerar apenas um único fio de uma área de interesse.
- A PCR tem numerosas aplicações para o processo mais tradicional de clonagem de ADN. Pode extrair segmentos para inserção num vector a partir de um genoma maior, que pode estar disponível apenas em pequenas quantidades. Utilizando

um único conjunto de 'primários vectoriais', pode também analisar ou extrair fragmentos que já tenham sido inseridos em vectores. Algumas alterações ao protocolo PCR podem gerar mutações (gerais ou dirigidas ao local) de um fragmento inserido.

- Os sítios marcados com sequência é um processo em que a PCR é utilizada como um indicador da presença de um determinado segmento de um genoma num determinado clone. O Projecto Genoma Humano considerou esta aplicação vital para mapear os clones cósmicos que estavam a sequenciar, e para coordenar os resultados de diferentes laboratórios.
- Uma aplicação da PCR é a análise filogenética do ADN de fontes antigas, como a encontrada nos ossos recuperados de Neandertais, de tecidos congelados de mamutes, ou do cérebro de múmias egípcias. Em alguns casos, o ADN altamente degradado proveniente destas fontes pode ser remontado durante as fases iniciais da amplificação.
- Uma aplicação comum da PCR é o estudo dos padrões de expressão genética. Os tecidos (ou mesmo células individuais) podem ser analisados em diferentes fases para ver quais os genes que se tornaram activos, ou quais os que foram desactivados. Esta aplicação pode também utilizar a PCR quantitativa para quantificar os níveis reais de expressão.

- A capacidade da PCR de amplificar simultaneamente vários loci de espermatozóides individuais aumentou muito a tarefa mais tradicional do mapeamento genético através do estudo de cruzamentos cromossómicos após a meiose. Raros eventos cruzados entre loci muito próximos foram directamente observados através da análise de milhares de espermatozóides individuais. Da mesma forma, apagamentos, inserções, translocações ou inversões invulgares podem ser analisados, tudo sem ter de esperar ou pagar pelos longos e laboriosos processos de fertilização, embriogénese.
- Mutagénese direccionada para o local: A PCR pode ser utilizada para criar genes mutantes com mutações escolhidas pelos cientistas à vontade. Estas mutações podem ser escolhidas de modo a compreender como as proteínas realizam as suas funções, e para mudar ou melhorar a função das proteínas.

## **Vantagens**

A PCR tem uma série de vantagens. É bastante simples de compreender e de utilizar, e produz resultados rapidamente. A técnica é altamente sensível com potencial para produzir milhões a biliões de cópias de um produto específico para sequenciação, clonagem e análise. qRT-PCR partilha as mesmas vantagens que a PCR, com uma vantagem adicional de quantificação do produto sintetizado. Portanto, tem as suas utilizações para analisar

alterações dos níveis de expressão genética em tumores, micróbios, ou outros estados de doença.

A PCR é uma ferramenta de investigação muito poderosa e prática. A sequenciação de etiologias desconhecidas de muitas doenças está a ser descoberta pela PCR. A técnica pode ajudar a identificar a sequência de vírus anteriormente desconhecidos relacionados com os já conhecidos e, assim, dar-nos uma melhor compreensão da própria doença. Se o procedimento puder ser ainda mais simplificado e sistemas sensíveis de detecção não radiométrica puderem ser desenvolvidos, a PCR assumirá um lugar de destaque no laboratório clínico durante os próximos anos.

### **Limitações**

Uma grande limitação da PCR é que a informação prévia sobre a sequência alvo é necessária para gerar os iniciadores que permitirão a sua amplificação selectiva. Isto significa que, tipicamente, os utilizadores da PCR devem conhecer a(s) sequência(ões) precisa(s) a montante da região alvo em cada um dos dois modelos de cadeia única, a fim de assegurar que a polimerase do ADN se liga adequadamente aos híbridos do primer-template e gera subsequentemente toda a região alvo durante a síntese do ADN.

Como todas as enzimas, as polimerases de ADN também são propensas a erro, o que por sua vez provoca mutações nos fragmentos de PCR que são gerados.

Outra limitação da PCR é que mesmo a menor quantidade de ADN contaminante pode ser amplificada, resultando em resultados enganadores ou ambíguos. Para minimizar a possibilidade de contaminação, os investigadores devem reservar salas separadas para a preparação de reagentes, a PCR, e a análise do produto. Os reagentes devem ser distribuídos em alíquotas de utilização única. Os pipetadores com êmbolos descartáveis e pontas de pipeta extralongas devem ser utilizados rotineiramente. Além disso, recomenda-se garantir que a configuração do laboratório siga um fluxo de trabalho unidireccional. Nenhum material ou reagente utilizado nas salas de PCR e análise deve ser jamais levado para a sala de preparação de PCR sem uma descontaminação completa. Amostras ambientais que contenham ácidos húmicos podem inibir a amplificação da PCR e conduzir a resultados imprecisos.

## **Variações**

- PCR única específica: uma técnica de diagnóstico ou clonagem baseada em variações de nucleótidos únicos (SNVs a não confundir com SNPs) (diferenças de base única num paciente). Requer conhecimento prévio de uma sequência de ADN, incluindo diferenças entre alelos, e utiliza iniciadores cujas extremidades de 3' englobam o SNV (tampão de par de base em torno do SNV normalmente incorporado). A amplificação PCR

sob condições rigorosas é muito menos eficiente na presença de um desajuste entre o modelo e o primário, pelo que a amplificação bem sucedida com um primário específico SNP sinaliza a presença do SNP específico numa sequência.

- Assembly PCR ou Polymerase Cycling Assembly (PCA): síntese artificial de sequências longas de ADN através da realização de PCR numa piscina de oligonucleótidos longos com segmentos curtos sobrepostos. Os oligonucleótidos alternam entre as direcções de sentido e anti-senso, e os segmentos sobrepostos determinam a ordem dos fragmentos de PCR, produzindo assim selectivamente o produto final de ADN longo.
- PCR assimétrica: amplifica preferencialmente uma fita de ADN num modelo de ADN de dupla fita. É utilizada em sondagens de sequenciação e hibridização onde é necessária a amplificação de apenas uma das duas vertentes complementares. A PCR é realizada como habitualmente, mas com um grande excesso do primer para o cordão visado para amplificação. Devido à amplificação lenta (aritmética) mais tarde na reacção após a utilização do primer limitador, são necessários ciclos extra de PCR. Uma modificação recente neste processo, conhecida como Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR), utiliza um primer limitador com uma temperatura de fusão mais elevada ( $T_m$ ) do que o primer em excesso para manter a eficiência da

reação à medida que a concentração do primer limitador diminui a meio da reação.<sup>[46]</sup>

- PCR convectiva: uma forma pseudo-isotérmica de realizar a PCR. Em vez de aquecer e arrefecer repetidamente a mistura de PCR, a solução é sujeita a um gradiente térmico. O fluxo convectivo resultante da instabilidade térmica conduz automaticamente a baralhar os reagentes PCR das regiões quentes e frias, permitindo repetidamente a PCR. Parâmetros como as condições-limite térmicas e a geometria do recinto de PCR podem ser otimizados para produzir uma PCR robusta e rápida, aproveitando o surgimento de campos de fluxo caóticos.<sup>[48]</sup> Tal configuração de PCR de fluxo convectivo reduz significativamente os requisitos de potência do dispositivo e o tempo de operação.
- PCR dial-out: um método altamente paralelo para a recuperação de moléculas de ADN precisas para a síntese genética. Uma biblioteca complexa de moléculas de ADN é modificada com etiquetas de flanco únicas antes da sequenciação maciçamente paralela. Os iniciadores dirigidos por etiquetas permitem então a recuperação de moléculas com sequências desejadas por PCR.
- PCR digital (dPCR): utilizada para medir a quantidade de uma sequência de ADN alvo numa amostra de ADN. A amostra de ADN é altamente diluída de modo que, depois de executar muitas PCRs em paralelo, algumas delas não recebem uma única molécula do ADN alvo. A concentração do ADN alvo é

calculada utilizando a proporção de resultados negativos. Daí o nome "PCR digital".

- Amplificação dependente da hélice: semelhante à PCR tradicional, mas utiliza uma temperatura constante em vez de ciclos de desnaturação e recozimento/extensão. A helicase de ADN, uma enzima que desenrola o ADN, é utilizada em vez da desnaturação térmica.
- PCR de arranque a quente: uma técnica que reduz a amplificação não específica durante as fases iniciais de instalação da PCR. Pode ser realizada manualmente através do aquecimento dos componentes de reacção à temperatura de desnaturação (por exemplo, 95 °C) antes da adição da polimerase. Foram desenvolvidos sistemas enzimáticos especializados que inibem a actividade da polimerase à temperatura ambiente, quer através da ligação de um anticorpo<sup>[12][52]</sup> ou pela presença de inibidores covalentemente ligados que só se dissociam após uma etapa de activação a alta temperatura. A PCR de arranque a quente/frio é obtida com novas polimerases híbridas que estão inactivas à temperatura ambiente e que são instantaneamente activadas à temperatura de alongamento.
- Em silico *PCR* (PCR digital, PCR virtual, PCR electrónica, e-PCR) refere-se a ferramentas computacionais utilizadas para calcular resultados teóricos de reacções em cadeia da polimerase utilizando um dado conjunto de iniciadores (sondas)

para amplificar sequências de ADN de um genoma sequenciado ou transcriptoma. Em silico, a PCR foi proposta como uma ferramenta educacional para a biologia molecular.<sup>[53]</sup>

- *PCR* específica da sequência (ISSR): um método PCR para a recolha de impressões digitais de ADN que amplifica regiões entre repetições de sequência simples para produzir uma impressão digital única de comprimentos de fragmentos amplificados.
- *PCR* inversa: é normalmente utilizada para identificar as sequências de acompanhamento em torno de inserções genómicas. Envolve uma série de digestões de ADN e auto-ligação, resultando em sequências conhecidas em qualquer uma das extremidades da sequência desconhecida.
- *PCR* mediada por ligação: utiliza pequenos ligadores de ADN ligados ao ADN de interesse e múltiplos primários recozidos aos ligadores de ADN; tem sido utilizado para sequenciação de ADN, caminhada pelo genoma, e pegada de ADN.
- *PCR* específica da metilação (MSP): desenvolvida por Stephen Baylin e James G. Herman na Escola de Medicina Johns Hopkins e é utilizada para detectar a metilação das ilhas CpG no ADN genómico. O ADN é primeiro tratado com bissulfito de sódio, que converte as bases de citosina não metilada em uracil, que é reconhecido pelos iniciadores de PCR como timina. Duas PCRs são então realizadas no ADN modificado, utilizando

conjuntos de iniciadores idênticos, excepto em quaisquer ilhas CpG dentro das sequências de iniciadores. Nestes pontos, um conjunto de iniciadores reconhece o ADN com citosinas para amplificar o ADN metilado, e um conjunto reconhece o ADN com uracil ou timina para amplificar o ADN não metilado. A MSP usando qPCR também pode ser executada para obter informação quantitativa em vez de qualitativa sobre a metilação.

- Miniprimer PCR: utiliza uma polimerase termoestável (S-Tbr) que pode estender-se de iniciadores curtos "smalligos" tão curtos como 9 ou 10 nucleótidos. Este método permite a PCR dirigida a regiões de ligação de primers mais pequenas, e é utilizado para amplificar sequências de ADN conservadas, tais como o gene rRNA 16S ou eukaryotic 18S).
- Amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA): permite amplificar alvos múltiplos com um único par de iniciadores, evitando assim as limitações de resolução da PCR multiplex.
- Multiplex-PCR: consiste em vários conjuntos de iniciadores dentro de uma única mistura de PCR para produzir amplicons de tamanhos variados que são específicos para diferentes sequências de ADN. Ao visar múltiplos genes de uma só vez, é possível obter informação adicional a partir de um único teste que de outra forma exigiria várias vezes os reagentes e mais tempo para o seu desempenho. As temperaturas de recozimento para cada um dos conjuntos de iniciadores devem ser

otimizadas para funcionarem correctamente dentro de uma única reacção, e os tamanhos de amplicões. Ou seja, o comprimento do seu par de base deve ser suficientemente diferente para formar bandas distintas quando visualizadas por electroforese em gel.

- PCR assistida por nanopartículas (nanoPCR): algumas nanopartículas (NPs) podem aumentar a eficiência da PCR (sendo assim chamadas nanoPCR), e algumas podem mesmo superar os melhoradores originais da PCR. Foi relatado que os pontos quânticos (QD) podem melhorar a especificidade e eficiência da PCR. Os nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) são eficientes no aumento da amplificação da PCR longa. A nanopoder de carbono (CNP) pode melhorar a eficiência da PCR repetida e da PCR longa, enquanto que o óxido de zinco, o dióxido de titânio e os NPs de Ag foram encontrados para aumentar o rendimento da PCR. Dados anteriores indicavam que os NPs não metálicos mantinham uma fidelidade de amplificação aceitável. Dado que muitos NPs são capazes de melhorar a eficiência da PCR, é evidente que existe um grande potencial para melhorias da tecnologia nanoPCR e desenvolvimento de produtos.<sup>[59][60]</sup>
- PCR aninhada: aumenta a especificidade da amplificação do ADN, reduzindo o fundo devido à amplificação não específica do ADN. Dois conjuntos de iniciadores são utilizados em duas

PCRs sucessivas. Na primeira reação, é utilizado um par de iniciadores para gerar produtos de ADN, que para além do alvo pretendido, podem ainda consistir em fragmentos de ADN amplificados não-específicos. O(s) produto(s) é(são) então utilizado(s) numa segunda PCR com um conjunto de iniciadores cujos locais de ligação são total ou parcialmente diferentes e localizados 3' de cada um dos iniciadores utilizados na primeira reação. A PCR aninhada é frequentemente mais bem sucedida na amplificação específica de fragmentos de ADN longos do que a PCR convencional, mas requer um conhecimento mais detalhado das sequências alvo.

- PCR de sobreposição-extensão ou Splicing by overlap extension (SOEing) : uma técnica de engenharia genética que é utilizada para emendar dois ou mais fragmentos de ADN que contenham sequências complementares. É utilizada para unir pedaços de ADN contendo genes, sequências reguladoras, ou mutações; a técnica permite a criação de construções de ADN específicas e longas. Pode também introduzir supressões, inserções ou mutações pontuais numa sequência de ADN.
- PAN-AC: utiliza condições isotérmicas para amplificação, e pode ser utilizado em células vivas.
- PCR quantitativa (qPCR): utilizada para medir a quantidade de uma sequência alvo (geralmente em tempo real). Mede quantitativamente as quantidades iniciais de ADN, cDNA, ou RNA. A PCR quantitativa é normalmente utilizada para

determinar se uma sequência de ADN está presente numa amostra e o número das suas cópias na amostra. A *PCR quantitativa* tem um grau de precisão muito elevado. Os métodos de PCR quantitativa utilizam corantes fluorescentes, tais como Sybr Green, EvaGreen ou sondas de ADN contendo fluoróforos, tais como TaqMan, para medir a quantidade de produto amplificado em tempo real. Também é por vezes abreviado para RT-PCR (real-time PCR), mas esta abreviatura deve ser usada apenas para a PCR de transcrição inversa. qPCR é a contracção apropriada para a PCR quantitativa (PCR em tempo real).

- Complemento inverso de PCR (RC-PCR): Permite que a adição de domínios funcionais ou sequências de escolha seja anexada independentemente a qualquer uma das extremidades do amplicon gerado numa única reacção de tubo fechado. Este método gera primários específicos do alvo dentro da reacção através da interacção de primários universais (que contêm as sequências ou domínios desejados a serem anexados) e sondas RC.
- PCR de Transcrição Inversa (*RT-PCR*): para amplificação do ADN a partir do RNA. A transcriptase inversa transcreve o RNA em cDNA, que é depois amplificado por PCR. RT-PCR é amplamente utilizada na caracterização da expressão, para determinar a expressão de um gene ou para identificar a sequência de uma transcrição de RNA, incluindo os locais de

início e fim da transcrição. Se a sequência genómica de ADN de um gene for conhecida, a RT-PCR pode ser utilizada para mapear a localização de exões e intrões no gene. O final de 5' de um gene (correspondente ao local de início da transcrição) é tipicamente identificado pelo RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends).

- PCR dependente de RNase H (rhPCR): uma modificação da PCR que utiliza iniciadores com um bloco de extensão de 3' que pode ser removido por uma enzima termoestável RNase HIII. Este sistema reduz os primers-dimers e permite a realização de reacções multiplexadas com números mais elevados de primers.
- Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR): permite a amplificação de ADN de cadeia dupla, mesmo quando a informação da sequência está disponível apenas numa extremidade. Este método permite a amplificação de genes para os quais apenas está disponível uma informação de sequência parcial, e permite o caminhar unidireccional do genoma de regiões conhecidas para regiões desconhecidas do cromossoma.
- PCR de fase sólida: engloba múltiplos significados, incluindo Amplificação Polónia onde as colónias de PCR são derivadas numa matriz de gel, por exemplo, Bridge PCR (os primários estão covalentemente ligados a uma superfície de suporte sólido), PCR de fase sólida convencional (onde a PCR assimétrica é aplicada na presença de primário de suporte sólido com sequência correspondente a um dos primários aquosos) e

PCR de fase sólida melhorada onde a PCR de fase sólida convencional pode ser melhorada empregando primário de suporte sólido de alta Tm e primário de suporte sólido aninhado com aplicação opcional de um "passo" térmico para favorecer o primário de suporte sólido.

- PCR suicida: tipicamente utilizado em paleogenética ou outros estudos onde evitar falsos positivos e assegurar a especificidade do fragmento amplificado é a maior prioridade. Foi originalmente descrito num estudo para verificar a presença do micróbio *Yersinia pestis* em amostras dentárias obtidas a partir de sepulturas do século XIV de pessoas supostamente mortas pela peste durante a epidemia medieval da Peste Negra. O método prescreve a utilização de qualquer combinação de primers apenas uma vez numa PCR, daí o termo "suicídio", que nunca deveria ter sido utilizado em qualquer reacção PCR de controlo positivo, e os primers devem sempre visar uma região genómica nunca antes amplificada no laboratório, utilizando este ou qualquer outro conjunto de primers. Isto assegura que não está presente no laboratório ADN contaminante de reacções PCR anteriores, o que de outra forma poderia gerar falsos positivos.
- PCR assimétrica térmica entrelaçada (TAIL-PCR): para isolamento de uma sequência desconhecida que flanqueia uma sequência conhecida. Dentro da sequência conhecida, TAIL-PCR utiliza um par de primários aninhados com diferentes

temperaturas de recozimento; um primário degenerado é utilizado para amplificar na outra direcção a partir da sequência desconhecida.

- Touchdown PCR (PCR de recozimento): uma variante da PCR que visa reduzir o fundo não específico, baixando gradualmente a temperatura de recozimento à medida que o ciclo de PCR progride. A temperatura de recozimento nos ciclos iniciais é geralmente alguns graus (3-5 °C) acima do  $T_m$  dos iniciadores utilizados, enquanto que nos ciclos posteriores é alguns graus (3-5 °C) abaixo do iniciador  $T_m$ . As temperaturas mais elevadas dão maior especificidade à ligação do iniciador, e as temperaturas mais baixas permitem uma amplificação mais eficiente a partir dos produtos específicos formados durante os ciclos iniciais.
- Caminhada Rápida Universal: para caminhada pelo genoma e impressões digitais genéticas utilizando uma PCR "bilateral" mais específica do que as abordagens convencionais "unilateral" (utilizando apenas um primer específico do género e um primer geral - que pode conduzir a "ruído" artefactual) em virtude de um mecanismo que envolve a formação da estrutura do lariat. Os derivados simplificados de UFW são LaNe RAGE (PCR aninhada dependente do lariat para amplificação rápida de fins de DNA genómico), 5'RACE LaNe e 3'RACE LaNe.

As enzimas resistentes ao calor que são um componente chave na reacção em cadeia da polimerase foram descobertas nos anos 60 como um produto de uma forma de vida microbiana que vivia nas águas sobreaquecidas da Primavera do Cogumelo de Yellowstone. Um Kjell Kleppe de 1971 e colegas de trabalho no laboratório de H. Gobind Khorana descreveu pela primeira vez um método de utilização de um ensaio enzimático para replicar um pequeno modelo de ADN com iniciadores *in vitro*. No entanto, esta manifestação precoce do princípio básico da PCR não recebeu muita atenção na altura e a invenção da reacção em cadeia da polimerase em 1983 é geralmente creditada a Kary Mullis.

Quando Mullis desenvolveu o PCR em 1983, estava a trabalhar em Emeryville, Califórnia, para a Cetus Corporation, uma das primeiras empresas de biotecnologia onde foi responsável pela síntese de cadeias curtas de ADN. Mullis escreveu que concebeu a ideia da PCR enquanto navegava ao longo da auto-estrada da costa do Pacífico uma noite no seu carro. Ele estava a brincar na sua mente com uma nova forma de analisar as mutações de alterações no ADN quando se apercebeu que, em vez disso, tinha inventado um método de amplificação de qualquer região de ADN através de ciclos repetidos de duplicação conduzidos pela polimerase do ADN. Em *Scientific American*, Mullis resumiu o procedimento: "Começando com uma única molécula do ADN do material genético, a PCR pode gerar 100 biliões de moléculas semelhantes

numa tarde. A reacção é fácil de executar. Não requer mais do que um tubo de ensaio, alguns reagentes simples, e uma fonte de calor". A recolha de impressões digitais de ADN foi utilizada pela primeira vez para testes de paternidade em 1988.

Mullis e o Professor Michael Smith, que tinha desenvolvido outras formas essenciais de manipulação do ADN, receberam conjuntamente o Prémio Nobel da Química em 1993, sete anos depois de Mullis e os seus colegas da Cetus terem posto a sua proposta em prática pela primeira vez. O artigo de Mullis de 1985 com R. K. Saiki e H. A. Erlich, "Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia" a invenção da reacção em cadeia da polimerase (PCR) - foi homenageada por uma Citação para o Prémio de Inovação Química da Divisão de História da Química da Sociedade Americana de Química em 2017.

No núcleo do método PCR está a utilização de uma polimerase de ADN adequada capaz de suportar as altas temperaturas de  $>90$  °C (194 °F) necessárias para a separação dos dois fios de ADN na dupla hélice do ADN após cada ciclo de replicação. As polimerases de ADN inicialmente empregadas para experiências in vitro de PCR prévia foram incapazes de resistir a estas altas temperaturas. Assim, os procedimentos iniciais de replicação de ADN eram muito ineficientes e demorados, e exigiam grandes quantidades de

DNA polimerase e manipulação contínua ao longo de todo o processo.

A descoberta em 1976 da *Taq* polimerase uma DNA polimerase purificada da bactéria termófila, *Thermus aquaticus*, que vive naturalmente em ambientes quentes (50 a 80 °C (122 a 176 °F)), tais como nascentes quentes, abriu o caminho para melhorias dramáticas do método PCR. A DNA polimerase isolada de *T. aquaticus* é estável a altas temperaturas, permanecendo activa mesmo após a desnaturação do ADN, evitando assim a necessidade de adicionar nova DNA polimerase após cada ciclo. Isto permitiu um processo automatizado baseado em termocicladores para amplificação do ADN.

### **Conflitos de patentes**

A técnica de PCR foi patenteada por Kary Mullis e atribuída à Cetus Corporation, onde Mullis trabalhou quando inventou a técnica em 1983. A enzima *Taq* polimerase foi também coberta por patentes. Houve vários processos judiciais de alto nível relacionados com a técnica, incluindo um processo judicial infrutífero interposto pela DuPont. A empresa farmacêutica suíça Hoffmann-La Roche adquiriu os direitos das patentes em 1992 e detém actualmente os que ainda se encontram protegidos.

Uma batalha de patentes relacionada sobre a enzima *Taq* polimerase ainda está em curso em várias jurisdições em todo o mundo entre a Roche e a Promega. Os argumentos legais

estenderam-se para além das vidas das patentes originais da PCR e da *Taq* polimerase, que expiraram a 28 de Março de 2005.



**Figura (50):** Processo baseado em termociclador para amplificação de ADN.

## **RT-PCR**

RT-PCR" redirecciona aqui. Para a reacção em cadeia da polimerase em tempo real, também chamada reacção quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) ou reacção em cadeia da polimerase cinética, ver Reacção em cadeia da polimerase em tempo real.

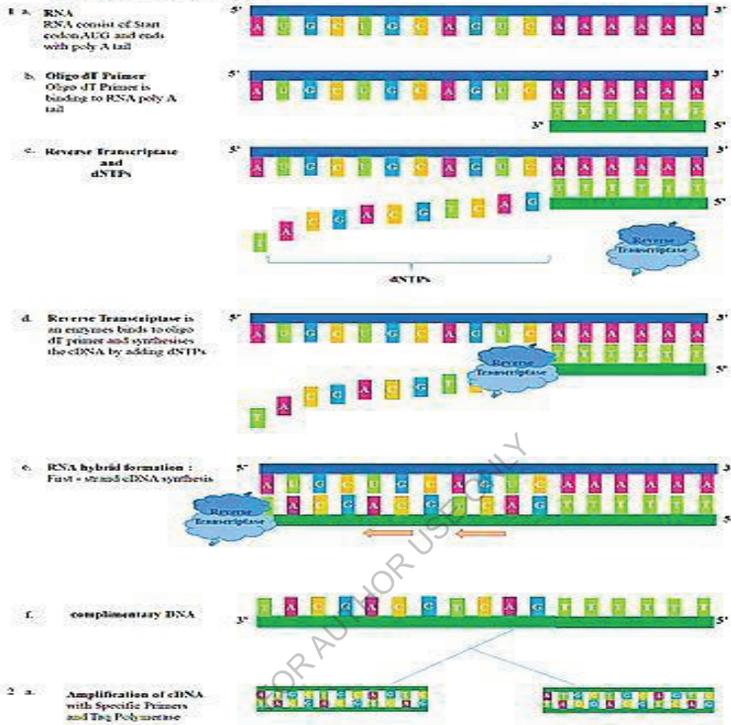
## **Transcrição reversa da reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR)**

é uma técnica laboratorial que combina a transcrição inversa do RNA em ADN, neste contexto denominada ADN complementar ou cDNA e a amplificação de alvos específicos de ADN utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR). É utilizada principalmente para medir a quantidade de um RNA específico. Isto é conseguido através da monitorização da reacção de amplificação utilizando a fluorescência, uma técnica chamada PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR). RT-PCR e qPCR combinados são rotineiramente utilizados para análise da expressão génica e quantificação do RNA viral na investigação e cenários clínicos.

A estreita associação entre RT-PCR e qPCR levou ao uso metonímico do termo qPCR para significar RT-PCR. Tal uso pode ser confuso, uma vez que RT-PCR pode ser utilizado sem qPCR, por exemplo para permitir a clonagem molecular, sequenciação ou simples detecção de RNA. Pelo contrário, qPCR pode ser utilizado sem RT-PCR, por exemplo para quantificar o número de cópia de uma peça específica de ADN

#### 4.8 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

In RT-PCR, the RNA population is converted to cDNA by reverse transcription (RT), and then the cDNA is amplified by the polymerase chain reaction. The cDNA amplification step provides opportunities to further study the original RNA species, even when they are limited in amount or expressed in low abundance. Common applications of RT-PCR include detection of expressed genes, examination of transcript variants, and generation of cDNA templates for cloning and sequencing.



© Lokesh Thimmanna, under the guidance of Dr. G. Mallikarjuna, Assistant Professor, Molecular Biology, Agri Biotech Foundation.

**Figura (51): RT-PCR e q técnica de PCR.**

A técnica combinada de RT-PCR e qPCR foi descrita como RT-PCR quantitativa ou RT-PCR em tempo real (por vezes até chamada RT-PCR quantitativa em tempo real), foi abreviada de forma variada como qRT-PCR, RT-qPCR, RRT-PCR e rRT-PCR. A fim de evitar confusões, as seguintes abreviaturas serão utilizadas de forma consistente em toda a tabela (4).

**Tabela (4): Tipos de abreviaturas técnica de PCR.**

<b>Técnica</b>	<b>Abreviatura</b>
<b>Reacção em cadeia da polimerase</b>	PCR
<b>Transcrição reversa da reacção em cadeia da polimerase</b>	RT-PCR
<b>Reacção em cadeia da polimerase em tempo real</b>	qPCR
<b>RT-PCR / qPCR técnica combinada</b>	qRT-PCR

Nem todos os autores, especialmente os anteriores, utilizam esta convenção e o leitor deve ser cauteloso ao seguir as ligações. RT-PCR tem sido utilizado para indicar tanto a PCR em tempo real (qPCR) como a PCR de transcrição inversa (RT-PCR).

Desde a sua introdução em 1977, o Northern blot tem sido amplamente utilizado para a quantificação do ARN apesar das suas deficiências: (a) técnica morosa, (b) requer uma grande quantidade de ARN para a detecção, e (c) quantitativamente impreciso na baixa abundância do conteúdo de ARN.<sup>[10][11]</sup> Contudo, desde a sua invenção por Kary Mullis em 1983, a PCR RT deslocou a mancha

do Norte como método de escolha para a detecção e quantificação do ARN.

A RT-PCR tem vindo a tornar-se a tecnologia de referência para a detecção e/ou comparação de níveis de ARN por várias razões: (a) não requer processamento pós PCR, (b) pode ser medida uma vasta gama ( $>10^7$  -dobra) de abundância de ARN, e (c) fornece uma visão tanto de dados qualitativos como quantitativos.<sup>[5]</sup> Devido à sua simplicidade, especificidade e sensibilidade, RT-PCR é utilizado numa vasta gama de aplicações, desde experiências tão simples como a quantificação de células de levedura no vinho até utilizações mais complexas como ferramentas de diagnóstico para a detecção de agentes infecciosos como o vírus da gripe aviária e o SARS-CoV-2.

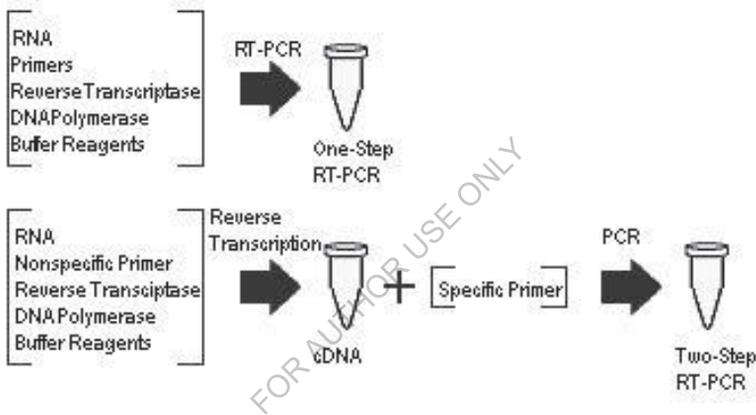
## Princípios

Em RT-PCR, o modelo de RNA é primeiro convertido num ADN complementar (cDNA) usando uma transcriptase inversa (RT). O cDNA é então utilizado como modelo para amplificação exponencial usando PCR. O uso de RT-PCR para a detecção da transcrição do RNA revolucionou o estudo da expressão genética das seguintes formas importantes:

- Tornou teoricamente possível detectar as transcrições de praticamente qualquer gene<sup>[16]</sup>

- Permitted the amplification of samples and eliminated the need for abundant initial material when using Northern blot analysis.
- Since the tolerance to RNA degradation, since the RNA that binds the primary antibody remains intact.

### RT-PCR de uma etapa versus RT-PCR de duas etapas



**Figura (52): RT-PCR de uma etapa versus RT-PCR de duas etapas**

### RT-PCR de uma etapa versus RT-PCR de duas etapas

A quantificação do mRNA utilizando RT-PCR pode ser conseguida como uma reacção de uma ou duas etapas. A diferença entre as duas abordagens reside no número de tubos utilizados na realização do procedimento. A reacção em duas etapas requer que a reacção de transcriptase inversa e a amplificação por PCR sejam

realizadas em tubos separados. A desvantagem da abordagem em duas etapas é a susceptibilidade à contaminação devido a um manuseamento mais frequente das amostras. Por outro lado, toda a reacção desde a síntese de cDNA até à amplificação por PCR ocorre num único tubo na abordagem em uma etapa. Pensa-se que a abordagem de uma só etapa minimiza a variação experimental ao conter todas as reacções enzimáticas num único ambiente. Elimina as etapas de pipetagem do produto de cDNA que é trabalhoso e propenso à contaminação da reacção de PCR. O uso adicional de polimerases inibidoras-tolerantes, intensificadores de polimerase com uma condição RT-PCR de uma etapa otimizada, suporta a transcrição inversa do RNA a partir de amostras não purificadas ou brutas, tais como sangue total e soro. Contudo, os modelos iniciais de RNA são propensos à degradação na abordagem de uma etapa, e a utilização desta abordagem não é recomendada quando são necessários ensaios repetidos a partir da mesma amostra. Além disso, a abordagem de uma etapa é relatada como sendo menos precisa em comparação com a abordagem de duas etapas. É também o método de análise preferido quando se utilizam corantes de ligação de ADN como o SYBR Green, uma vez que a eliminação de primer-dimers pode ser alcançada através de uma simples alteração da temperatura de fusão. No entanto, a abordagem de uma etapa é uma solução relativamente conveniente para a detecção rápida do RNA alvo directamente na biosensagem.

## **Ponto final RT-PCR vs RT-PCR em tempo real**

A quantificação de produtos RT-PCR pode ser em grande parte dividida em duas categorias: ponto final e tempo real. A utilização de RT-PCR de ponto final é preferível para medir as alterações de expressão genética num pequeno número de amostras, mas o RT-PCR em tempo real tornou-se o método padrão-ouro para validar resultados quantitativos obtidos a partir de análises de matriz ou alterações de expressão genética à escala global.

### **Ponto final RT-PCR**

As abordagens de medição do ponto final RT-PCR requerem a detecção dos níveis de expressão genética através da utilização de corantes fluorescentes como o brometo de etídio, a rotulagem P32 de produtos PCR utilizando o fosforimager ou através da contagem da cintilação. O ponto final RT-PCR é geralmente alcançado utilizando três métodos diferentes: relativo, competitivo e comparativo.

### **RT-PCR relativo**

As quantificações relativas de RT-PCR envolvem a co-amplificação de um controlo interno em simultâneo com o gene de interesse. O controlo interno é utilizado para normalizar as amostras. Uma vez normalizado, pode ser feita uma comparação directa das abundâncias relativas de transcrição através de múltiplas amostras de mRNA. Uma precaução a ter em conta é que o controlo interno deve ser escolhido de modo a não ser afectado pelo tratamento experimental. O nível de expressão deve ser constante em todas as amostras e com o mRNA de interesse para que os resultados sejam precisos e significativos. Uma vez que a quantificação dos resultados é analisada comparando o intervalo linear do alvo e a amplificação do controlo, é crucial ter em consideração a concentração das moléculas alvo iniciais e a sua taxa de amplificação antes de se iniciar a análise. Os resultados da análise são expressos como as relações entre o sinal genético e o sinal de controlo interno, cujos valores podem então ser utilizados para a comparação entre as amostras na estimativa da expressão relativa do RNA do alvo.

### **RT-PCR Competitiva**

A técnica RT-PCR competitiva é utilizada para a quantificação absoluta. Implica o uso de um RNA sintético "concorrente" que pode ser distinguido do RNA alvo por uma pequena diferença no tamanho ou sequência. É importante para a concepção do ARN sintético ser idêntico em sequência, mas ligeiramente mais curto do

que o ARN alvo para obter resultados precisos. Uma vez concebido e sintetizado, uma quantidade conhecida do RNA do concorrente é adicionada a amostras experimentais e é co-amplificado com o alvo usando RT-PCR. Depois, é produzida uma curva de concentração do RNA do concorrente e é utilizada para comparar os sinais RT-PCR produzidos a partir das transcrições endógenas para determinar a quantidade de alvo presente na amostra.

### **RT-PCR comparativo**

A RT-PCR comparativa é semelhante à RT-PCR competitiva na medida em que o RNA alvo compete por reagentes de amplificação dentro de uma única reação com um padrão interno de sequência não relacionada. Uma vez terminada a reação, os resultados são comparados com uma curva padrão externa para determinar a concentração de RNA alvo. Em comparação com os métodos de quantificação relativos e competitivos, o RT-PCR comparativo é considerado o método mais conveniente a utilizar, uma vez que não requer que o investigador realize uma experiência piloto; no RT-PCR relativo, o intervalo de amplificação exponencial do mRNA deve ser pré-determinado e no RT-PCR competitivo, um RNA sintético concorrente deve ser sintetizado.

## **RT-PCR em tempo real**

O aparecimento de novas técnicas de rotulagem de ADN fluorescente nos últimos anos permitiu a análise e detecção de produtos PCR em tempo real e, conseqüentemente, levou à adopção generalizada de RT-PCR em tempo real para a análise da expressão genética. Não só a RT-PCR em tempo real é agora o método de escolha para a quantificação da expressão genética, como é também o método preferido para a obtenção de resultados de análises de matriz e expressões genéticas à escala global. Actualmente, existem quatro sondas de ADN fluorescentes diferentes disponíveis para a detecção RT-PCR em tempo real de produtos PCR: SYBR Green, TaqMan, balizas moleculares, e sondas de escorpião. Todas estas sondas permitem a detecção de produtos PCR através da geração de um sinal fluorescente. Enquanto o corante SYBR Green emite o seu sinal fluorescente simplesmente ligando-se ao ADN de cadeia dupla em solução, a geração de fluorescência das sondas TaqMan, das balizas moleculares e dos escorpiões depende do acoplamento da Förster Resonance Energy Transfer (FRET) da molécula de corante e de uma moleza de têmpera aos substratos oligonucleotídeos.

## **SYBR Verde**

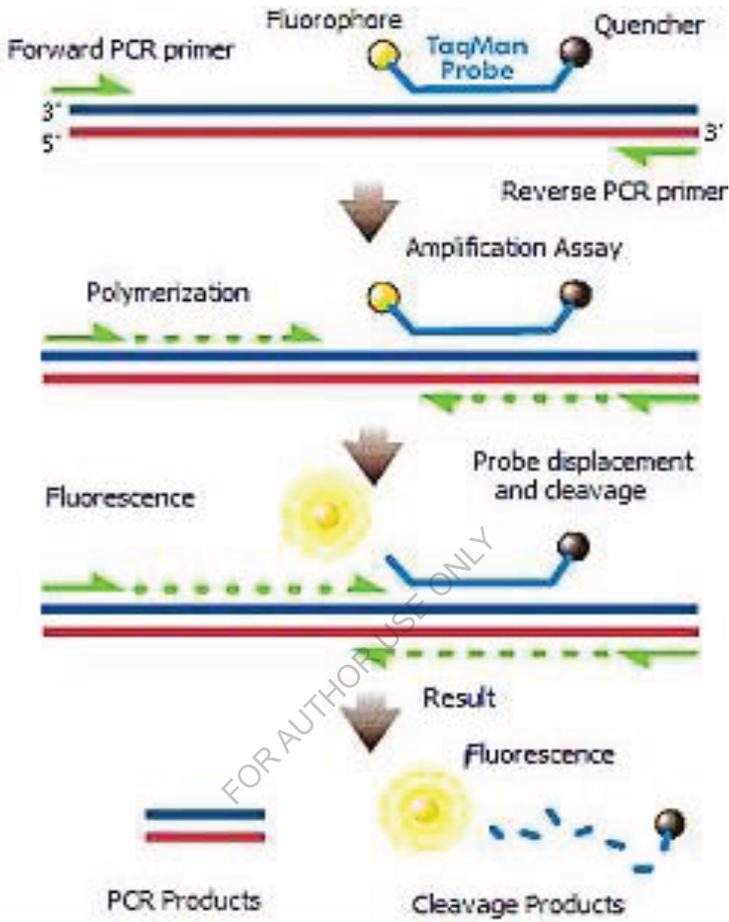
Quando o verde SYBR se liga ao ADN de cadeia dupla dos produtos PCR, emitirá luz após excitação. A intensidade da fluorescência aumenta à medida que os produtos de PCR se acumulam. Esta técnica é fácil de utilizar uma vez que a concepção das sondas não é necessária dada a falta de especificidade da sua ligação. Contudo, uma vez que o corante não discrimina o ADN de cadeia dupla dos produtos de PCR e os dos primer-dimers, a sobrestimação da concentração alvo é um problema comum. Quando a quantificação precisa é uma necessidade absoluta, devem ser efectuados ensaios adicionais para a validação dos resultados. No entanto, entre os métodos de detecção de produtos RT-PCR em tempo real, o SYBR Green é o mais económico e mais fácil de utilizar.

### **Sondas Taq Man**

As sondas TaqMan são oligonucleótidos que têm uma sonda fluorescente ligada à extremidade de 5' e um supressor à extremidade de 3'. Durante a amplificação por PCR, estas sondas hibridizam para as sequências alvo localizadas no amplicon e como a polimerase replica o modelo com TaqMan ligado, também clivam a sonda fluorescente devido à actividade da polimerase 5'-nuclease. Uma vez que a proximidade estreita entre a molécula de têmpora e a sonda fluorescente impede normalmente a detecção da fluorescência através da FRET, a dissociação resulta no aumento

da intensidade da fluorescência proporcional ao número de ciclos de clivagem da sonda. Embora as sondas TaqMan bem concebidas produzam resultados precisos de RT-PCR em tempo real, é dispendioso e demorado sintetizar quando devem ser feitas sondas separadas para cada alvo mRNA analisado. Além disso, estas sondas são sensíveis à luz e devem ser cuidadosamente congeladas como alíquotas para evitar a degradação.

FOR AUTHOR USE ONLY



**Figura (52): Passos de RT-PCR.**

### Sondas de balizas moleculares

À semelhança das sondas TaqMan, as balizas moleculares também utilizam a detecção FRET com sondas fluorescentes ligadas à extremidade de 5' e um supressor ligado à extremidade de 3' de um substrato de oligonucleótido. No entanto, enquanto as

sondas fluorescentes TaqMan são clivadas durante a amplificação, as sondas de balizas moleculares permanecem intactas e voltam a ligar-se a um novo alvo durante cada ciclo de reação. Quando livres em solução, a proximidade estreita da sonda fluorescente e da molécula de têmpera impede a fluorescência através da FRET. No entanto, quando as sondas de balizas moleculares se hibridizam para um alvo, o corante fluorescente e o supressor são separados, resultando na emissão de luz após excitação. Tal como acontece com as sondas TaqMan, as balizas moleculares são caras para sintetizar e requerem sondas separadas para cada alvo de RNA.

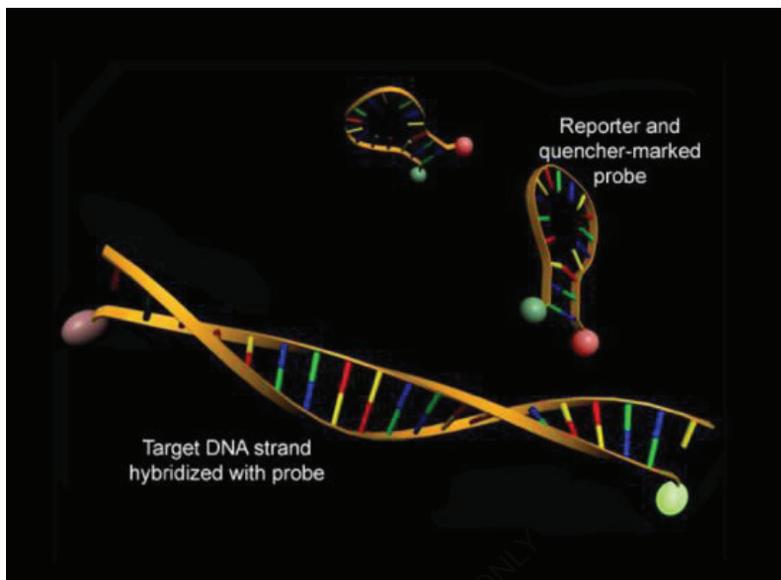
### **Sondas de escorpião**

As sondas de escorpião, como as balizas moleculares, não serão fluorescentes activas num estado não-hibridizado, mais uma vez, devido à sonda fluorescente na extremidade de 5' ter sido extinguida pela moleza na extremidade de 3' de um oligonucleótido, com Scorpions, no entanto, a extremidade de 3' também contém sequência que é complementar ao produto de extensão do primer na extremidade de 5'. Quando a extensão do Scorpion se liga ao seu complemento no amplicon, a estrutura do Scorpion abre, impede a FRET, e permite medir o sinal fluorescente.

### **Sondas multiplex**

Sondas TaqMan, balizas moleculares e escorpiões permitem a medição simultânea de produtos PCR num único tubo. Isto é possível porque cada um dos diferentes corantes fluorescentes pode ser associado a um espectrómetro de emissão específico. A utilização de sondas multiplex não só poupa tempo e esforço sem comprometer a utilidade do teste, como também a sua aplicação em vastas áreas de investigação, tais como a análise de eliminação de genes, análise de mutação e polimorfismo, análise quantitativa, e detecção de RNA, tornam-na uma técnica inestimável para laboratórios de muitas disciplinas.

Duas estratégias são geralmente utilizadas para quantificar os resultados obtidos por RT-PCR em tempo real; o método da curva padrão e o método do limiar comparativo.

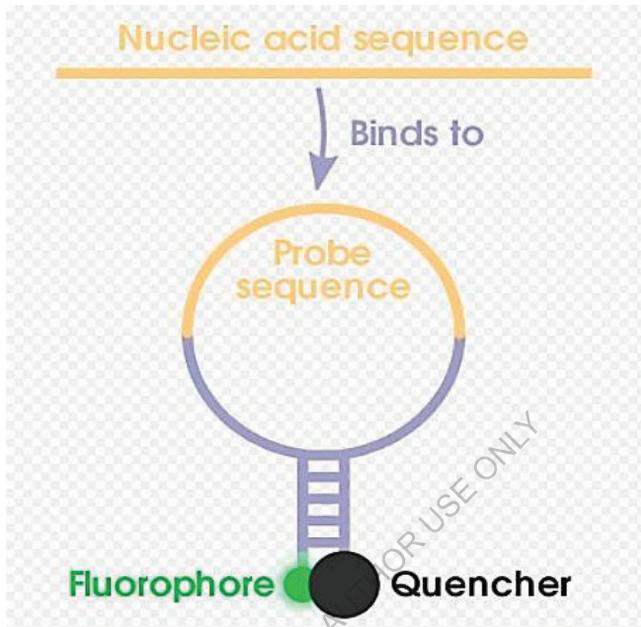


**Figura (53): Fio de ADN alvo hibridizado com sonda, Repórter e sonda com marca de têmpera.**

### **Utilização em engenharia celular**

Foram relatadas sondas de oligonucleótidos de sinalização fluorogénica para utilização na detecção e isolamento de células que expressam um ou mais genes desejados, incluindo a produção de linhas celulares estáveis multigénicas que expressam o canal epitelial de sódio heteromultimérico ( $\alpha\beta\gamma$ -ENaC), canal iónico de sódio de voltagem 1.7 (NaV1.7- $\alpha\beta1\beta2$ ), quatro combinações únicas de subunidades de canal iónico receptor de ácidoaminobutírico A (GABAA)  $\alpha1\beta3\gamma2s$ ,  $\alpha2\beta3\gamma2s$ ,  $\alpha3\beta3\gamma2s$  e

$\alpha 5\beta 3\gamma 2s$ , regulador de condutância de fibrose cística (CFTR), CFTR- $\Delta 508$  e dois receptores acoplados de proteína G (GPCRs).



**Figura (54):** As estruturas de uma típica sonda de farol molecular.

### Aplicações

A amplificação exponencial via transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase proporciona uma técnica altamente sensível na qual um número de cópias muito baixo de moléculas de RNA pode ser detectado. RT-PCR é amplamente utilizada no diagnóstico de doenças genéticas e, semiquantitativamente, na determinação da abundância de diferentes moléculas específicas de

RNA dentro de uma célula ou tecido, como medida de expressão genética.

### **Metodologia de RT-PCR**

RT-PCR é normalmente utilizado em métodos de investigação para medir a expressão genética. Por exemplo, Lin et al. usaram qRT-PCR para medir a expressão dos genes Gal em células de levedura. Em primeiro lugar, Lin et al. engendraram uma mutação de uma proteína suspeita de participar na regulação dos genes Gal. Esta mutação foi hipotética para abolir selectivamente a expressão de Gal. Para confirmar isto, os níveis de expressão genética das células de levedura contendo esta mutação foram analisados usando qRT-PCR. Os investigadores foram capazes de determinar de forma conclusiva que a mutação desta proteína reguladora reduziu a expressão de Gal. A análise da mancha setentrional é utilizada para estudar melhor a expressão do gene do RNA.

### **Inserção de genes**

RT-PCR também pode ser muito útil na inserção de genes eucariotas em procariotas. Como a maioria dos genes eucarióticos contém introns, que estão presentes no genoma mas não no mRNA maduro, o cDNA gerado a partir de uma reacção RT-PCR é a sequência exacta (sem ter em conta a natureza susceptível de erro

das transcriptases inversas) de ADN que seria directamente traduzida em proteína após transcrição. Quando estes genes são expressos em células procarióticas para fins de produção ou purificação de proteínas, o RNA produzido directamente a partir da transcrição não necessita de ser emendado, uma vez que a transcrição contém apenas exões. Os procariotas, como a *E. coli*, carecem do mecanismo de emenda do mRNA dos eucariotas.

### **Diagnóstico de doenças genéticas**

RT-PCR pode ser utilizado para diagnosticar doenças genéticas como a síndrome de Lesch-Nyhan. Esta doença genética é causada por um mau funcionamento do gene HPRT1, que clinicamente conduz à pedra urinária de ácido úrico fatal e a sintomas semelhantes à gota. A análise de uma mãe grávida e de um feto para os níveis de expressão de mRNA do HPRT1 revelará se a mãe é portadora e se o feto irá provavelmente desenvolver a síndrome de Lesch-Nyhan.

### **Detecção do cancro**

Os cientistas estão a trabalhar em formas de usar RT-PCR na detecção do cancro para ajudar a melhorar o prognóstico, e monitorizar a resposta à terapia. As células tumorais circulantes produzem transcrições únicas de mRNA, dependendo do tipo de cancro. O objectivo é determinar que transcrições de mRNA servem como os melhores biomarcadores para um tipo particular

de célula cancerígena e depois analisar os seus níveis de expressão com RT-PCR.

RT-PCR é normalmente utilizado no estudo dos genomas de vírus cujos genomas são compostos por RNA, como o Influenzavirus A, retrovírus como o HIV e o SARS-CoV-2.

## **Desafios**

Apesar das suas principais vantagens, a RT-PCR não está isenta de inconvenientes. O crescimento exponencial do ADN complementar transcrito ao contrário (cDNA) durante os múltiplos ciclos de PCR produz uma quantificação inexata do ponto final devido à dificuldade em manter a linearidade.<sup>[45]</sup> A fim de fornecer uma detecção e quantificação precisas do conteúdo de RNA numa amostra, qRT-PCR foi desenvolvido utilizando modificação baseada na fluorescência para monitorizar os produtos de amplificação durante cada ciclo de PCR. A extrema sensibilidade da técnica pode ser uma espada de dois gumes, uma vez que mesmo a mais pequena contaminação de ADN pode levar a resultados indesejáveis. Um método simples para a eliminação de resultados falsos positivos é incluir âncoras, ou etiquetas, na região de 5' de um primer específico de um gene. Além disso, o planeamento e concepção de estudos de quantificação podem ser tecnicamente desafiantes devido à existência de numerosas fontes de variação, incluindo a concentração do modelo e a eficiência da amplificação.

A adição de uma quantidade conhecida de RNA a uma amostra, a adição de uma série de diluições de RNA gerando uma curva padrão, e a adição numa amostra sem modelo de cópia (sem cDNA) podem ser utilizadas como controlos. O RT-PCR pode ser realizado pelo protocolo RT-PCR de uma etapa ou pelo protocolo RT-PCR de duas etapas.

### **RT-PCR de uma etapa**

O mRNA de um passo de RT-PCR tem como alvo mRNA até 6 kb para inverter a transcrição seguida de amplificação por PCR num único tubo de ensaio. É importante notar que a utilização de RNA intacto e de alta qualidade e de um iniciador específico da sequência produzirá os melhores resultados.

Uma vez seleccionado um kit RT-PCR de uma etapa com uma mistura de transcriptase inversa, Taq DNA polimerase, e uma polimerase de revisão e todos os materiais e equipamentos necessários são obtidos, deve ser preparada uma mistura de reacção. A mistura de reacção inclui dNTPs, primários, RNA modelo, enzimas necessárias, e uma solução tampão. A mistura de reacção é adicionada a um tubo PCR para cada reacção, seguido do modelo de RNA. Os tubos de PCR são então colocados num termociclador para iniciar a ciclagem. No primeiro ciclo, ocorre a síntese de cDNA. O segundo ciclo é a desnaturação inicial em que a transcriptase inversa é inactivada. Os restantes 40-50 ciclos são a

amplificação, que inclui a desnaturação, o recozimento e o alongamento. Quando a amplificação estiver completa, os produtos RT-PCR podem ser analisados com electroforese em gel.

### **RT-PCR em duas etapas**

O RT-PCR em duas etapas, como o nome indica, ocorre em duas etapas. Primeiro a transcrição inversa e, em seguida, a PCR. Este método é mais sensível do que o método de uma etapa. Os kits são também úteis para a RT-PCR em duas etapas. Tal como para a PCR de uma etapa, usar apenas RNA intacto e de alta qualidade para os melhores resultados. O primário para a PCR de duas etapas não tem de ser específico da sequência.

#### **Primeiro passo**

Primeiro combinar RNA modelo, primário, mistura de dNTP, e água sem núcleos num tubo PCR. Depois, adicionar um inibidor de RNase e inverter a transcriptase ao tubo de PCR. Em seguida, colocar o tubo PCR num termociclador durante um ciclo onde ocorre recozimento, extensão, e inactivação da transcriptase inversa. Finalmente, proceder directamente à segunda etapa, que é a PCR ou armazenar o produto em gelo até que a PCR possa ser realizada.

## **Segundo passo**

Adicionar master mix que contém tampão, dNTP mix, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerase e água livre de nucleases a cada tubo PCR. Em seguida, adicionar o primer necessário aos tubos. De seguida, colocar os tubos PCR num termociclador durante 30 ciclos do programa de amplificação. Isto inclui: desnaturação, recozimento, e alongamento. Os produtos de RT-PCR podem ser analisados com electroforese de gel.

## **Directrizes de publicação**

O ensaio quantitativo RT-PCR é considerado como o padrão de ouro para medir o número de cópias de alvos específicos de cDNA numa amostra, mas é pouco padronizado. Como resultado, embora existam numerosas publicações que utilizam a técnica, muitas fornecem detalhes experimentais inadequados e utilizam análises de dados inadequadas para tirar conclusões inadequadas. Devido à variabilidade inerente na qualidade de quaisquer dados PCR quantitativos, não só os revisores têm dificuldade em avaliar estes manuscritos, como também os estudos se tornam impossíveis de replicar. Reconhecendo a necessidade de padronização dos relatórios das condições experimentais, as directrizes de Informação Mínima para Publicação de Experiências de PCR Quantitativas em Tempo Real (MIQE, pronuncia-se mykee) foram publicadas por um consórcio internacional de cientistas académicos. As directrizes MIQE descrevem a informação mínima

necessária para a avaliação de experiências de PCR quantitativa que deve ser exigida para publicação, a fim de encorajar uma melhor prática experimental e assegurar a relevância, exactidão, interpretação correcta, e repetibilidade dos dados de PCR quantitativa. Para além das directrizes de comunicação, o MIQE salienta a necessidade de padronizar a nomenclatura associada à PCR quantitativa para evitar confusão, por exemplo, a abreviatura qPCR deve ser utilizada para a PCR quantitativa em tempo real e RT-qPCR deve ser utilizada para a transcrição inversa-qPCR e os genes utilizados para a normalização devem ser referidos como genes de referência em vez de genes de gestão doméstica. Também propõe que termos comercialmente derivados como sondas TaqMan não devem ser utilizados, mas sim referidos como sondas de hidrólise. Além disso, propõe-se que o ciclo de quantificação (Cq) seja utilizado para descrever o ciclo de PCR utilizado para quantificação em vez do ciclo de limiar (Ct), ponto de cruzamento (Cp), e ponto de descolagem (TOP), que se referem ao mesmo valor mas foram cunhadas por diferentes fabricantes de instrumentos em tempo real.

A linha de orientação consiste nos seguintes elementos:

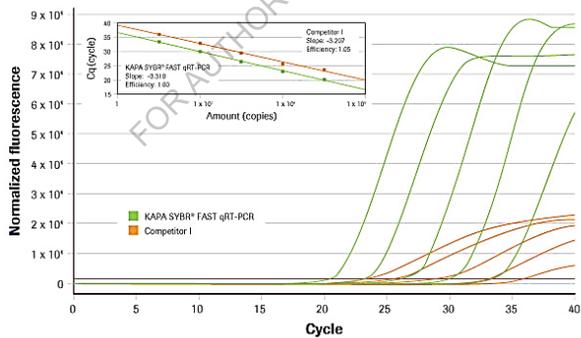
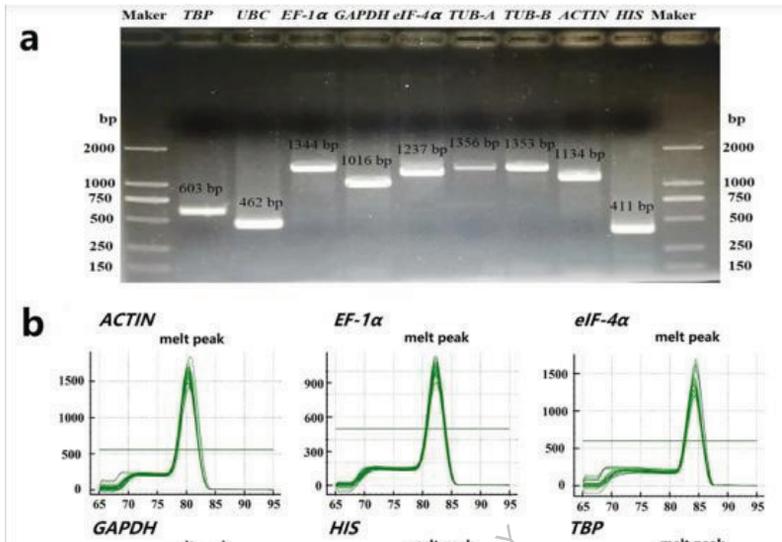
- 1) desenho experimental.
- 2) amostra.
- 3) extracção de ácido nucleico.
- 4) transcrição inversa.

- 5) qPCR target information.
- 6) oligonucleotídeos.
- 7) protocolo.
- 8) validação.
- 9) análise de dados.

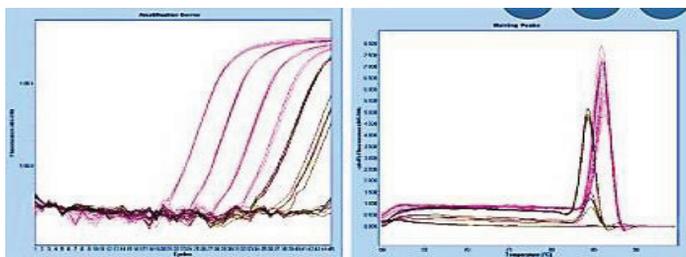
Os elementos específicos dentro de cada elemento têm uma etiqueta de E (essencial) ou D (desejável). Os rotulados E são considerados críticos e indispensáveis, enquanto os rotulados D são considerados periféricos, mas importantes para as melhores práticas.



**Figura (55): RT-PCR em duas etapas**



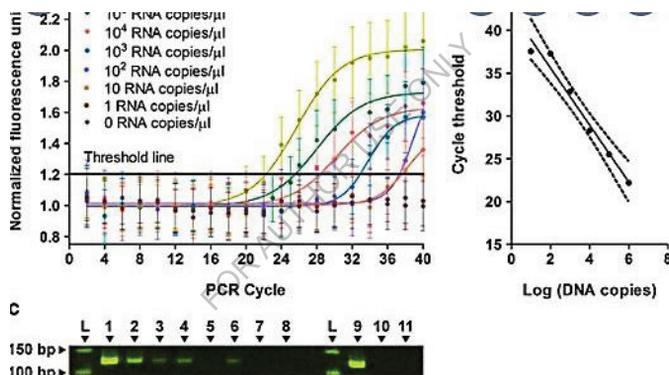
RRM1 gene (94 bp, 45.7% GC) amplified from 10-fold dilution series of RNA (100 ng to 10 pg per 20  $\mu$ L reaction) isolated from human placenta. KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kit demonstrates earlier  $C_q$  values, higher fluorescence, and optimal reaction efficiencies.



**Fig 2. Exceptional Speed and Sensitivity of AzuraQuant™ Green One-Step qPCR Mix.**

qPCR amplification and melt traces of mouse housekeeping gene Phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1) directly from Total RNA (dilution series).

Panel B: AzuraQuant™ Green One-Step qPCR Mix (Purple) is compared with Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit (Black). In each case, AzuraQuant™ Green One-Step qPCR Mix exhibits earlier Ct values and improved sensitivity.



**Figura (56): CT de RT-PCR com pico de expressão genética.**

## 1-3 Referências

1. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Evolução, os temas da biologia, e a investigação científica". *Campbell Biology* (11<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 2-26. ISBN 978-0134093413.
2. Hillis, David M.; Heller, H. Craig; Hacker, Sally D.; Laskowski, Marta J.; Sadava, David E. (2020). "Estudar a vida". *A vida: The Science of Biology*(12th ed.). W. H. Freeman. ISBN 978-1319017644.
3. Freeman, Scott; Quillin, Kim; Allison, Lizabeth; Black, Michael; Podgorski, Greg; Taylor, Emily; Carmichael, Jeff (2017). "Biologia e os três da vida". *Biological Science* (6<sup>a</sup> ed.). Hoboken, N.J.: Pearson. pp. 1-18. ISBN 978-0321976499.
4. Modell, Harold; Cliff, William; Michael, Joel; McFarland, Jenny; Wenderoth, Mary Pat; Wright, Ann (Dezembro de 2015). "A opinião de um fisiologista sobre a homeostase". *Avanços na Educação em Fisiologia*. **39** (4): 259–266. doi:10.1152/advan.00107.2015. ISSN 1043-4046. PMC 4669363. PMID 26628646.
5. Davies, PC; Rieper, E; Tuszynski, JA (Janeiro de 2013). "Auto-organização e redução da entropia numa célula viva". *Sistemas biológicos*. **111** (1): 1–10.

- doi:10.1016/j.biosystems.2012.10.005. PMC 3712629.  
PMID 23159919.
6. Com base na definição de: "Aquarena Wetlands Project glossário de termos". Universidade Estadual do Texas em San Marcos. Arquivado a partir do original em 2004-06-08.
  7. Craig, Nancy (2014). *Molecular Biology, Principles of Genome Function*. ISBN 978-0-19-965857-2.
  8. Mosconi, Francesco; Julou, Thomas; Desprat, Nicolas; Sinha, Deepak Kumar; Allemand, Jean-François; Vincent Croquette; Bensimon, David (2008). "Alguns desafios não lineares em biologia". *Não-linearidade*. 21 (8): T131. Bibcode:2008Nonli...21..131M. doi:10.1088/0951-7715/21/8/T03. ISSN 0951-7715.
  9. Howell, Elizabeth (8 de Dezembro de 2014). "Como é que a vida se tornou complexa, e poderia acontecer além da Terra?". *Revista Astrobiologia*. Arquivada a partir do original a 17 de Agosto de 2018. Recuperado a 14 de Fevereiro de 2018.
  10. Pearce, Ben K.D.; Tupper, Andrew S.; Pudritz, Ralph E.; et al. (1 de Março de 2018). "Constraining the Time Interval for the Origin of Life on Earth". *Astrobiologia*. 18 (3): 343-364. arXiv:1808.09460. Bibcode:2018AsBio...18..343P. doi:10.1089/ast.2017.1674. ISSN 1531-1074. PMID 29570409. S2CID 4419671.

11. "Quem cunhou o termo biologia?". Info.com. Arquivado a partir do original em 2013-05-09. Recuperado em 2012-06-03.
12. "biologia". Dicionário de Etimologia Online. Arquivado a partir do original em 2013-03-07.
13. Richards, Robert J. (2002). *The Romantic Conception of Life (A Concepção Romântica da Vida): A Ciência e a Filosofia na Era de Goethe*. Imprensa da Universidade de Chicago. ISBN 978-0-226-71210-9.
14. Lindberg, David C. (2007). "A ciência perante os gregos". *Os primórdios da ciência ocidental: a tradição científica europeia no contexto filosófico, religioso e institucional (Segunda ed.)*. Chicago, Illinois: University of Chicago Press. pp. 1-20. ISBN 978-0-226-48205-7.
15. Grant, Edward (2007). "Ancient Egypt to Plato". *A History of Natural Philosophy: Do Mundo Antigo ao Século XIX (Primeira ed.)*. Nova Iorque, Nova Iorque: Cambridge University Press. pp. 1-26. ISBN 978-052-1-68957-1.
16. Magner, Lois N. (2002). *A History of the Life Sciences, Revised and Expanded*. CRC Press. ISBN 978-0-203-91100-6. Arquivado a partir do original em 2015-03-24.
17. Serafini, Anthony (2013). *A História Épica da Biologia*. ISBN 978-1-4899-6327-7. Recuperado a 14 de Julho de 2015.

18. Uma ou mais das frases anteriores incorpora texto de uma publicação agora no domínio público: Chisholm, Hugh, ed. (1911). "Theophrastus". *Encyclopædia Britannica* (11<sup>a</sup> ed.). Imprensa da Universidade de Cambridge.
19. Fahd, Toufic (1996). "Botânica e agricultura". Em Morelon, Régis; Rashed, Roshdi (eds.). *Encyclopedia of the History of Arabic Science*. 3. Routledge. p. 815. ISBN 978-0-415-12410-2.
20. Magner, Lois N. (2002). *A History of the Life Sciences, Revised and Expanded*. CRC Press. pp. 133-44. ISBN 978-0-203-91100-6. Arquivado a partir do original em 2015-03-24.
21. Sapp, Jan (2003). "7". *Génesis: A Evolução da Biologia*. Nova Iorque; Oxford University Press. ISBN 978-0-19-515618-8.
22. Coleman, William (1977). *Biologia no Século XIX: Problemas de Forma, Função, e Transformação*. Nova Iorque: Imprensa da Universidade de Cambridge. ISBN 978-0-521-29293-1.
23. Mayr, Ernst. *The Growth of Biological Thought*, capítulo 4
24. Mayr, Ernst. *The Growth of Biological Thought*, capítulo 7
25. Darwin 1909, p. 53

26. Gould, Stephen Jay. A Estrutura da Teoria Evolutiva. The Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, 2002. ISBN 0-674-00613-5. p. 187.
27. Lamarck (1914)
28. Mayr, Ernst. The Growth of Biological Thought, capítulo 10: "Darwin's evidence for evolution and common descent"; e capítulo 11: "The causation of evolution: natural selection".
29. Larson, Edward J. (2006). "Ch. 3". Evolução: A Notável História de uma Teoria Científica. Grupo Editorial da Random House. ISBN 978-1-58836-538-5. Arquivado a partir do original em 2015-03-24.
30. Henig (2000). Op. cit., pp. 134-138.
31. Miko, Ilona (2008). "Os princípios de herança de Gregor Mendel formam a pedra angular da genética moderna. Então, quais são eles?". A educação da natureza. 1 (1): 134.
32. Futuyma, Douglas J.; Kirkpatrick, Mark (2017). "Biologia Evolutiva". Evolução (4ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 3–26.
33. Nobre, Ivan (2003-04-14). "Genoma humano finalmente completo". BBC News. Arquivado a partir do original em 2006-06-14. Recuperado de 2006-07-22.

34. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "O contexto químico da vida". *Campbell Biology*(11ª ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 28-43. ISBN 978-0134093413.
35. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Água e vida". *Campbell Biology* (11ª ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 44–55. ISBN 978-0134093413.
36. "Ligação iónica". *Compêndio de Terminologia Química da IUPAC*. 2009. doi:10.1351/goldbook.IT07058. ISBN 978-0-9678550-9-7.
37. Campbell, Neil A.; Williamson, Brad; Heyden, Robin J. (2006). *Biologia: Explorando a Vida*. Boston. ISBN 0-13-250882-6. Recuperado em 2012-02-05.<sup>[melhor fonte necessária]</sup>
38. Freeman, Scott; Quillin, Kim; Allison, Lizabeth; Black, Michael; Podgorski, Greg; Taylor, Emily; Carmichael, Jeff (2017). "Água e carbono: a base química da vida". *Ciência Biológica* (6ª ed.). Hoboken, N.J.: Pearson. pp. 55-77. ISBN 978-0321976499.
39. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Diversidade Molecular da Vida". *Campbell Biology* (11ª ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 56-65. ISBN 978-0134093413.

40. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "A estrutura e função das grandes moléculas biológicas". *Campbell Biology* (11<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 66-92. ISBN 978-0134093413.
41. Mazzarello, P (Maio de 1999). "Um conceito unificador: a história da teoria celular". *A Biologia Celular da Natureza*. **1** (1): E13-15. doi:10.1038/8964. PMID 10559875. S2CID 7338204.
42. Campbell NA, Williamson B, Heyden RJ (2006). *Biologia: Explorando a Vida*. Boston: Pearson Prentice Hall. ISBN 9780132508827.
43. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Estrutura e função das membranas". *Campbell Biology* (11<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 126-142. ISBN 978-0134093413.
44. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*(4th ed.). Nova Iorque: Garland Science. ISBN 978-0-8153-3218-3. Arquivado a partir do original em 2017-12-20.
45. Tom Herrmann; Sandeep Sharma (2 de Março de 2019). "Physiology, Membrane". *StatPearls*. PMID 30855799.

46. Cell Movements and the Shaping of the Vertebrate Body in Chapter 21 of Molecular Biology of the Cell fourth edition, editado por Bruce Alberts (2002) publicado por Garland Science. O texto de Alberts discute como os "blocos de construção celular" se movem para moldar os embriões em desenvolvimento. É também comum descrever pequenas moléculas tais como os aminoácidos como "blocos de construção molecular".
47. Freeman, Scott; Quillin, Kim; Allison, Lizabeth; Black, Michael; Podgorski, Greg; Taylor, Emily; Carmichael, Jeff (2017). "Energia e enzimas": Uma introdução ao metabolismo". Ciência Biológica (6ª ed.). Hoboken, N.J.: Pearson. pp. 171-188. ISBN 978-0321976499.
48. Bailey, Regina. "Respiração Celular". Arquivado a partir do original em 2012-05-05.
49. Schmidt-Rohr, K. (2015). "Why Combustions Are Always Exothermic, Yielding About 418 kJ per Mole of O<sub>2</sub>", J. Chem. Educ. **92**: 2094-2099.<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00333>
50. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Kaiser, Chris A.; Krieger, Monty; Scott, Matthew P.; Bretscher, Anthony; Ploegh, Hidde; Matsudaira, Paul (2008). "Cellular

- energetics". *Biologia Celular Molecular* (6ª ed.). Nova Iorque: W.H. Freeman and Company. pp. 479–532. ISBN 978-0716776017.
51. "fotossíntese". *Dicionário de Etimologia Online*. Arquivado a partir do original em 2013-03-07. Recuperado em 2013-05-23.
52. Liddell, Henry George; Scott, Robert; *Um Léxico Grego-Inglês no Projecto Perseus*
53. Liddell, Henry George; Scott, Robert; *Um Lexiconat Grego-Inglês no Projecto Perseus*
54. Bryant DA, Frigaard NU (Nov 2006). "Fotossíntese procariótica e fototrofia iluminada". *Tendências em Microbiologia*. **14** (11): 488-496. doi:10.1016/j.tim.2006.09.001. PMID 16997562.
55. Reece J, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R (2011). *Biologia* (Ed. Internacional). Upper Saddle River, N.J.: Pearson Education. pp. 235, 244. ISBN 978-0-321-73975-9. Esta incorporação inicial de carbono em compostos orgânicos é conhecida como fixação de carbono.
56. Neitzel, James; Rasband, Matthew. "Comunicação celular". *Educação da Natureza*. Recuperado a 29 de Maio de 2021.
57. "Sinalização celular". *Educação da Natureza*. Recuperado a 29 de Maio de 2021.

58. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Membranas celulares e sinalização". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 82-104. ISBN 978-1464175121.
59. Martin EA, Hine R (2020). *Um dicionário de biologia* (6ª ed.). Oxford: Oxford University Press. ISBN 9780199204625. OCLC 176818780.
60. Griffiths AJ (2012). *Introdução à análise genética* (10ª ed.). Nova Iorque: W.H. Freeman and Co. ISBN 9781429229432. OCLC 698085201.
61. "10.2 O Ciclo Celular - Biologia 2e | OpenStax". [openstax.org](https://openstax.org). Recuperado em 2020-11-24.
62. Freeman, Scott; Quillin, Kim; Allison, Lizabeth; Black, Michael; Podgorski, Greg; Taylor, Emily; Carmichael, Jeff (2017). "Meiose". *Biological Science* (6ª ed.). Hoboken, N.J.: Pearson. pp. 271-289. ISBN 978-0321976499.
63. Casiraghi A, Suigo L, Valoti E, Straniero V (Fevereiro de 2020). "Targeting Bacterial Cell Division": A Binding Site-Centered Approach to the Most Promising Inhibitors of the Essential Protein FtsZ". *Antibióticos*. **9** (2): 69. doi:10.3390/antibiotics9020069. PMC 7167804. PMID 32046082.

64. Griffiths, Anthony J.; Wessler, Susan R.; Carroll, Sean B.; Doebley, John (2015). "A revolução genética". An Introduction to Genetic Analysis(11th ed.). Sunderland, Mass.: W.H. Freeman & Company. pp. 1-30. ISBN 978-1464109485.
65. Griffiths, Anthony J.F.; Miller, Jeffrey H.; Suzuki, David T.; Lewontin, Richard C.; Gelbart, William M., eds. (2000). "Genetics and the Organism: Introduction". An Introduction to Genetic Analysis (7ª ed.). Nova Iorque: W. H. Freeman. ISBN 978-0-7167-3520-5.
66. Hartl, D; Jones, E (2005). Genética: Análise de Genes e Genomas(6ª ed.). Jones & Bartlett. ISBN 978-0-7637-1511-3.
67. Rutgers: Princípios Mendelianos
68. Miko, Ilona (2008), "Test Crosses", Nature Education, **1** (1): 136
69. Miko, Ilona (2008), "Thomas Hunt Morgan and sex linkage", Nature Education, **1** (1): 143
70. "Pedigree". Instituto Nacional de Investigação do Genoma Humano. Recuperado a 28 de Maio de 2021. Um pedigree é uma representação genética de uma árvore genealógica que ilustra a herança de um traço ou doença através de várias gerações. O pedigree mostra as relações

- entre os membros da família e indica que indivíduos expressam ou carregam silenciosamente o traço em questão.
71. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Mendel e a ideia do gene". *Campbell Biology* (11<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 269-293. ISBN 978-0134093413.
  72. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2014). *Biologia Molecular da Célula* (6<sup>a</sup> ed.). Garland. p. Capítulo 4: ADN, Cromossomas e Genomas. ISBN 978-0-8153-4432-2. Arquivado a partir do original em 14 de Julho de 2014.
  73. Purcell A. "ADN". *Biología Básica*. Arquivado a partir do original em 5 de Janeiro de 2017.
  74. Russell P (2001). *iGenetics*. Nova Iorque: Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-4553-1.
  75. Thanbichler, M; Wang, SC; Shapiro, L (Outubro de 2005). "O nucleóide bacteriano: uma estrutura altamente organizada e dinâmica". *Journal of Cellular Biochemistry*. **96** (3): 506-21. doi:10.1002/jcb.20519. PMID 15988757. S2CID 25355087.
  76. "Definição de genótipo - Definições de dicionário médico". *Medterms.com*. 2012-03-19. Arquivado a partir do original em 2013-09-21. Recuperado em 2013-10-02.

77. Crick FH (1958). "Sobre a síntese de proteínas". *Simpósios da Sociedade de Biologia Experimental*. **12**: 138–63. PMID 13580867.
78. Crick F (Agosto de 1970). "Dogma central da biologia molecular". *A natureza*. **227**(5258): 561–3. Bibcode:1970Natur.227.. 561C. doi:10.1038/227561a0. PMID 4913914. S2CID 4164029.
79. "Dogma central invertido". *Natureza*. **226** (5252): 1198–9. Junho de 1970. Bibcode:1970Natur.226.1198.. doi:10.1038/2261198a0. PMID 5422595. S2CID 4184060.
80. "Uracil". Genome.gov. Recuperado em 2019-11-21.
81. Temin HM, Mizutani S (Junho de 1970). "DNA polimerase dependente de RNA em viriões do vírus do sarcoma rous". *Natureza*. **226** (5252): 1211-3. doi:10.1038/2261211a0. PMID 4316301. S2CID 4187764.
82. Baltimore D (Junho de 1970). "DNA polimerase dependente de RNA em viriões de vírus de tumores de RNA". *Natureza*. **226** (5252): 1209–11. doi:10.1038/2261209a0. PMID 4316300. S2CID 4222378.
83. "Definições de genética e genómica da OMS". Organização Mundial de Saúde.
84. *Conceitos de genética* (10ª ed.). São Francisco: Educação de Pearson. 2012. ISBN 978-0-321-72412-0.

85. Culver KW, Labow MA (8 de Novembro de 2002). "Genomics". Em Robinson R (ed.). Genetics. Macmillan Science Library. Macmillan Reference USA. ISBN 978-0-02-865606-9.
86. Kadakkuzha BM, Puthanveetil SV (Julho de 2013). "Genomics and proteomics in solving brain complexity". BioSistemas Moleculares. **9** (7): 1807–21. doi:10.1039/C3MB25391K. PMC 6425491. PMID 23615871.
87. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Biotecnologia". Princípios de Vida (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 234-252. ISBN 978-1464175121.
88. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Biotecnologia". Princípios de Vida (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 253-272. ISBN 978-1464175121.
89. Freeman, Scott; Quillin, Kim; Allison, Lizabeth; Black, Michael; Podgorski, Greg; Taylor, Emily; Carmichael, Jeff (2017). "Biologia e os três da vida". Biological Science (6ª ed.). Hoboken, N.J.: Pearson. pp. 398–417. ISBN 978-0321976499.
90. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Genes, desenvolvimento, e

- evolução". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 273-298. ISBN 978-1464175121.
91. Slack, J.M.W. (2013) *Essential Developmental Biology*. Wiley-Blackwell, Oxford.
92. Slack, J.M.W. (2007). "Metaplasia e transdiferenciação: da biologia pura à clínica". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8** (5): 369-378. doi:10.1038/nrm2146. PMID 17377526. S2CID 3353748.
93. Atala A, Lanza R (2012-12-31). *Manual de Células-Tronco*. Imprensa Acadêmica. p. 452. ISBN 978-0-12-385943-3.
94. Yanes, Oscar; Clark, Julie; Wong, Diana M.; Patti, Gary J.; Sánchez-Ruiz, Antonio; Benton, H. Paul; Trauger, Sunia A.; Despons, Caroline; Ding, Sheng; Siuzdak, Gary (Junho de 2010). "A oxidação metabólica regula a diferenciação das células estaminais embrionárias". *Natureza Biologia Química*. **6** (6): 411-417. doi:10.1038/nchembio.364. ISSN 1552-4469. PMC 2873061. PMID 20436487.
95. Carroll, Sean B. "The Origins of Form" (As Origens da Forma). *História Natural*. Recuperado a 9 de Outubro de 2016. Os biólogos poderiam dizer, com confiança, que as formas mudam, e que a selecção natural é uma força importante para a mudança. No entanto, nada poderiam dizer

sobre como essa mudança é realizada. Como os corpos ou partes do corpo mudam, ou como surgem novas estruturas, permaneceram completamente misteriosos.

96. Abzhanov, A.; Protas, M.; Grant, B.R.; Grant, P.R.; Tabin, C.J. (2004). "Bmp4 and Morphological Variation of Beaks in Darwin's Finches". *Ciência*. **305**(5689): 1462–1465. Bibcode:2004Sci...305.1462A. doi:10.1126/science.1098095. PMID 15353802. S2CID 17226774.
97. Cohn, M.J.; Tickle, C. (1999). "Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes". *Natureza*. **399** (6735): 474–479. Bibcode:1999Natur.399.. 474C. doi:10.1038/20944. PMID 10365960. S2CID 4309833.
98. Beverdam, A.; Merlo, G.R.; Paleari, L.; Mantero, S.; Genova, F.; Barbieri, O.; Janvier, P.; Levi, G. (Agosto de 2002). "Jaw Transformation With Gain of Symmetry After DLX5/DLX6 Inactivation" (Transformação da mandíbula com ganho de simetria após inativação do DLX5/DLX6): *Espelho do Passado?* (PDF). *Génesis*. **34** (4): 221-227. doi:10.1002/gene.10156. hdl:2318/87307. PMID 12434331. S2CID 19592597.
99. Depew, M.J.; Lufkin, T.; Rubenstein, J.L. (Outubro de 2002). "Specification of jaw subdivisions by DLX genes". *Ciência*. **298** (5592): 381–385.

- doi:10.1126/science.1075703. PMID 12193642. S2CID 10274300.
100. Panganiban, Grace; Rubenstein, John L. R. (2002). "Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes". *Desenvolvimento*. **129** (19): 4371–4386. doi:10.1242/dev.129.19.4371. PMID 12223397.
101. Beldade, P.; Brakefield, P.M.; Long, A.D. (2002). "Contribution of Distal-less to quantitative variation in butterfly eyespots". *Natureza*. **415** (6869): 315-318. doi:10.1038/415315a. PMID 11797007. S2CID 4430563.
102. Hall & Hallgrímsson 2008, pp. 4-6
103. "Recursos de Evolução". Washington, D.C.: National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016. Arquivado a partir do original em 2016-06-03.
104. Packard, Alpheus Spring (1901). *Lamarck, o fundador da Evolução: a sua vida e trabalho com traduções dos seus escritos sobre a evolução orgânica*. Nova Iorque: Longmans, Green. ISBN 978-0-405-12562-1.
105. "The Complete Works of Darwin Online - Biography". darwin-online.org.uk. Arquivado a partir do original em 2007-01-07. Recuperado de 2006-12-15.
106. Dobzhansky, T. (1973). "Nada em biologia faz sentido, excepto à luz da evolução". *O Professor de Biologia*

- Americano. **35** (3): 125–29. CiteSeerX 10.1.1.525.3586. doi:10.2307/4444260. JSTOR 4444260. S2CID 207358177.
107. Carroll, Joseph, ed. (2003). Sobre a origem das espécies por meio da selecção natural. Peterborough, Ontário: Broadview. p. 15. ISBN 978-1-55111-337-1. Como o estudioso darwiniano Joseph Carroll, da Universidade do Missouri-St. Louis, coloca na sua introdução a uma reimpressão moderna da obra de Darwin: "A Origem das Espécies" tem afirmações especiais sobre a nossa atenção. É uma das duas ou três obras mais significativas de todos os tempos - uma dessas obras - que altera fundamental e permanentemente a nossa visão do mundo ... É argumentada com uma consistência singularmente rigorosa, mas é também eloquente, imaginativamente evocativa, e retórica convincente".
108. Shermer p. 149.
109. Lewontin, Richard C. (Novembro de 1970). "As Unidades de Seleção" (PDF). *Annual Review of Ecology and Systematics*. **1**: 1-18. doi:10.1146/annurev.es.01.110170.000245. ISSN:1545-2069. JSTOR 2096764. Arquivado (PDF) a partir do original em 2015-02-06.
110. Darwin, Charles (1859). Sobre a Origem da Espécie, John Murray.

111. Charlesworth, Brian; Charlesworth, Deborah (2009). "Darwin e a genética". *Genética*. **183** (3): 757–766. doi:10.1534/genetics.109.109991. PMC 2778973. PMID 1993323231.
112. Futuyma, Douglas J.; Kirkpatrick, Mark (2017). "Biologia evolutiva". *Evolução* (4ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 3–26.
113. Futuyma, Douglas J.; Kirkpatrick, Mark (2017). "Mutação e variação". *Evolução* (4ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 79-101.
114. Simpson, George Gaylord (1967). *The Meaning of Evolution* (Segunda ed.). Imprensa da Universidade de Yale. ISBN 978-0-300-00952-1.
115. Masel, Joanna (25 de Outubro de 2011). "Genetic drift". *Biologia actual*. **21**(20): R837–R838. doi:10.1016/j.cub.2011.08.007. ISSN 0960-9822. PMID 22032182. S2CID 17619958.
116. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Speciation". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 343–356. ISBN 978-1464175121.
117. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Reconstru o e utilização de

- filogenias". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 325–342. ISBN 978-1464175121.
118. Woese, CR; Kandler, O; Wheelis, ML (Junho de 1990). "Para um sistema natural de organismos: proposta para os domínios Archaea, Bacteria, e Eucarya". *Actas da Academia Nacional das Ciências dos Estados Unidos da América*. **87** (12): 4576–79. Bibcode:1990PNAS...87.4576W. doi:10.1073/pnas.87.12.4576. PMC 54159. PMID 2112744.
119. McNeill, J; Barrie, FR; Buck, WR; Demoulin, V; Greuter, W; Hawksworth, DL; et al. (2012). *Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne)* adoptado pelo 18º Congresso Internacional de Botânica de Melbourne, Austrália, Julho de 2011. A.R.G. Gantner Verlag KG. ISBN 978-3-87429-425-6. Arquivado a partir do original em 2013-11-04. Recomendação 60F
120. Silyn-Roberts, Heather (2000). *Escrita para a Ciência e Engenharia: Artigos, Apresentação*. Oxford: Butterworth-Heinemann. p. 198. ISBN 978-0-7506-4636-9. Arquivado a partir do original em 2020-10-02. Recuperado em 2020-08-24.
121. Montévil, M; Mossio, M; Pocheville, A; Longo, G (Outubro de 2016). "Princípios teóricos para a biologia":

- Varição". *Progresso em Biofísica e Biologia Molecular. Do Século do Genoma ao Século do Organismo: Novas Abordagens Teóricas.* **122** (1): 36–50. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.005. PMID 27530930. Arquivado a partir do original em 2018-03-20.
122. De Duve, Christian (2002). *A Evolução da Vida: Moléculas, Mente, e Significado.* Nova Iorque: Oxford University Press. p. 44. ISBN 978-0-19-515605-8.
123. Futuyma 2005
124. Futuyma, DJ (2005). *Evolução.* Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-187-3. OCLC 57311264.
125. Rosing, Minik T. (29 de Janeiro de 1999). "<sup>13</sup>C-Depleted Carbon Microparticles in >3700-Ma Sea-Floor Sedimentary Rocks from West Greenland". *Ciência.* **283**(5402): 674–676. Bibcode:1999Sci...283.. 674R. doi:10.1126/science.283.5402.674. ISSN 0036-8075. PMID 9924024.
126. Ohtomo, Yoko; Kakegawa, Takeshi; Ishida, Akizumi; et al. (Janeiro de 2014). "Evidência de grafite biogénica nas primeiras rochas metasedimentares do Arqueano Isua". *Geociência da Natureza.* **7** (1): 25–28. Bibcode:2014NatGe...7...25O. doi:10.1038/ngeo2025. ISSN 1752-0894.

127. Nisbet, Euan G.; Fowler, C.M.R. (7 de Dezembro de 1999). "Archaean metabolic evolution of microbial mats" (Evolução metabólica Arqueana das esteiras microbianas). *Actas da Royal Society B*. **266**(1436): 2375–2382. doi:10.1098/rspb.1999.0934. ISSN 0962-8452. PMC 1690475.
128. Knoll, Andrew H.; Javaux, Emmanuelle J.; Hewitt, David; et al. (29 de Junho de 2006). "Organismos eucarióticos nos oceanos proterozóicos". *Transacções Filosóficas da Sociedade Real B*. **361** (1470): 1023–1038. doi:10.1098/rstb.2006.1843. ISSN 0962-8436. PMC 1578724. PMID 16754612.
129. Fedonkin, Mikhail A. (31 de Março de 2003). "The origin of the Metazoa in the light of the Proterozoic fossil record" (PDF). *Investigação Paleontológica*. **7** (1): 9-41. doi:10.2517/prpsj.7.9. ISSN 1342-8144. S2CID 55178329. Arquivado a partir do original (PDF) em 2009-02-26. Recuperado de 2008-09-02.
130. Bonner, John Tyler (7 de Janeiro de 1998). "The origins of multicellularity" (As origens da multicelularidade). *Biologia Integrativa*. **1** (1): 27–36. doi:10.1002/(SICI)1520-6602(1998)1:1< 27::AID-INBI4>3.0.CO;2-6. ISSN 1757-9694.

131. Strother, Paul K.; Battison, Leila; Brasier, Martin D.; et al. (26 de Maio de 2011). "Os mais antigos eucariotas não marinhos da Terra". *Natureza*. **473** (7348): 505–509. Bibcode:2011Natur.473.. 505S. doi:10.1038/nature09943. ISSN 0028-0836. PMID 21490597. S2CID 4418860.
132. Beraldi-Campesi, Hugo (23 de Fevereiro de 2013). "A vida precoce na terra e os primeiros ecossistemas terrestres". *Processos Ecológicos*. **2** (1): 1–17. doi:10.1186/2192-1709-2-1. ISSN:2192-1709.
133. Algeo, Thomas J.; Scheckler, Stephen E. (29 de Janeiro de 1998). "Teleconexões terrestres-marinhas no Devoniano: ligações entre a evolução das plantas terrestres, processos meteorológicos, e eventos anóxicos marinhos". *Transacções Filosóficas da Sociedade Real B*. **353** (1365): 113–130. doi:10.1098/rstb.1998.0195. ISSN 0962-8436. PMC 1692181.
134. Jun-Yuan, Chen; Oliveri, Paola; Chia-Wei, Li; et al. (25 de Abril de 2000). "Diversidade animal pré-cambriana": Putativos embriões fosfatizados da Formação Doushantuo da China". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (9): 4457–4462. Bibcode:2000PNAS...97.4457C. doi:10.1073/pnas.97.9.4457. ISSN 0027-8424. PMC 18256. PMID 10781044.

135. D-G., Shu; H-L., Luo; Conway Morris, Simon; et al. (4 de Novembro de 1999). "Vertebrados do baixo Cambriano do sul da China" (PDF). *Natureza*. **402** (6757): 42–46. Bibcode:1999Natur.402...42S. doi:10.1038/46965. ISSN 0028-0836. S2CID 4402854. Arquivado a partir do original (PDF) em 2009-02-26. Recuperado em 2015-01-22.
136. Hoyt, Donald F. (17 de Fevereiro de 1997). "Synapsid Reptiles". *ZOO 138 Vertebrate Zoology (Palestra)*. Pomona, Califórnia: Universidade Politécnica do Estado da Califórnia, Pomona. Arquivado a partir do original em 2009-05-20. Recuperado em 2015-01-22.
137. Barry, Patrick L. (28 de Janeiro de 2002). Phillips, Tony (ed.). "The Great Dying" (O Grande Moribundo). Science@NASA. Marshall Space Flight Center. Arquivado a partir do original em 2010-04-10. Recuperado em 2015-01-22.
138. Tanner, Lawrence H.; Lucas, Spencer G.; Chapman, Mary G. (Março de 2004). "Assessing the record and causes of Late Triassic extinctions" (PDF). *Críticas da Terra-Ciência*. **65** (1–2): 103–139. Bibcode:2004ESRv... 65.. 103T. doi:10.1016/S0012-8252(03)00082-5. Arquivado a partir do original (PDF) em 2007-10-25. Recuperado em 2007-10-22.
139. Benton 1997

140. Fastovsky, David E.; Sheehan, Peter M. (Março de 2005). "The Extinction of the Dinosaurs in North America" (PDF). *GSA Hoje*. **15** (3): 4-10. doi:10.1130/1052-5173(2005)015< 4:TEOTDI>2.0.CO;2. ISSN 1052-5173. Arquivado (PDF) a partir do original em 2019-03-22. Recuperado em 2015-01-23.
141. Roach, John (20 de Junho de 2007). "A Extinção dos Dinossauros Estimulou a Ascensão dos Mamíferos Modernos". *National Geographic News*. Washington, D.C.: National Geographic Society. Arquivado a partir do original em 2008-05-11. Recuperado em 2020-02-21.
142. Wible, John R.; Rougier, Guillermo W.; Novacek, Michael J.; et al. (21 de Junho de 2007). "Cretáceos de origem euteriana e Laurasiana para mamíferos placentários próximos da fronteira K/T". *Natureza*. **447** (7147): 1003–1006. Bibcode:2007Natur.447.1003W. doi:10.1038/nature05854. ISSN 0028-0836. PMID 17581585. S2CID 4334424.
143. Van Valkenburgh, Blaire (1 de Maio de 1999). "Principais Padrões na História dos Mamíferos Carnívoros". *Revisão Anual das Ciências da Terra e Planetárias*. **27**: 463–493. Bibcode:1999AREPS.. 27..463V. doi:10.1146/annurev.earth.27.1.463. ISSN:1545-4495.

144. Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Li SM, Kostandarithes HM, Daly MJ, Romine MF, Brockman FJ (Julho de 2004). "Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state". *Microbiologia Aplicada e Ambiental*. **70** (7): 4230–41. Bibcode:2004ApEnM...70.4230F. doi:10.1128/AEM.70.7.4230-4241.2004. PMC 444790. PMID 15240306.
145. Dudek NK, Sun CL, Burstein D (2017). "Novel Microbial Diversity and Functional Potential in the Marine Mammal Oral Microbiome" (PDF). *Biologia actual*. **27** (24): 3752–3762. doi:10.1016/j.cub.2017.10.040. PMID 29153320. S2CID 43864355.
146. Pace NR (Maio de 2006). "Tempo para uma mudança". *Natureza*. **441** (7091): 289. Bibcode:2006Natur.441... 289P. doi:10.1038/441289a. PMID 16710401. S2CID 4431143.
147. Stoeckenius W (Outubro de 1981). "Bactéria quadrada de Walsby: fina estrutura de um procarionte ortogonal". *Jornal de Bacteriologia*. **148** (1): 352–60. doi:10.1128/JB.148.1.352-360.1981. PMC 216199. PMID 7287626.
148. "Biologia Básica da Archaea". Março de 2018.
149. Bang C, Schmitz RA (Setembro de 2015). "Archaea associada a superfícies humanas: não deve ser subestimada".

- FEMS Microbiology Reviews. **39** (5): 631–48.  
doi:10.1093/femsre/fuv010. PMID 25907112.
150. Moissl-Eichinger C, Pausan M, Taffner J, Berg G, Bang C, Schmitz RA (Janeiro de 2018). "Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes". *Tendências em Microbiologia*. **26** (1): 70–85.  
doi:10.1016/j.tim.2017.07.004. PMID 28826642.
151. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "The origin and diversification of eukaryotes". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 402–419. ISBN 978-1464175121.
152. O'Malley, Maureen A.; Léger, Michelle M.; Wideman, Jeremy G.; Ruiz-Trillo, Iñaki (2019-02-18). "Concepts of the last eukaryotic common ancestor" (Conceitos do último antepassado comum eucariótico). *Ecologia da Natureza & Evolução*. Springer Science and Business Media LLC. **3** (3): 338-344.  
doi:10.1038/s41559-019-0796-3.  
hdl:10261/201794. ISSN 2397-334X. PMID 30778187.  
S2CID 67790751.
153. Taylor, F. J. R. 'M. (2003-11-01). "O colapso do sistema de dois militantes, a ascensão da protistologia e a fundação da Sociedade Internacional de Protistologia Evolutiva (ISEP)". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*". *Sociedade de Microbiologia*.

- 53 (6): 1707–1714. doi:10.1099/ijls.0.02587-0. ISSN 1466-5026. PMID 14657097.
154. Pitelka, D. R. (1963). *Electron-Microscopic Structure of Protozoa*. Pergamon Press, Oxford.
155. Berner, T. (1993). *Ultraestrutura de Microalgas*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 0849363233
156. ^ Beckett, A., Heath, I. B., e McLaughlin, D. J. (1974). *Um Atlas da Ultra-Estrutura Fúngica*. Longman, Green, New York.
157. Ragan M.A. & Chapman D.J. (1978). *Uma Filogenia Bioquímica dos Protistas*. Londres, Nova Iorque: Imprensa Académica. ISBN 0323155618
158. Lewin R. A. (1974). "Biochemical taxonomy", pp. 1-39 em *Algal Physiology and Biochemistry*, Stewart W. D. P. (ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. ISBN 0520024109
159. Oren, A., & Papke, R. T. (2010). *Filogenia molecular de microrganismos*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 1904455670
160. Horner, D. S., & Hirt, R. P. (2004). "An overview on eukaryote origins and evolution: the beauty of the cell and the fabulous gene phylogenies", pp. 1-26 em Hirt, R.P. & D.S. Horner. *Organelles, Genomes and Eukaryote*

- Phylogeny, An Evolutionary Synthesis in the Age of Genomics. Nova Iorque: CRC Press. ISBN 0203508939
161. RBG Kew (2016). O Relatório sobre o Estado das Plantas do Mundo - 2016. Royal Botanic Gardens, Kew. [https://stateoftheworldsplants.com/report/sotwp\\_2016.pdf](https://stateoftheworldsplants.com/report/sotwp_2016.pdf)  
Arquivado2016-09-28 na Wayback Machine
162. "A Lista de Plantas - Bryophytes".
163. Christenhusz, M. J. M. & Byng, J. W. (2016). "O número de espécies de plantas conhecidas no mundo e o seu aumento anual". *Phytotaxa*. **261** (3): 201–217. doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1.
164. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "A evolução das plantas". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 420–449. ISBN 978-1464175121.
165. "Gymnosperms on The Plant List". [Theplantlist.org](http://Theplantlist.org). Recuperado em 2013-07-24.
166. Hawksworth DL, Lücking R (Julho 2017). "Fungal Diversity Revisited: 2,2 a 3,8 Million Species" (Diversidade Fungal Revisitada: 2,2 a 3,8 Milhões de Espécies). *O Reino Fúngico. Microbiology Spectrum*. **5**. pp. 79-95. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016. ISBN 978-1-55581-957-6. PMID 28752818.

167. Cheek, Martin; Nic Lughadha, Eimear; Kirk, Paul; Lindon, Heather; Carretero, Julia; Looney, Brian; et al. (2020). "Novas descobertas científicas": Plantas e fungos". *Plantas, Pessoas, Planeta*. **2** (5): 371–388. doi:10.1002/ppp3.10148.
168. "Pare de negligenciar os fungos". *Microbiologia da Natureza*. **2** (8): 17120. 25 de Julho de 2017. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.120. PMID 28741610.
169. Feuda R, Dohrmann M, Pett W, Philippe H, Rota-Stabelli O, Lartillot N, et al. (Dezembro 2017). "Improved Modeling of Compositional Heterogeneity Supports Sponges as Sister to All Other Animals". *Biologia actual*. **27** (24): 3864–3870.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.11.008. PMID 29199080.
170. Pisani D, Pett W, Dohrmann M, Feuda R, Rota-Stabelli O, Philippe H, et al. (Dezembro de 2015). "Os dados genómicos não suportam geleias de pente como o grupo irmão para todos os outros animais". *Actas da Academia Nacional das Ciências dos Estados Unidos da América*. **112** (50): 15402–7. Bibcode:2015PNAS. 11215402P. doi:10.1073/pnas.1518127112. PMC 4687580. PMID 26621703.
171. Simion P, Philippe H, Baurain D, Jager M, Richter DJ, Di Franco A, et al. (Abril 2017). "A Large and Consistent

- Phylogenomic Dataset Supports Sponges as the Sister Group to All Other Animals" (PDF). *Biologia actual*. **27** (7): 958–967. doi:10.1016/j.cub.2017.02.031. PMID 28318975.
172. Giribet G (1 de Outubro de 2016). "Genómica e a árvore animal da vida: conflitos e perspectivas futuras". *Zoologica Scripta*. **45**: 14-21. doi:10.1111/zsc.12215. ISSN 1463-6409.
173. Laumer CE, Gruber-Vodicka H, Hadfield MG, Pearse VB, Riesgo A, Marioni JC, Giribet G (2017-10-11). "Placozoans são eumetazoans relacionados com Cnidaria". bioRxiv 10.1101/200972.
174. Maio, Robert M. (16 de Setembro de 1988). "Quantas Espécies Existem na Terra". *Ciência*. **241** (4872): 1441–1449. Bibcode:1988Sci...241.1441M. doi:10.1126/science.241.4872.1441. JSTOR 1702670. PMID 17790039. S2CID 34992724. Arquivado do original em 15 de Novembro de 2016. Recuperado a 17 de Junho de 2014.
175. Richards, O. W.; Davies, R.G. (1977). *Imms' General Textbook of Entomology: Volume 1: Estrutura, Fisiologia e Desenvolvimento Volume 2: Classificação e Biologia*. Berlim: Springer. ISBN 978-0-412-61390-6.
176. "Quadro 1a: Número de espécies avaliadas em relação ao número total de espécies descritas, e número de espécies

- ameaçadas pelos principais grupos de organismos". Lista Vermelha da IUCN. 18 de Julho de 2019.
177. Wu KJ (15 de Abril de 2020). "Há mais vírus do que estrelas no universo. Porque é que apenas alguns nos infectam? - Existem mais de um quadrilhão de vírus individuais na Terra, mas a maioria não está preparada para saltar para os humanos. Poderemos encontrar os que o são?". National Geographic Society. Recuperado a 18 de Maio2020.
178. Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV (Setembro de 2006). "O antigo Mundo dos Vírus e a evolução das células". *Biologia Directa*. **1** (1): 29. doi:10.1186/1745-6150-1-29. PMC 1594570. PMID 16984643.
179. Zimmer C (26 de Fevereiro de 2021). "A Vida Secreta de um Coronavírus - Uma bolha de genes oleosa de 100 nanómetros matou mais de dois milhões de pessoas e reformulou o mundo. Os cientistas não sabem bem o que fazer com ela". Recuperado a 28 de Fevereiro de 2021.
180. "Virus Taxonomy: 2019 Release". talk.ictvonline.org. Comité Internacional de Taxonomia de Vírus. Recuperado a 25 de Abril de 2020.
181. Lawrence CM, Menon S, Eilers BJ, Bothner B, Khayat R, Douglas T, Young MJ (Maio de 2009). "Estudos estruturais e funcionais de vírus arqueológicos". *The Journal*

- of Biological Chemistry. **284** (19): 12599–603. doi:10.1074/jbc.R800078200. PMC 2675988. PMID 19158076.
182. Edwards RA, Rohwer F (Junho de 2005). "Metagenómica viral". *Nature Reviews. Microbiologia*. **3** (6): 504–10. doi:10.1038/nrmicro1163. PMID 15886693. S2CID 8059643.
183. Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brüßow H (Agosto de 2003). "Phage as agents of lateral gene transfer". *Opinião actual em Microbiologia*. **6** (4): 417–24. doi:10.1016/S1369-5274(03)00086-9. PMID 12941415.
184. Rybicki EP (1990). "A classificação dos organismos no limiar da vida, ou problemas com a sistemática dos vírus". *South African Journal of Science*. **86**: 182–86.
185. Koonin EV, Starokadomskyy P (Outubro de 2016). "Os vírus estão vivos? O paradigma do replicador lança uma luz decisiva sobre uma questão antiga mas mal orientada". *Estudos de História e Filosofia das Ciências Biológicas e Biomédicas*. **59**: 125-34. doi:10.1016/j.shpsc.2016.02.016. PMC 5406846. PMID 26965225.
186. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "O corpo da planta". *Princípios de*

- Vida (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 521-536. ISBN 978-1464175121.
187. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Alimentação e transporte de plantas". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 537-554. ISBN 978-1464175121.
188. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Crescimento e desenvolvimento das plantas". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 555-572. ISBN 978-1464175121.
189. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Reprodução de plantas floríferas". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 573-588. ISBN 978-1464175121.
190. "Auto-Polinização e Polinização Cruzada | Biologia para Majors II". [courses.lumenlearning.com](https://courses.lumenlearning.com).
191. Harmer SL, Panda S, Kay SA (2001). "Bases moleculares de ritmos circadianos". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **17**: 215-53. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.215. PMID 11687489.
192. Strong, Donald R.; Ray, Thomas S. (1 de Janeiro de 1975). "Host Tree Location Behavior of a Tropical Vine (*Monstera gigantea*) by Skototropism". *Ciência*. **190** (4216): 804–806. Bibcode:1975Sci...190.. 804S.

- doi:10.1126/science.190.4216.804. JSTOR 1741614. S2CID 84386403.
193. Jaffe MJ, Forbes S (Fevereiro de 1993). "Thigmomorphogenesis: o efeito da perturbação mecânica nas plantas". *Regulação do crescimento das plantas*. **12** (3): 313–24. doi:10.1007/BF00027213. PMID 11541741. S2CID 29466083.
194. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Fundamentals of animal function" (Fundamentos da função animal). *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 605-623. ISBN 978-1464175121.
195. Rodolfo, Kelvin (Janeiro de 2000). "O que é homeostasia?". *Científico Americano*. Arquivado a partir do original em 2013-12-03.
196. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Água e equilíbrio salino". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 751-767. ISBN 978-1464175121.
197. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Nutrição, alimentação e digestão". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 624-642. ISBN 978-1464175121.

198. Campbell, Neil A. (1990). *Biologia* (2ª ed.). Redwood City, Califórnia: Benjamin/Cummings Pub. Co. pp. 834-835. ISBN 0-8053-1800-3.
199. Hsia, CC; Hyde, DM; Weibel, ER (15 de Março de 2016). "A estrutura pulmonar e os desafios intrínsecos da troca de gás". *Fisiologia Abrangente*. **6** (2): 827–95. doi:10.1002/cphy.c150028. PMC 5026132. PMID 27065169.
200. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Circulação". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 661-680. ISBN 978-1464175121.
201. "sistema cardiovascular" no *Dorland's Medical Dictionary*
202. "Como funciona o sistema circulatório sanguíneo?". *PubMed Saúde*. 1 de Agosto de 2016.
203. Pawlina, Wojciech; Ross, Michael H. (2011). *Histologia : um texto e atlas : com a biologia celular e molecular correlacionada* (6ª ed.). Filadélfia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. ISBN 9780781772006. OCLC 548651322.
204. Standring, Susan (2016). *Gray's anatomy : a base anatómica da prática clínica* (Quadragésima primeira ed.). Filadélfia. ISBN 9780702052309. OCLC 920806541.

205. Hillis, David M.; Sadava, David E.; Price, Mary V. (2014). "Músculo e movimento". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 681-698. ISBN 978-1-464-10947-8.
206. Gardner, C.R. (1976). "The neuronal control of locomotion in the earthworm" (O controlo neuronal da locomoção na minhoca). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. **51** (1): 25-52. doi:10.1111/j.1469-185X.1976.tb01119.x. PMID 766843. S2CID 9983649.
207. Alexander, R. McNeill (2003). "Músculo, o motor". *Principles of Animal Locomotion* (2ª ed.). Princeton, N.J.: Princeton University Press. pp. 15-37. ISBN 978-0-691-12634-0.
208. Josephson, R. K.; Malamud, J. G.; Stokes, D. R. (2000-09-15). "Asynchronous muscle: a primer". *Journal of Experimental Biology*. **203**(18): 2713-2722. doi:10.1242/jeb.203.18.2713. ISSN 0022-0949. PMID 10952872.
209. Lee WC, Huang H, Feng G, Sanes JR, Brown EN, So PT, Nedivi E (Fevereiro de 2006). "Dynamic remodeling of dendritic arbors in GABAergic interneurons of adult visual cortex". *PLOS Biologia*. **4** (2): e29.

- doi:10.1371/journal.pbio.0040029. PMC 1318477. PMID 16366735.
210. "Sistema Nervoso". Enciclopédia Columbia. Imprensa da Universidade de Columbia.
211. Aidley, David J. (1998). "Introdução". *The Physiology of Excitable Cells* (4ª ed.). Nova Iorque: Cambridge University Press. pp. 1-7. ISBN 978-0521574211.
212. Aidley, David J. (1998). "A base iónica da condução nervosa". *The Physiology of Excitable Cells* (4ª ed.). Nova Iorque: Cambridge University Press. pp. 54-75. ISBN 978-0521574211.
213. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Neurónios, órgãos dos sentidos, e sistemas nervosos". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 699-732. ISBN 978-1464175121.
214. Freeman, Scott; Quillin, Kim; Allison, Lizabeth; Black, Michael; Podgorski, Greg; Taylor, Emily; Carmichael, Jeff (2017). "Sistemas sensoriais animais". *Ciência Biológica* (6ª ed.). Hoboken, N.J.: Pearson. pp. 922-941. ISBN 978-0321976499.
215. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Controlo pelo sistema endócrino e

- nervoso". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 733-750. ISBN 978-1464175121.
216. Shuster M (2014-03-14). *Biologia para um mundo em mudança, com fisiologia*(Segunda ed.). Nova Iorque, NY. ISBN 9781464151132. OCLC 884499940.
217. Marieb E (2014). *Anatomia e fisiologia*. Glenview, IL: Pearson Education, Inc. ISBN 978-0-321-86158-0.
218. Knobil, Ernst (1998). *Enciclopédia de reprodução, Volume 1*. Imprensa académica. p. 315. ISBN 978-0-12-227020-8.
219. Schwartz, Jill (2010). *Dominar o GED 2011*. Peterson's. p. 371. ISBN 978-0-7689-2885-3.
220. Hamilton, Matthew B. (2009). *Genética da população*. Wiley-Blackwell. p. 55. ISBN 978-1-4051-3277-0.
221. Ville, Claude Alvin; Walker, Warren Franklin; Barnes, Robert D. (1984). *Zoologia geral*. Saunders College Pub. p. 467. ISBN 978-0-03-062451-3.
222. Hamilton, William James; Boyd, James Dixon; Mossman, Harland Winfield (1945). *Embriologia humana: (desenvolvimento pré-natal da forma e função)*. Williams & Wilkins. p. 330.
223. Philips, Joy B. (1975). *Development of vertebrate anatomy*. Mosby. p. 176. ISBN 978-0-8016-3927-2.

224. The Encyclopedia Americana: uma biblioteca do conhecimento universal, Volume 10. Encyclopedia Americana Corp. 1918. p. 281.
225. Romoser, William S.; Stoffolano, J. G. (1998). A ciência da entomologia. WCB McGraw-Hill. p. 156. ISBN 978-0-697-22848-2.
226. Adiyodi, K.G.; Hughes, Roger N.; Adiyodi, Rita G. (Julho de 2002). Reproductive Biology of Invertebrates, Volume 11, Progress in Asexual Reproduction. Wiley. p. 116. ISBN 978-0-471-48968-9.
227. Schatz, Phil. "Concepts of Biology | How Animals Reproduce". OpenStax College. Arquivado a partir do original em 6 de Março de 2018. Recuperado a 5 de Março de 2018.
228. Jungnickel MK, Sutton KA, Florman HM (Agosto de 2003). "No início: lições de fertilização em ratos e minhocas". *Célula*. **114** (4): 401–4. doi:10.1016/s0092-8674(03)00648-2. PMID 12941269.
229. Gilbert, S. F.; Barresi, M. J. F. (2017-05-01). "Developmental Biology, 11Th Edition 2016". *American Journal of Medical Genetics, Parte A*. **173** (5): 1430. doi:10.1002/ajmg.a.38166. ISSN 1552-4833.
230. Edlund, Helena (Julho de 2002). "Organogenesis": Organogênese pancreática - mecanismos de

- desenvolvimento e implicações para a terapia". *Nature Reviews Genetics*. **3** (7): 524-532. doi:10.1038/nrg841. ISSN 1471-0064. PMID 12094230. S2CID 2436869.
231. Rankin, Scott (2018). "O timing é tudo: A sinalização Reiterativa Wnt, BMP e RA regulam a competência de desenvolvimento durante a organogénese endodérmica". *Biologia do desenvolvimento*. **434** (1): 121–132. doi:10.1016/j.ydbio.2017.11.018. PMC 5785443. PMID 29217200 - via NCBI.
232. Ader, Marius; Tanaka, Elly M (2014). "Modelar o desenvolvimento humano na cultura 3D". *Opinião actual em Biologia Celular*. **31**: 23-28. doi:10.1016/j.ceb.2014.06.013. PMID 25033469.
233. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Comportamento animal". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 827-844. ISBN 978-1464175121.
234. Páez-Rondón, Oscar; Aldana, Elis; Dickens, Joseph; Otálora-Luna, Fernando (Maio de 2018). "Descrição etológica de um padrão de acção fixo num insecto beijador (Triatominae): visão, gustação, extensão de probóscide e consumo de água e goiaba". *Diário de Etologia*. **36** (2): 107–116. doi:10.1007/s10164-018-0547-y. ISSN 0289-0771.

235. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Comportamento animal". *Campbell Biology* (11<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 1137-1161. ISBN 978-0134093413.
236. Begon, M; Townsend, CR; Harper, JL (2006). *Ecologia: Dos indivíduos aos ecossistemas* (4<sup>a</sup> ed.). Blackwell. ISBN 978-1-4051-1117-1.
237. *Habitats do mundo*. Nova Iorque: Marshall Cavendish. 2004. p. 238. ISBN 978-0-7614-7523-1.
238. Tansley (1934); Molles (1999), p. 482; Chapin et al. (2002), p. 380; Schulze et al. (2005); p. 400; Gurevitch et al. (2006), p. 522; Smith & Smith 2012, p. G-5
239. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "The distribution of Earth's ecological systems". *Princípios da Vida* (2<sup>a</sup> ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 845-863. ISBN 978-1464175121.
240. Odum, Eugene P (1971). *Fundamentos da Ecologia* (terceira ed.). Nova Iorque: Saunders. ISBN 978-0-534-42066-6.
241. Chapin III, F. Stuart; Matson, Pamela A.; Mooney, Harold A. (2002). "O conceito de ecossistema". *Princípios da Ecologia do Ecossistema Terrestre*. Nova Iorque: Springer. p. 10. ISBN 978-0-387-95443-1.

242. Planton, Serge (França; editor) (2013). "Anexo III. Glossário: IPCC - Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas" (PDF). Quinto Relatório de Avaliação do IPCC. p. 1450. Arquivado a partir do original (PDF) em 2016-05-24. Recuperado a 25 de Julho de 2016.
243. Shepherd, Dr. J. Marshall; Shindell, Drew; O'Carroll, Cynthia M. (1 de Fevereiro de 2005). "Qual é a diferença entre o tempo e o clima?". NASA. Recuperado em 13 de Novembro de 2015.
244. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Populações". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 864-897. ISBN 978-1464175121.
245. Urry, Lisa; Cain, Michael; Wasserman, Steven; Minorsky, Peter; Reece, Jane (2017). "Ecologia da população". *Biologia de Campbell* (11ª ed.). Nova Iorque: Pearson. pp. 1188-1211. ISBN 978-0134093413.
246. "População". *Biologia Online*. Recuperado em 5 de Dezembro de 2012.
247. "Definição de população (biologia)". *Dicionários de Oxford*. Imprensa da Universidade de Oxford. Recuperado a 5 de Dezembro de 2012. uma comunidade de animais, plantas, ou seres humanos entre cujos membros ocorre a reprodução cruzada

248. Hartl, Daniel (2007). Principles of Population Genetics. Sinauer Associates. p. 45. ISBN 978-0-87893-308-2.
249. Chapman, Eric J.; Byron, Carrie J. (2018-01-01). "A aplicação flexível da capacidade de carga em ecologia". *Ecologia Global e Conservação*. **13**: e00365. doi:10.1016/j.gecco.2017.e00365. ISSN:2351-9894.
250. Odum, E. P.; Barrett, G. W. (2005). Fundamentals of Ecology (5<sup>a</sup> ed.). Brooks/Cole, uma parte de Cengage Learning. ISBN 978-0-534-42066-6. Arquivado a partir do original em 2011-08-20.
251. Wootton, JT; Emmerson, M (2005). "Measurement of Interaction Strength in Nature". *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **36**: 419-44. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175535. JSTOR 30033811.
252. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Consequências ecológicas e evolutivas dentro e entre espécies". *Princípios de Vida* (2<sup>a</sup> ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 882-897. ISBN 978-1464175121.
253. Smith, AL (1997). Dicionário Oxford de bioquímica e biologia molecular. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. p. 508. ISBN 978-0-19-854768-6.

Fotossíntese - a síntese por organismos de compostos químicos orgânicos, esp. hidratos de carbono, a partir de dióxido de carbono utilizando energia obtida a partir da luz em vez da oxidação de compostos químicos.

254. Edwards, Katrina. "Microbiologia de um Lago de Sedimentos e do Subjacente Jovem, Frio, Hydrologically Active Ridge Flank". Instituto Oceanográfico Woods Hole Oceanográfico.
255. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "Comunidades ecológicas". *Princípios de Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 898-915. ISBN 978-1464175121.
256. Riebeek, Holli (16 de Junho de 2011). "O Ciclo do Carbono". Observatório da Terra. NASA. Arquivado a partir do original a 5 de Março de 2016. Recuperado a 5 de Abril de 2018.
257. Hillis, David M.; Sadava, David; Hill, Richard W.; Price, Mary V. (2014). "The distribution of Earth's ecological systems". *Princípios da Vida* (2ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp. 916-934. ISBN 978-1464175121.
258. IPCC AR5 WG1 Summary for Policymakers 2013, p. 4: O aquecimento do sistema climático é inequívoco, e desde os anos 50 muitas das mudanças observadas são sem precedentes ao longo de décadas a milénios. A atmosfera e o

oceano aqueceram, as quantidades de neve e gelo diminuíram, o nível do mar subiu, e as concentrações de gases com efeito de estufa aumentaram; IPCC SR15 Ch1 2018, p. 54: Abundantes provas empíricas da taxa sem precedentes e da escala global do impacto da influência humana no Sistema Terra (Steffen et al., 2016; Waters et al., 2016) levaram muitos cientistas a apelar ao reconhecimento de que a Terra entrou numa nova época geológica: o Antropoceno.

259. EPA 2020: Dióxido de carbono (76%), Metano (16%), Óxido Nitroso (6%).

260. EPA 2020: O dióxido de carbono entra na atmosfera através da queima de combustíveis fósseis (carvão, gás natural e petróleo), resíduos sólidos, árvores e outros materiais biológicos, e também como resultado de certas reacções químicas (por exemplo, o fabrico de cimento). O uso de combustíveis fósseis é a fonte primária de CO<sub>2</sub>.

O CO<sub>2</sub> também pode ser emitido a partir de impactos directos induzidos pelo homem sobre a silvicultura e outros usos do solo, tais como através da desflorestação, da limpeza de terrenos para a agricultura, e da degradação dos solos. O metano é emitido durante a produção e transporte de carvão, gás natural, e petróleo. As emissões de metano também resultam da pecuária e outras práticas agrícolas e da

decomposição dos resíduos orgânicos nos aterros de resíduos sólidos urbanos.

261. Sahney, S.; Benton, M. J (2008). "Recuperação da mais profunda extinção em massa de todos os tempos". *Actas da Sociedade Real B: Ciências Biológicas*. **275** (1636): 759–65. doi:10.1098/rspb.2007.1370. PMC 2596898. PMID 18198148.
262. Soulé, Michael E.; Wilcox, Bruce A. (1980). *Biologia da conservação: uma perspectiva evolutiva-ecológica*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-800-1.
263. Soulé, Michael E. (1986). "O que é a Biologia da Conservação"? (PDF). *Biociência*. Instituto Americano de Ciências Biológicas. **35** (11): 727-34. doi:10.2307/1310054. JSTOR 1310054.
264. Hunter, Malcolm L. (1996). *Fundamentos da biologia da conservação*. Oxford: Blackwell Science. ISBN 978-0-86542-371-8.
265. Meffe, Gary K.; Martha J. Groom (2006). *Princípios da biologia da conservação* (3ª ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-518-5.
266. Van Dyke, Fred (2008). *Biologia da conservação: fundações, conceitos, aplicações* (2ª ed.). Nova Iorque:

- Springer-Verlag. doi:10.1007/978-1-4020-6891-1. ISBN 9781402068904. OCLC 232001738.
267. Sahney, S.; Benton, M. J.; Ferry, P. A. (2010). "Ligações entre a diversidade taxonómica global, a diversidade ecológica e a expansão dos vertebrados em terra". *Cartas de biologia*. **6** (4): 544–7. doi:10.1098/rsbl.2009.1024. PMC 2936204. PMID 20106856.
268. Koh, Lian Pin; Dunn, Robert R.; Sodhi, Navjot S.; Colwell, Robert K.; Proctor, Heather C.; Smith, Vincent S. (2004). "Species coextinctions and the biodiversity crisis". *Ciência*. **305** (5690): 1632–4. Bibcode:2004Sci...305.1632K. doi:10.1126/science.1101101. PMID 15361627. S2CID 30713492.
269. Avaliação do Ecosistema do Milénio (2005). *Ecosistemas e Bem-estar Humano: Síntese da Biodiversidade*. World Resources Institute, Washington, D.C. [1].
270. Jackson, J. B. C. (2008). "Extinção ecológica e evolução no corajoso novo oceano". *Actas da Academia Nacional de Ciências*. **105** (Suppl 1): 11458–65. Bibcode:2008PNAS. 10511458J. doi:10.1073/pnas.0802812105. PMC 2556419. PMID 18695220.

271. Soule, Michael E. (1986). *Biologia da Conservação: The Science of Scarcity and Diversity (A Ciência da Escassez e Diversidade)*. Sinauer Associates. p. 584. ISBN 978-0-87893-795-0.
272. Gabe Buckley. (2020). *Célula eucariótica*. Revisado por: Editores BD. Atualizado em: BD: 6 de Novembro de 2020. *Dicionário de biologia*
273. Goodsell, D. S. *Escherichia coli*. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **37**, 325-332 (2009).
274. Pilhofer, M., Ladinsky, M. S., McDowall, A. W. & Jensen, G. J. Bacterial TEM: novos conhecimentos da criomicroscopia. *Methods Cell Biol.* **96**, 21-45 (2010).
275. Pilhofer, M. et al. Arquitetura e interface anfitriã de clamídiae ambiental revelada pela criotomografia electrónica. *Ambiente. Microbiol.* **16**, 417–429 (2014).
276. An, L. & Jensen, G. J. Tomografia electrónica de células. *Q. Rev. Biófilas.* **45**, 27–56 (2012).
277. Beeby, M., Gumbart, J. C., Roux, B. & Jensen, G. J. Arquitetura e montagem da parede celular Gram-positiva. *Mol. Microbiol.* **88**, 664–672 (2013).
278. Tocheva, E. I. et al. Peptidoglycan transformations during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol. Microbiol.* **88**, 673–686 (2013).

279. Howland, John L. (2000). *The Surprising Archaea: Discovering Another Domain of Life (A Archaea Surpreendente: Descobrindo Outro Domínio da Vida)*. Oxford: Oxford University Press. pp. 69-71. ISBN 0-19-511183-4.
280. C.Michael Hogan 2010. Factor abiótico. *Encyclopedia of Earth*. eds Emily Monosson e C. Cleveland. Conselho Nacional para a Ciência e o Ambiente. Washington DC
281. van Heijenoort J (2001). "Formação das cadeias de glicanos na síntese do peptidoglycan bacteriano". *Glicobiologia*. **11** (3): 25R–36R. doi:10.1093/glycob/11.3.25R. PMID 11320055.
282. Koch A (2003). "Muro bacteriano como alvo de ataque: investigação passada, presente, e futura". *Clin Microbiol Rev.* **16** (4): 673–87. doi:10.1128/CMR.16.4.673-687.2003. PMC 207114. PMID 14557293.
283. Cantwell H, Enfermeira P (2019). "Unravelling nuclear size control". *Genética actual*. Springer. **65** (6): 1282. doi:10.1007/s00294-019-00999-3. PMC 6820586. PMID 31147736.
284. Lodish HF, Berk A, Kaiser C, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al. (2016). *Biologia Celular Molecular (Oitava*

- ed.). Nova Iorque: W.H. Freeman. ISBN 978-1-4641-8339-3.
285. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Biologia Molecular da célula* (4ª ed.). Nova Iorque: Garland Science. p. 197. ISBN 978-0-8153-4072-0.
286. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6 ed.). Nova Iorque: Garland Science.
287. Rhoades R, Pflanzer R, eds. (1996). "Ch3". *Human Physiology* (3ª ed.). Saunders College Publishing.
288. Shulga N, Mosammaparast N, Wozniak R, Goldfarb DS (Maio de 2000). "Nucleoporinas de levedura envolvidas na permeabilidade passiva do envelope nuclear". *Primária. The Journal of Cell Biology*. **149** (5): 1027–38. doi:10.1083/jcb.149.5.1027. PMC 2174828. PMID 10831607.
289. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J (2004). *Molecular Cell Biology* (5ª ed.). Nova Iorque: WH Freeman. ISBN 978-0-7167-2672-2.
290. Pemberton LF, Paschal BM (Março de 2005). "Mecanismos de importação e exportação nuclear mediada por receptores". *Revisão. Tráfico*. **6** (3): 187-98.

doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00270.x. PMID 15702987.  
S2CID 172279.

291. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, eds. (2002). "Capítulo 4: ADN e Cromossomas". *Biologia Molecular da Célula* (4ª ed.). Nova Iorque: Garland Science. pp. 191-234. ISBN 978-0-8153-4072-0.
292. Stuurman N, Heins S, Aebi U (1998). "Lâminas nucleares: sua estrutura, montagem, e interações". Revisão. *Journal of Structural Biology*. **122** (1–2): 42–66. doi:10.1006/jsbi.1998.3987. PMID 9724605.
293. Goldman AE, Moir RD, Montag-Lowy M, Stewart M, Goldman RD (Novembro de 1992). "Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope". *Primária. The Journal of Cell Biology*. **119** (4): 72535. doi:10.1083/jcb.119.4.725. PMC 2289687. PMID 1429833.
294. Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK, Spann TP (Março de 2002). "Lâminas nucleares: blocos de construção de arquitectura nuclear". Revisão. *Genes & Development*. **16** (5): 533–47. doi:10.1101/gad.960502. PMID 11877373.
295. Broers JL, Ramaekers FC (2004). "Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly" (Dinâmica da montagem e desmontagem de lâminas nucleares). Revisão.

- Symposia of the Society for Experimental Biology (56): 177–92. ISBN 9781134279838. PMID 15565881.
296. Moir RD, Yoon M, Khuon S, Goldman RD (Dezembro de 2000). "Lâminas nucleares A e B1: diferentes vias de montagem durante a formação do invólucro nuclear em células vivas". Primárias. *The Journal of Cell Biology*. **151** (6): 1155–68. doi:10.1083/jcb.151.6.1155. PMC 2190592. PMID 11121432.
297. Spann TP, Goldman AE, Wang C, Huang S, Goldman RD (Fevereiro de 2002). "Alteração da organização da lamina nuclear inibe a transcrição dependente do RNA polimerase II". Primária. *The Journal of Cell Biology*. **156** (4): 603–8. doi:10.1083/jcb.200112047. PMC 2174089. PMID 11854306.
298. Mounkes LC, Stewart CL (Junho de 2004). "Envelhecimento e organização nuclear: lamina e progeria". Revisão. *Opinião actual em Biologia Celular*. **16** (3): 322–7. doi:10.1016/j.ceb.2004.03.009. PMID 15145358.
299. Ehrenhofer-Murray AE (Junho de 2004). "Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair". Revisão. *Revista Europeia de Bioquímica*. **271** (12): 2335–49. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04162.x. PMID 1518232349.

300. Grigoryev SA, Bulynko YA, Popova EY (2006). "O fim ajusta os meios: remodelação da heterocromatina durante a diferenciação das células terminais". Revisão. *Investigação cromossômica*. **14** (1): 53–69. doi:10.1007/s10577-005-1021-6. PMID 16506096. S2CID 6040822.
301. Schardin M, Cremer T, Hager HD, Lang M (Dezembro de 1985). "Coloração específica de cromossomas humanos em linhas de células híbridas de hamster x homem chinês demonstra territórios de cromossomas interfásicos" (PDF). *Primário. Genética Humana*. **71** (4): 281-7. doi:10.1007/BF00388452. PMID 2416668. S2CID 9261461.
302. Lamond AI, Earnshaw WC (Abril de 1998). "Estrutura e função no núcleo" (PDF). Revisão. *Ciência*. **280** (5363): 54753. CiteSeerX 10.1.1.323.5543. doi:10.1126/science.280.5363.547. PMID 9554838.
303. Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, et al. (Dezembro de 1996). "Os genes activos e inactivos localizam-se preferencialmente na periferia dos territórios cromossómicos". *Primário. The Journal of Cell Biology*. **135** (5): 1195205. doi:10.1083/jcb.135.5.1195. PMC 2121085. PMID 8947544. Arquivado do original em 29 de Setembro de 2007.
304. Rothfield NF, Stollar BD (Novembro de 1967). "The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear

- anti-nuclearbody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus". *Primário. The Journal of Clinical Investigation*. **46** (11): 1785-94. doi:10.1172/JCI105669. PMC 292929. PMID 4168731.
305. Barned S, Goodman AD, Mattson DH (Fevereiro de 1995). "Frequency of anti-nuclear antibodies in multiple sclerosis". *Primária. Neurologia*. **45** (2): 384-5. doi:10.1212/WNL.45.2.384. PMID 7854544. S2CID 30482028.
306. Hernandez-Verdun D (Janeiro de 2006). "Nucleolus: da estrutura à dinâmica". *Revisão. Histoquímica e Biologia Celular*. **125** (1-2): 127-37. doi:10.1007/s00418-005-0046-4. PMID 16328431. S2CID 20769260.
307. Lamond AI, Sleeman JE (Outubro de 2003). "Sub-estrutura e dinâmica nuclear". *Revisão. Biologia actual*. **13**(21): R8258. doi:10.1016/j.cub.2003.10.012. PMID 14588256. S2CID 16865665.
308. Cioce M, Lamond AI (2005). "Cajal bodies: a long history of discovery". *Revisão. Revisão Anual da Biologia Celular e do Desenvolvimento*. **21**: 105-31. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103738. PMID 16212489. S2CID 8807316.

309. Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castaño JG, Bohmann D, et al. (Agosto de 2002). "Clastosoma: um subtipo de corpo nuclear enriquecido em proteasomas 19S e 20S, ubiquitina, e substratos proteicos de proteasoma". *Primário. Biologia Molecular da Célula*. **13** (8): 2771–82. CiteSeerX 10.1.1.321.6138. doi:10.1091/mbc.e02-03 0122. PMC 117941. PMID 12181345.
310. Pollard TD, Earnshaw WC (2004). *Biologia Celular*. Filadélfia: Saunders. ISBN 978-0-7216-3360-2.
311. Dundr M, Misteli T (Junho de 2001). "Functional architecture in the cell nucleus" (Arquitetura funcional no núcleo celular). Revisão. *A Revista Bioquímica*. **356**(Pt 2): 297–310. doi:10.1042/0264-6021:3560297. PMC 1221839. PMID 11368755.
312. Bond CS, Fox AH (Setembro de 2009). "Paraspeckles: corpos nucleares construídos sobre RNA longo não codificado". Revisão. *The Journal of Cell Biology*. **186** (5): 637–44. doi:10.1083/jcb.200906113. PMC 2742191. PMID 19720872.
313. Goebel HH, Warlo I (Janeiro de 1997). "Nemaline myopathy with intranuclear rods--intranuclear rod myopathy". Revisão. *Distúrbios neuromusculares*. **7** (1): 13–9. doi:10.1016/S0960-8966(96)00404-X. PMID 9132135. S2CID 29584217.

314. Matera AG, Frey MR (Agosto de 1998). "Corpos enrolados e pedras preciosas": Janus ou gémeos?". Revisão. *American Journal of Human Genetics*. **63** (2): 317-21. doi:10.1086/301992. PMC 1377332. PMID 9683623.
315. Matera AG (Agosto de 1998). "De corpos enrolados, pedras preciosas, e salmão". Revisão. *Journal of Cellular Biochemistry*. **70** (2): 181–92. doi:10.1002/(sici)1097-4644(19980801)70:2< 181::aid-jcb4>3.0.co;2-k. PMID 9671224.
316. Navascues J, Berciano MT, Tucker KE, Lafarga M, Matera AG (Junho de 2004). "Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis". *Primária. Cromossoma*. **112** (8): 398–409. doi:10.1007/s00412-004-0285-5. PMC 1592132. PMID 15164213.
317. Saunders WS, Cooke CA, Earnshaw WC (Novembro de 1991). "Compartimentação dentro do núcleo: descoberta de uma nova região subnuclear". *Primária. The Journal of Cell Biology*. **115**(4): 919–31. doi:10.1083/jcb.115.4.919. PMC 2289954. PMID 1955462.
318. Pombo A, Cuello P, Schul W, Yoon JB, Roeder RG, Cook PR, Murphy S (Março de 1998). "Especialização regional e temporal no núcleo: um domínio nuclear transcriptionally-active rico em PTF, Oct1 e antigénios PIKA associados a cromossomas específicos no início do ciclo

- celular". Primário. O Jornal EMBO. **17** (6): 1768–78. doi:10.1093/emboj/17.6.1768. PMC 1170524. PMID 9501098.
319. Zimmer A, Nguyen QD, Gespach C (Outubro de 2004). "Corpos e compartimentos nucleares: papéis funcionais e de sinalização celular na saúde e na doença". Revisão. *Sinalização Celular*. **16** (10): 1085–104. doi:10.1016/j.cellsig.2004.03.020. PMID 15240004.
320. Lallemand-Breitenbach V, de Thé H (Maio de 2010). "Corpos nucleares PML". Revisão. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (Perspectivas do Porto da Primavera Fria em Biologia)*. **2** (5): a000661. doi:10.1101/cshperspect.a000661. PMC 2857171. PMID 20452955.
321. Spector DL, Lamond AI (Fevereiro de 2011). "Pintas nucleares". Revisão. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (Perspectivas do Porto da Primavera Fria em Biologia)*. **3** (2): a000646. doi:10.1101/cshperspect.a000646. PMC 3039535. PMID 20926517.
322. Páginas de Biologia da Kimball Arquivadas 2009-01-25 na Wayback Machine, Cell Membranes
323. Singleton P (1999). *Bacteria em Biologia, Biotecnologia e Medicina*(5ª ed.). Nova Iorque: Wiley. ISBN 978-0-471-98880-9.

324. Tom Herrmann<sup>1</sup>; Sandeep Sharma<sup>2</sup>. (2 de Março, 2019). "Physiology, Membrane". StatPearls. 1 Escola de Medicina da SIU 2 Centro Médico Regional Baptista. PMID 30855799
325. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque: Garland Science. ISBN 978-0-8153-3218-3. Arquivado a partir do original em 2017-12-20.
326. Budin I, Devaraj NK (Janeiro de 2012). "Montagem por membranas impulsionada por uma reacção de acoplamento biomimética". *Journal of the American Chemical Society*. **134** (2): 751-3. doi:10.1021/ja2076873. PMC 3262119. PMID 22239722.
327. Pessoal (25 de Janeiro de 2012). "Chemists Synthesize Artificial Cell Membrane". ScienceDaily. Arquivado do original em 29 de Janeiro de 2012. Recuperado a 18 de Fevereiro de 2012.
328. Pessoal (26 de Janeiro de 2012). "Químicos criam membrana celular artificial". kurzweilai.net. Arquivado do original em 26 de Fevereiro de 2012. Recuperado a 18 de Fevereiro de 2012.
329. Zeidi, Mahdi; Kim, Chun IL (2018). "The effects of intra-membrane viscosity on lipid membrane morphology: complete analytical solution" (Os efeitos da viscosidade

- intra-membrana na morfologia da membrana lipídica: solução analítica completa). *Relatórios científicos*. **8** (1): 12845. doi:10.1038/s41598-018-31251-6. ISSN 2045-2322.
330. Lombard J (Dezembro de 2014). "Era uma vez as membranas celulares: 175 anos de investigação dos limites celulares". *Biologia Directa*. **9**: 32. doi:10.1186/s13062-014-0032-7. PMC 4304622. PMID 25522740.
331. Leray, C. História cronológica do centro lipídico. Centro Ciberlipídico. Última actualização a 11 de Novembro de 2017. link Arquivado 2017-10-13 na Wayback Machine.
332. Gorter E, Grendel F (Março de 1925). "On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood". *The Journal of Experimental Medicine*. **41** (4): 439–43. doi:10.1084/jem.41.4.439. PMC 2130960. PMID 19868999.
333. S J Singer e G L Nicolson. "O modelo de mosaico fluido da estrutura das membranas celulares". *A ciência*. (1972) 175. 720-731.
334. de Vries H (1885). "Plasmolytische Studien über die Wand der Vakuolen". *Jahrb. Wiss. Bot.* **16**: 465–598.
335. Pfeffer, W. 1877. *Osmotische Untersuchungen: Studien zur Zell Mechanik*. Engelmann, Leipzig.
336. Pfeffer, W., 1900-1906. *The Physiology of Plants*, [1] Archived 2018-06-02 at the Wayback Machine. Traduzido

- por A. J. Ewart da 2ª edição alemã da Pflanzenphysiologie, 1897-1904, [2] Arquivado 2018-06-01 na Máquina de Wayback. Clarendon Press, Oxford.
337. Sharp, L. W. (1921). Introdução à Citologia. Nova Iorque: McGraw Hill, p. 42.
338. Kleinzeller, A. 1999. O conceito de uma membrana celular de Charles Ernest Overton. In: Permeabilidade da membrana: 100 anos desde Ernest Overton (ed. Deamer D.W., Kleinzeller A., Fambrough D.M.), pp. 1-18, Academic Press, San Diego.
339. Mast SO (1924). "Estrutura e locomoção em Amoeba proteus". Anat. Rec. **29** (2): 88. doi:10.1002/ar.1090290205.
340. Plowe JQ (1931). "Membranas na célula da planta". I. Membranas morfológicas em superfícies protoplasmáticas". Protoplasma. **12**: 196-220. doi:10.1007/BF01618716.
341. Wayne R (2009). Biologia das Células Vegetais: Da Astronomia à Zoologia. Amesterdão: Elsevier/Academic Press. p. 17. ISBN 9780080921273.
342. Noutsi P, Gratton E, Chaieb S (2016-06-30). "Avaliação das Flutuações da Fluidez da Membrana durante o Desenvolvimento Celular Revela o Tempo e a Especificidade do Tipo de Célula". PLOS UM. **11** (6):0158313. Bibcode:2016PLoSO.. 1158313N.

- doi:10.1371/journal.pone.0158313. PMC 4928918. PMID 27362860.
343. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, et al. (2000). "Biomembranas": Organização Estrutural e Funções Básicas". *Biologia Celular Molecular* (4ª ed.). Nova Iorque: Scientific American Books. ISBN 978-0-7167-3136-8.
344. Cooper GM (2000). "Estrutura da Membrana de Plasma". *A Célula: Uma Abordagem Molecular* (2ª ed.). Arquivada a partir do original em 2017-09-19. 345. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). "Biomembranas": Organização Estrutural e Funções Básicas". *Biologia Celular Molecular* (4ª ed.). Arquivado a partir do original em 2018-06-05.
345. Brandley BK, Schnaar RL (Julho de 1986). "Carbohidratos de superfície celular no reconhecimento e resposta celular". *Journal of Leukocyte Biology*. **40** (1): 97–111. doi:10.1002/jlb.40.1.97. PMID 3011937.
346. Jesse Gray; Shana Groeschler; Tony Le; Zara Gonzalez (2002). "Membrane Structure" (SWF). Davidson College. Arquivado a partir do original em 2007-01-08. Recuperado em 2007-01-11.
347. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). "Post-Translational

- Modifications and Quality Control in the Rough ER".  
Biologia Celular Molecular (4<sup>a</sup> ed.).
348. Cooper, Geoffrey M. (2000). "Transporte de pequenas moléculas". *The Cell: A Molecular Approach* (2<sup>a</sup> ed.). Arquivado a partir do original em 2018-06-05.
349. Kramer EM, Myers DR (Abril de 2013). "A osmose não é impulsionada pela diluição da água". *Tendências em Ciência Vegetal*. **18** (4): 195–7. doi:10.1016/j.tplants.2012.12.001. PMID 23298880.
350. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "Proteínas de Membranas". *Molecular Biology of the Cell* (4<sup>a</sup> ed.). Arquivado a partir do original em 2018-06-05.
351. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "Transporte para a Célula a partir da Membrana de Plasma": Endocitose". *Biologia Molecular da Célula* (4<sup>a</sup> ed.). Garland Science. Arquivado a partir do original em 2018-06-05.
352. Salton MR, Kim K (1996). Barão S (ed.). *Medical Microbiology* (ed. 4<sup>a</sup> ed.). Galveston (TX): Ramo Médico da Universidade do Texas em Galveston. ISBN 978-0963117212. PMID 21413343.

353. Mishra NN, Liu GY, Yeaman MR, Nast CC, Proctor RA, McKinnell J, Bayer AS (Fevereiro de 2011). "Alteração da fluidez da membrana celular relacionada com carotenóides tem impacto na susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* aos peptídeos de defesa hospedeiro". *Agentes antimicrobianos e quimioterapia*. **55** (2): 526–31. doi:10.1128/AAC.00680-10. PMC 3028772. PMID 21115796.
354. Alexander C, Rietschel ET (2001). "Lipopolissacarídeos bacterianos e imunidade inata". *Journal of Endotoxin Research*. **7** (3): 167–202. doi:10.1177/09680519010070030101. PMID 11581570.
355. YashRoy RC (1999). "A structural model for virulence organellae of gram negative organisms with reference to *Salmonella* pathogenicity in chicken ileum". *Jornal Indiano de Ciência Avícola*. **34** (2): 213–219. Arquivado a partir do original em 2014-11-07.
356. Saier MH (2013). "Microcompartimentos e máquinas de proteínas em procaríotas". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **23** (4–5): 243-69. doi:10.1159/000351625. PMC 3832201. PMID 23920489
- Singer SJ, Nicolson GL (Fevereiro 1972). "O modelo fluído do mosaico da estrutura das membranas celulares". A

- ciência. **175** (4023): 720–31. Bibcode:1972Sci...175.. 720S.  
doi:10.1126/science.175.4023.720. PMID 4333397.
357. Zeidi, Mahdi; Kim, Chun IL (2018). "The effects of intra-membrane viscosity on lipid membrane morphology: complete analytical solution" (Os efeitos da viscosidade intra-membrana na morfologia da membrana lipídica: solução analítica completa). *Relatórios científicos*. **8** (1): 12845. doi:10.1038/s41598-018-31251-6. ISSN 2045-2322.
358. Doherty GJ, McMahon HT (2008). "Mediação, modulação, e consequências das interações membrana-citoesqueleto". *Revisão Anual da Biofísica*. **37**: 65-95. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125912. PMID 18573073. S2CID 17352662.
359. Whatley JM, John P, Whatley FR (Abril de 1979). "From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts". *Actas da Royal Society of London. Série B, Ciências Biológicas*. **204** (1155): 165–87. Bibcode:1979RSPSB.204.. 165W. doi:10.1098/rspb.1979.0020. PMID 36620.
360. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "A Estrutura e Função do ADN". *Biologia Molecular da Célula* (4ª ed.). Garland Science.
361. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "O Transporte de Moléculas entre o Núcleo

- e o Citosol". *Biologia Molecular da Célula* (4ª ed.). Garland Science.
362. Cooper GM (2000). "The Endoplasmic Reticulum". *A Célula: Uma Abordagem Molecular* (2ª ed.). Arquivado a partir do original em 2017-10-03.
363. Xu H, Su W, Cai M, Jiang J, Zeng X, Wang H (2013-04-16). "A estrutura assimétrica das membranas do aparelho de Golgi revelada pelo microscópio de força atômica in situ". *PLOS UM*. **8** (4): e61596. Bibcode:2013PLoS...861596X. doi:10.1371/journal.pone.0061596. PMC 3628984. PMID 23613878.
364. Reed R, Wouston TW, Todd PM (Julho de 1966). "Estrutura e função do sarcolemma do músculo esquelético". *Natureza*. **211** (5048): 534–6. Bibcode:1966Natur.211..534R. doi:10.1038/211534b0. PMID 5967498.
365. Campbell KP, Stull JT (Abril de 2003). "Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series". *The Journal of Biological Chemistry*. **278** (15): 12599–600. doi:10.1074/jbc.r300005200. PMID 12556456.
366. Mitra K, Ubarretxena-Belandia I, Taguchi T, Warren G, Engelman DM (Março de 2004). "Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol". *Actas da*

- Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América. **101** (12): 4083–8. Bibcode:2004PNAS.101.4083M. doi:10.1073/pnas.0307332101. PMC 384699. PMID 15016920.
367. Wessel GM, Wong JL (Outubro de 2009). "Alterações da superfície celular no ovo aquando da fertilização". *Reprodução e Desenvolvimento Molecular*. **76** (10): 942-53. doi:10.1002/mrd.21090. PMC 2842880. PMID 19658159.
368. Raine CS (1999). "Characteristics of the Neuron" (Características do Neurónio). *Neuroquímica básica: Aspectos Moleculares, Celulares e Médicos* (6ª ed.).
369. Fitzpatrick MO, Maxwell WL, Graham DI (Março de 1998). "The role of the axolemma in the initiation of traumatically induced axonal injury" (O papel do axolemma no início da lesão axonal traumatizada). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. **64** (3): 285–7. doi:10.1136/jnnp.64.3.285. PMC 2169978. PMID 9527135.
370. Kerfeld CA, Sawaya MR, Tanaka S, Nguyen CV, Phillips M, Beeby M, Yeates TO (Agosto de 2005). "Estruturas proteicas formando a casca de organelas primitivas". *Ciência*. **309** (5736): 936–8. Bibcode:2005Sci...309..936K. CiteSeerX 10.1.1.1026.896. doi:10.1126/science.1113397. PMID 16081736. S2CID

371. Murat, Dorothee; Byrne, Meghan; Komeili, Arash (2010-10-01). "Biologia Celular de Organelas Prokaryotic". *Perspectivas do Cold Spring Harbor em Biologia*. **2** (10): a000422. doi:10.1101/cshperspect.a000422. PMC 2944366. PMID 20739411.
372. Peterson L (17 de Abril de 2010). "Dominando as partes de uma célula". *Planeta da Lição*. Recuperado em 2010-04-19.
373. Di Gregorio MA (2005). *Daqui até à Eternidade: Ernst Haeckel e Fé Científica*. Gottingen: Vandenhoeck & Ruprecht. p. 218.
374. Bütschli O (1888). Dr. H. G. Bronn's Klassen u. Ordnungen des Thier-Reichs wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild. Erster Band. Protozoa. Dritte Abtheilung: Infusoria und System der Radiolaria. p. 1412. Die Vacuolen sind demnach in strengem Sinne keine beständigen Organe oder O r g a n u l a (wie Möbius die Organe der Einzelligen im Gegensatz zu denen der Vielzelligen zu nennen vorschlug).
375. Ryder JA, ed. (Fevereiro de 1889). "Embriologia": The Structure of the Human Spermatozoon". *Naturalista Americano*. **23**: 184. Talvez seja vantajoso usar aqui a palavra organula em vez de órgão, seguindo uma sugestão de Möbius. Os agregados multicelulares funcionalmente

diferenciados em formas multicelulares ou metazoários são, neste sentido, órgãos, enquanto que, para porções funcionalmente diferenciadas de organismos unicelulares ou para tais porções diferenciadas de elementos germinativos unicelulares de metazoários, o diminutivo organula é apropriado.

376. Robin C, Pouchet G, Duval MM, Retterer E, Tourneux F (1891). *Journal de l'anatomie et de la physiologie normales et pathologiques de l'homme et des animaux*. F. Alcan.

377. Möbius K (Setembro de 1884). "Das Sterben der einzelligen und der vielzelligen Tiere". *Vergleichend betrachtet*. *Biologisches Centralblatt*. 4 (13, 14): 389–392, 448. Während die Fortpflanzungszellen der vielzelligen Tiere unthätig fortleben bis sie sich loslösen, wandern und entwickeln, treten die einzelligen Tiere auch durch die an der Fortpflanzung beteiligten Leibesmasse in Verkehr mit der Außenwelt und viele bilden sich dafür auch besondere Organula". Nota de rodapé na p. 448: "Die Organe der Heteroplastiden bestehen aus vereinigten Zellen". Da die Organe der Monoplastiden nur verschieden ausgebildete Teile e i n e r Zelle sind schlage ich vor, sie "Organula" zu nennen

378. Walker, Patrick (2009). Importação nuclear de motivos de dobra de histone contendo heterodímeros por importação

em 13. Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen.

379. Keeling PJ, Archibald JM (Abril de 2008). "Organelle evolution: o que está num nome?". *Biologia actual*. **18** (8): R345-7. doi:10.1016/j.cub.2008.02.065. PMID 18430636. S2CID 11520942.
380. Imanian B, Carpenter KJ, Keeling PJ (Março-Abril 2007). "Genoma mitocondrial de um endossimbionte terciário retém genes para proteínas de transporte de electrões". *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **54** (2): 146-53. doi:10.1111/j.1550-7408.2007.00245.x. PMID 17403155. S2CID 20393495.
381. Mullins C (2004). "Theory of Organelle Biogenesis": Uma Perspectiva Histórica". *A Biogénese de Organelas Celulares*. Springer Science+Business Media, Institutos Nacionais de Saúde. ISBN 978-0-306-47990-8.
382. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. "The Genetic Systems of Mitochondria and Plastids". *Biologia Molecular da Célula*(4ª ed.). ISBN 978-0-8153-3218-3.
383. Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG (2002). *Biologia* (6ª ed.). Benjamin Cummings. ISBN 978-0-8053-6624-2.

384. Nott TJ, Petsalaki E, Farber P, Jarvis D, Fussner E, Plochowietz A, Craggs TD, Bazett-Jones DP, Pawson T, Forman-Kay JD, Baldwin AJ (Março de 2015). "Transição de fase de uma proteína de nuage desordenada gera organelas sem membrana ambientalmente sensíveis". *Célula Molecular*. **57** (5): 936–947. doi:10.1016/j.molcel.2015.01.013. PMC 4352761. PMID 25747659.
385. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK (Maio 2017). "Biomolecular condensates: organizadores da bioquímica celular". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **18** (5): 285–298. doi:10.1038/nrm.2017.7. PMC 7434221. PMID 28225081.
386. Cormack DH (1984). *Introdução à Histologia*. Lippincott. ISBN 978-0-397-52114-2.
387. Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoege C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA (Junho de 2009). "Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation". *Ciência*. **324** (5935): 1729–32. Bibcode:2009Sci...324.1729B. doi:10.1126/science.1172046. PMID 19460965. S2CID 42229928.
388. Fahey RC, Newton GL, Arrick B, Overdank-Bogart T, Aley SB (Abril de 1984). "Entamoeba histolytica: um

- eukaryote sem metabolismo de glutatião". *Ciência*. **224** (4644): 70–2. Bibcode:1984Sci...224...70F. doi:10.1126/science.6322306. PMID 6322306.
389. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff MC, Roberts K, Walter P, Wilson JH, Hunt T (2014-11-18). *Biologia Molecular da célula* (sexta ed.). Garland Science. p. 679. ISBN 978-0815345244.
390. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (Setembro de 2006). "The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders". *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. **7**: 125-48. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115610. PMID 16722803.
391. Anderson P, Kedersha N (Março de 2008). "Grânulos do stress: a triagem do Tao do RNA". *Tendências em Ciências Bioquímicas*. **33** (3): 141–50. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.003. PMID 18291657.
392. Tsai Y, Sawaya MR, Cannon GC, Cai F, Williams EB, Heinhorst S, Kerfeld CA, Yeates TO (Junho de 2007). "Análise estrutural do CsoS1A e da casca proteica do carboxysome do *Halothiobacillus neapolitanus*". *PLOS Biologia*. **5**(6): e144. doi:10.1371/journal.pbio.0050144. PMC 1872035. PMID 17518518.

393. Ryter A (Janeiro-Fevereiro de 1988). "Contribuição de novos criométodos para um melhor conhecimento da anatomia bacteriana". *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologia*. **139** (1): 33–44. doi:10.1016/0769-2609(88)90095-6. PMID 3289587.
394. Komeili A, Li Z, Newman DK, Jensen GJ (Janeiro de 2006). "Magnetosomas são invaginações da membrana celular organizadas pela proteína actínica MamK"(PDF). *Ciência*. **311** (5758): 242–5. Bibcode:2006Sci...311... 242K. doi:10.1126/science.1123231. PMID 16373532. S2CID 36909813.
395. Scheffel A, Gruska M, Faivre D, Linaroudis A, Plitzko JM, Schüler D (Março de 2006). "Uma proteína ácida alinha magnetosomas ao longo de uma estrutura filamentosa em bactérias magnetotáticas". *Natureza*. **440** (7080): 110–4. Bibcode:2006Natur.440... 110S. doi:10.1038/nature04382. PMID 16299495. S2CID 4372846.
396. Lindsay, M. R.; Webb, R. I.; Strous, M; Jetten, M. S.; Butler, M. K.; Forde, R. J.; Fuerst, J. A. (2001). "Cell compartmentalisation in planctomycetes": Novos tipos de organização estrutural para a célula bacteriana". *Arquivos de Microbiologia*. **175** (6): 413–29. doi:10.1007/s002030100280. PMID 11491082. S2CID 21970703.

397. Jetten, Mike S. M.; Niftrik, Laura van; Strous, Marc; Kartal, Boran; Keltjens, Jan T.; Op den Camp, Huub J. M. (2009-06-01). "Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria". *Revisões Críticas em Bioquímica e Biologia Molecular*. **44** (2–3): 65–84. doi:10.1080/10409230902722783. PMID 19247843. S2CID 205694872. Recuperado em 2020-08-03.
398. Fuerst JA (13 de Outubro de 2005). "Compartimentação intracelular em planctomicetos". *Revisão Anual da Microbiologia*. **59**: 299-328. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121258. PMID 15910279
399. "O que é o ADN". *O que é o ADN*. Linda Clarks. Recuperada a 6 de Agosto de 2016.
400. Bill Bryson, *A Short History of Nearly Everything*, Broadway Books, 2015.p. 500.
401. Dahm R (Janeiro de 2008). "Descobrimo o ADN: Friedrich Miescher e os primeiros anos da investigação do ácido nucleico". *Genética Humana*. **122** (6): 565-81. doi:10.1007/s00439-007-0433 0. PMID 17901982. S2CID 915930.
402. Cox M, Nelson D (2008). *Princípios da Bioquímica*. Susan Winslow. p. 288. ISBN 9781464163074.

403. "Estrutura de ADN". O que é o ADN. Linda Clarks. Recuperada a 6 de Agosto de 2016.
404. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. (Fevereiro de 2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome"(PDF). *Natureza*. **409** (6822): 860–921. Bibcode:2001Natur.409..860L. doi:10.1038/35057062. PMID 11237011.
405. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. (Fevereiro de 2001). "A sequência do genoma humano". *Ciência*. **291**(5507): 1304–51. Bibcode:2001Sci...291.1304V. doi:10.1126/science.1058040. PMID 11181995.
406. Budowle B, van Daal A (Abril de 2009). "Extrair provas de análises forenses de ADN: futuras direcções da biologia molecular". *BioTechniques*. **46** (5): 339-40, 342-50. doi:10.2144/000113136. PMID 19480629.
407. Elson D (1965). "Metabolismo dos Ácidos Nucleicos (DNA Macromolecular e RNA)". *Revisão Anual da Bioquímica*. **34**: 449-86. doi:10.1146/annurev.bi.34.070165.002313. PMID
408. Dahm R (Janeiro de 2008). "Descobrimo o ADN: Friedrich Miescher e os primeiros anos da investigação do ácido nucleico". *Genética Humana. nih.gov*. **122** (6): 565–

81. doi:10.1007/s00439-007-0433-0. PMID 17901982. S2CID 915930.
409. Brock TD, Madigan MT (2009). *Biologia dos microrganismos de Brock*. Pearson / Benjamin Cummings. ISBN 978-0-321-53615-0.
410. Hardinger, Steven; Universidade da Califórnia, Los Angeles (2011). "Knowing Nucleic Acids" (PDF). ucla.edu.
411. Mullis, Kary B. *The Polymerase Chain Reaction (Palestra Nobel)*. 1993. (recuperada a 1 de Dezembro de 2010)  
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html)
412. Verma S, Eckstein F (1998). "Oligonucleotídeos modificados: síntese e estratégia para os utilizadores". *Revisão Anual da Bioquímica*. **67**: 99-134. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.99. PMID 9759484.
413. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, et al. (Maio de 2006). "A sequência de ADN e a anotação biológica do cromossoma humano 1". *A natureza*. **441** (7091): 315–21. Bibcode:2006Natur.441.. 315G. doi:10.1038/natureza04727. PMID 16710414.

414. Todorov TI, Morris MD (Abril de 2002). Institutos Nacionais de Saúde. "Comparação do RNA, do ADN de cadeia única e do comportamento do ADN de cadeia dupla durante a electroforese capilar em soluções semidiluídas de polímeros". *Electroforese. nih.gov.* **23** (7–8): 1033–44. doi:10.1002/1522-2683(200204)23:7/8< 1033::AID-ELPS1033>3.0.CO;2-7. PMID 11981850.
415. Margaret Hunt; Universidade da Carolina do Sul (2010). "RN Virus Replication Strategies". sc.edu.
416. McGlynn P, Lloyd RG (Agosto de 1999). "Actividade de helicóptero RecG em estruturas de ADN de três e quatro cordas". *Pesquisa de Ácidos Nucleicos.* **27** (15): 3049–56. doi:10.1093/nar/27.15.3049. PMC 148529. PMID 10454599418. Stryer, Lubert; Berg, Jeremy Mark; Tymoczko, John L. (2007). *Biochemistry.* São Francisco: W.H. Freeman. ISBN 978-0-7167-6766-4.
417. Rich A, RajBhandary UL (1976). "Transfer RNA: estrutura molecular, sequência, e propriedades". *Revisão Anual da Bioquímica.* **45**: 805-60. doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.004105. PMID 60910.
418. Watson JD, Crick FH (Abril de 1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid". *Natureza.* **171** (4356): 737–8.

Bibcode:1953Natur.171... 737W. doi:10.1038/171737a0.  
PMID 13054692. S2CID 4253007.

419. Ferré-D'Amaré AR, Doudna JA (1999). "RNA folds: insights from recent crystal structures". *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **28**: 57-73. doi:10.1146/annurev.biophys.28.1.57. PMID 10410795.
- 422- Alberts, Bruce (2008). *Biologia Molecular da célula*. Nova Iorque: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4105-5.
420. Gilbert, Walter G. 1980. *DNA Sequencing and Gene Structure* (Palestra Nobel) [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.html)
421. Sanger, Frederick. 1980. *Determinação das sequências de nucleótidos no ADN* (Palestra Nobel) [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/sanger-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/sanger-lecture.html)
422. Coordenadores dos Recursos dos BCNI (Janeiro de 2014). "Recursos de base de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica". *Pesquisa de Ácidos Nucleicos*. **42**(Edição da base de dados): D7-17. doi:10.1093/nar/gkt1146. PMC 3965057. PMID 24259429
423. Krieger M, Deputado Scott, Matsudaira PT, Lodish HF, Darnell JE, Lawrence Z, Kaiser C, Berk A (2004). "Secção 4.1: Estrutura dos Ácidos Nucleicos". *Biologia Celular*

- Molecular. Nova Iorque: W.H. Freeman e CO. ISBN 978-0-7167-4366-8. 427. "Estrutura dos Ácidos Nucleicos". SparkNotes.
424. Anthony-Cahill SJ, Mathews CK, van Holde KE, Appling DR (2012). *Bioquímica* (4ª Edição). Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall. ISBN 978-0-13-800464-4.
425. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Wlatter P (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4ª ed.). Nova Iorque, Nova Iorque: Garland Science. ISBN 978-0-8153-3218-3.
426. Mao C (Dezembro de 2004). "A emergência da complexidade: lições de ADN". *PLoS Biologia*. **2** (12): e431. doi:10.1371/journal.pbio.0020431. PMC 535573. PMID 15597116.
427. Katsuyuki, Aoki; Kazutaka, Murayama; Hu, Ning-Hai (2016). "Capítulo 3, seção 3. Complexos de Ácido Nucleico Constituintes". Em Astrid, Sigel; Helmut, Sigel; Roland K.O., Sigel (eds.). *Os Iões de Metal Alcalino: O seu papel na vida. Os Iões de Metal em Ciências da Vida*. **16**. Springer. pp. 43–66. doi:10.1007/978-3-319-21756-7\_3. ISBN 978-3-319-21755-0. PMID 26860299.
428. Sedova A, Banavali NK (2017). "Padrões Geométricos para Bases Vizinhas Perto do Estado Empilhado em Fios de

- Ácido Nucleico". *Bioquímica*. **56** (10): 1426–1443. doi:10.1021/acs.biochem.6b01101. PMID 28187685
429. Tinoco I, Bustamante C (Outubro de 1999). "Como o RNA se dobra". *Journal of Molecular Biology*. **293** (2): 271–81. doi:10.1006/jmbi.1999.3001. PMID 10550208.
430. "Estrutura RNA (Biologia Molecular)".
431. Hollyfield JG, Besharse JC, Rayborn ME (Dezembro de 1976). "The effect of light on the quantity of phagosomes in the pigment epithelium" (O efeito da luz sobre a quantidade de fagossomas no epitélio do pigmento). *Pesquisa Experimental dos Olhos*. **23** (6): 623–35. doi:10.1016/0014-4835(76)90221-9. PMID 1087245.
432. Rietveld K, Van Poelgeest R, Pleij CW, Van Boom JH, Bosch L (Março 1982). "A estrutura semelhante ao tRNA no terminal 3' do RNA do vírus do mosaico amarelo nabo. Diferenças e semelhanças com o tRNA canónico". *Pesquisa de Ácidos Nucleicos*. **10** (6): 1929–46. doi:10.1093/nar/10.6.1929. PMC 320581. PMID 7079175.
433. Staple DW, Butcher SE (Junho de 2005). "Pseudoknots": Estruturas de RNA com diversas funções". *PLoS Biologia*. **3** (6): e213. doi:10.1371/journal.pbio.0030213. PMC 1149493. PMID 15941360.

434. Sperschneider J, Datta A, Wise MJ (Dezembro de 2012). "Predicting pseudoknotted structures across two RNA sequences". *Bioinformática*. **28**(23): 3058–65. doi:10.1093/bioinformatics/bts575. PMC 3516145.
435. Dickerson RE, Drew HR, Conner BN, Wing RM, Fratini AV, Kopka ML (Abril 1982). "A anatomia de A-, B-, e Z-DNA". *A ciência*. **216** (4545): 475–85. doi:10.1126/science.7071593. PMID 7071593.
436. Chen X; Ramakrishnan B; Sundaralingam M (1995). "Estruturas de cristais de DNA-RNA de forma B complexados com distamicina". *Biologia Estrutural da Natureza*. **2** (9): 733–735. doi:10.1038/nsb0995-733.
437. Sedova A, Banavali NK (2016). "RNA aproxima-se da forma B em contextos de dinucleótido de fio único empilhado". *Biopolímeros*. **105** (2): 65-82. doi:10.1002/bip.22750. PMID 26443416.
438. Mirkin SM (2001). *Topologia do ADN: Fundamentos*. Encyclopedia of Life Sciences. doi:10.1038/npg.els.0001038. ISBN 978-0470016176.
439. "Bioquímica estrutural/Ácido nucléico/estrutura de ácido nucleico/DNA/DNA". Recuperado a 11 de Dezembro de 2012.

440. Tang, Wei; Hu, Shichao; Wang, Huaming; Zhao, Yan; Li, Na; Liu, Feng (23 de Setembro de 2014). "Um tradutor molecular universal para alvos de ácido não-nucleico que permite montagens dinâmicas de ADN e operações lógicas". *Química. Comun.* **50** (92): 14352–14355. doi:10.1039/C4CC07041K. PMID 25295484.
441. Ihalainen, Petri; Pettersson, Fredrik; Pesonen, Markus; Viitala, Tapani; Määttänen, Anni; Österbacka, Ronald; Peltonen, Jouko (7 de Março de 2014). "Um estudo impedimétrico da hibridação do ADN em eléctrodos de ouro impressos a jacto de tinta com suporte de papel". *Nanotecnologia.* **25** (9): 094009. Bibcode:2014Nanot..25i4009I. doi:10.1088/0957-4484/25/9/094009. PMID 24522116.
442. Berney, H.; Oliver, K. (2005). "Dual polarization interferometry size and density characterisation of DNA immobilisation and hybridisation". *Biosensores e Bioelectrónica.* **21** (4): 618–626. doi:10.1016/j.bios.2004.12.024. PMID 16202875.
443. Dixon, Matthew C. (Julho de 2008). "Microbalança de Cristal de Quartzó com Monitorização da Dissipação": Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions". *Journal of Biomolecular*

- Techniques. **19** (3): 151–158. PMC 2563918. PMID 19137101.
444. Hannon, Gregory J. (Julho de 2002). "Interferência do RNA". *Natureza*. **418** (6894): 244-251. doi:10.1038/418244a. ISSN 1476-4687
445. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (Dezembro de 1985). "Amplificação enzimática de sequências genômicas de beta-globina e análise do local de restrição para o diagnóstico de anemia falciforme". *Ciência*. **230** (4732): 1350–4. Bibcode:1985Sci...230.1350S. doi:10.1126/science.2999980. PMID 29999980.
446. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. (Janeiro de 1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Ciência*. **239** (4839): 487–91. Bibcode:1988Sci...239..487S. doi:10.1126/science.239.4839.487. PMID 2448875.
447. Enners, Edward; Porta, Angela R. (2012). "Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction". *O Professor de Biologia Americano*. **74** (4): 256–260. doi:10.1525/abt.2012.74.4.9. S2CID 86708426.
448. Ninfa, Alexander; Ballou, David; Benore, Marilee (2009). *Abordagens Laboratoriais Fundamentais para a*

- Bioquímica e Biotecnologia. Estados Unidos da América: Wiley. pp. 408–10. ISBN 978-0-47008766-4.
449. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R (Junho de 1994). "Amplificação eficaz de alvos longos a partir de inserções clonadas e DNA genómico humano". *Actas da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América*. **91** (12): 56959. Bibcode:1994PNAS...91.5695C. doi:10.1073/pnas.91.12.5695. PMC 44063. PMID 8202550.
450. Carr AC, Moore SD (2012). Lucia A (ed.). "Robusta quantificação das reacções em cadeia da polimerase utilizando encaixe global". *PLOS UM*. **7** (5): e37640. Bibcode:2012PLoSO...737640C. doi:10.1371/journal.pone.0037640. PMC 3365123. PMID 22701526.
451. Joseph Sambrook & David W. Russel (2001). *Clonagem Molecular: Um Manual de Laboratório* (3ª ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-879-69576-7. Capítulo 8: Amplificação in vitro do ADN através da Reacção em Cadeia da Polimerase
452. "Reacção em cadeia da polimerase (PCR)". Centro Nacional de Informação em Biotecnologia, U.S. National Library of Medicine.

453. "PCR". Centro de Aprendizagem de Ciências Genéticas, Universidade de Utah.
454. Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI (Maio de 2004). "Recentes desenvolvimentos na otimização de polimerases de ADN termoestáveis para aplicações eficientes". *Tendências em Biotecnologia*. **22** (5): 253–60. doi:10.1016/j.tibtech.2004.02.011. PMID 15109812.
455. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (Novembro de 1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro". *Pesquisa de Ácidos Nucleicos*. **18** (21): 6409–12. doi:10.1093/nar/18.21.6409. PMC 332522. PMID 2243783.
456. Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Atwood SM, Daiss JL (Maio de 1994). "Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction". *Biologia/Tecnologia*. **12** (5): 506–9. doi:10.1038/nbt0594-506. PMID 7764710. S2CID 2885453.
457. Chien A, Edgar DB, Trela JM (Setembro de 1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *Journal of Bacteriology*. **127** (3): 1550–7. doi:10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976. PMC 232952. PMID 8432.
458. Advogado FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (Maio de 1993). "Expressão

- de alto nível, purificação e caracterização enzimática da polimerase de DNA *Thermus aquaticus* a todo o comprimento e uma forma truncada deficiente em 5' a 3' de actividade de exonuclease". Métodos e Aplicações da PCR. **2** (4): 275–87. doi:10.1101/gr.2.4.275. PMID 8324500.
459. Schochetman G, Ou CY, Jones WK (Dezembro de 1988). "Polymerase chain reaction" (Reacção em cadeia da polimerase). *The Journal of Infectious Diseases*. **158** (6): 1154–7. doi:10.1093/infdis/158.6.1154. JSTOR 30137034. PMID 2461996.
460. Borman, Jon; Schuster, David; Li, Wu-bo; Jessee, Joel; Rashtchian, Ayoub (2000). "PCR a partir de modelos problemáticos" (PDF). *Foco*. **22** (1): 10. Arquivado a partir do original (PDF) a 7 de Março de 2017.
461. Bogetto, Prachi; Waidne, Lisa; Anderson, Holly (2000). "Dicas úteis para a PCR" (PDF). *Foco*. **22** (1): 12. Arquivado a partir do original (PDF) a 7 de Março de 2017.
462. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS (Dezembro de 1990). "A formamida pode melhorar dramaticamente a especificidade da PCR". *Pesquisa de Ácidos Nucleicos*. **18**(24): 7465. doi:10.1093/nar/18.24.7465. PMC 332902. PMID

463. "PCR electrónica". NCBI - Centro Nacional de Informação em Biotecnologia. Recuperado em 13 de Março de 2012.
464. Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI (2006). "Thermostable DNA Polymerases for a Wide Spectrum of Applications" (Polimerases de ADN termoestáveis para um amplo espectro de aplicações): Comparação de um TopoTaq Híbrido Robusto com outras enzimas". Em Kieleczawa J (ed.). Sequenciamento de ADN II: Preparação e Limpeza Optimizante. Jones & Bartlett. pp. 241-57. ISBN 978-0-7637-3383-4.
465. Pombert JF, Sístek V, Boissinot M, Frenette M (Outubro de 2009). "Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, recA, secA, and secY gene sequences". BMC Microbiologia. **9**: 232. doi:10.1186/1471-2180-9-232. PMC 2777182. PMID 19878555.
466. "Síntese Química, Sequenciação e Amplificação de ADN (notas de classe sobre MBB/BIO 343)". Universidade do Estado do Arizona. Arquivado do original em 9 de Outubro de 1997. Recuperado a 29 de Outubro de 2007.
467. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. (Abril de 2009). "The MIQE guidelines:

- minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments" (PDF). *Química Clínica*. **55** (4): 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797. PMID 19246619.
468. Garibyan L, Avashia N (Março de 2013). "Reacção em cadeia da polimerase". *The Journal of Investigative Dermatology*. **133** (3): 1-4. doi:10.1038/jid.2013.1. PMC 4102308. PMID 23399825.
469. Schnell, S.; Mendoza, C. (Outubro de 1997). "Theoretical Description of the Polymerase Chain Reaction" (Descrição teórica da reacção em cadeia da polimerase). *Journal of Theoretical Biology*. **188** (3): 313–318. doi:10.1006/jtbi.1997.0473. PMID 9344735.
470. Schnell, S.; Mendoza, C. (21 de Fevereiro de 1997). "Considerações Enzimológicas para a Descrição Teórica da Reacção Quantitativa Competitiva da Polimerase em Cadeia (QC-PCR)". *Journal of Theoretical Biology*. **184**(4): 433–440. doi:10.1006/jtbi.1996.0283. ISSN 0022-5193. PMID 9082073.
471. Becker, Sven; Böger, Peter; Oehlmann, Ralfh; Ernst, Anneliese (1 de Novembro de 2000). "PCR Bias in Ecological Analysis: a Case Study for Quantitative Taq Nuclease Assays in Analyses of Microbial Communities". *Microbiologia Aplicada e Ambiental*. **66** (11): 4945-4953.

- doi:10.1128/AEM.66.11.4945-4953.2000. ISSN 1098-5336.  
PMC 92404. PMID 11055948.
472. Solomon, Anthony W.; Peeling, Rosanna W.; Foster, Allen; Mabey, David C. W. (1 de Outubro de 2004). "Diagnosis and Assessment of Trachoma". *Revisões Clínicas de Microbiologia*. **17** (4): 982–1011. doi:10.1128/CMR.17.4.982-1011.2004. ISSN 0893-8512. PMC 523557. PMID 15489358.
473. Ramzy, Reda M.R. (Abril de 2002). "Recent advances in molecular diagnostic techniques for human lymphatic filariasis and their use in epidemiological research". *Transacções da Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **96**: S225-S229. doi:10.1016/S0035-9203(02)90080-5. PMID 12055843.
474. Sachse, Konrad (2003). Sachse, Konrad; Frey, Joachim (eds.). *Especificidade e desempenho dos ensaios de diagnóstico por PCR. Detecção por PCR de agentes patogénicos microbianos. Métodos em Biologia Molecular*. **216**. Totowa, New Jersey: Humana Press. pp. 3–29. doi:10.1385/1-59259-344-5:03. ISBN 978-1-59259-344-6. PMID 12512353.
475. Quill E (Março de 2008). "Medicina". *A correspondência de sangue é genética*. *Ciência*. **319** (5869):

- 1478–9. doi:10.1126/science.319.5869.1478. PMID 18339916. S2CID 36945291.
476. Tomar, Rukam (2010). *Marcadores Moleculares e Biotecnologia Vegetal*. Pitman Pura, Nova Deli: New India Publishing Agency. p. 188. ISBN 978-93-80235-25-7.
477. Cai HY, Caswell JL, Prescott JF (Março de 2014). "Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective". *Patologia Veterinária*. **51** (2): 341–50. doi:10.1177/0300985813511132. PMID 24569613.
478. Salis AD (2009). "Aplicações em Microbiologia Clínica". *PCR em Tempo Real: Tecnologia e Aplicações Actuais*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-39-4.
479. Kwok S, Mack DH, Mullis KB, Poiesz B, Ehrlich G, Blair D, et al. (Maio de 1987). "Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection". *Journal of Virology*. **61** (5): 1690–4. doi:10.1128/jvi.61.5.1690-1694.1987. PMC 254157. PMID 2437321.
480. "Coronavírus: il viaggio dei test". Istituto Superiore di Sanità.

481. Finger, Horst; von Koenig, Carl Heinz Wirsing (1996). Barão, Samuel (ed.). *Medical Microbiology* (4<sup>a</sup> ed.). Galveston, TX: Ramo Médico da Universidade do Texas em Galveston. ISBN 978-0-96311721-2. PMID 21413270.
482. Yeh, Sylvia H.; Mink, ChrisAnna M. (2012). "Bordetella pertussis and Pertussis (Whooping Cough)". *Netter's Infectious Diseases*. Netter's Infectious Diseases. pp. 11-14. doi:10.1016/B978-1-4377-0126-5.00003-3. ISBN 978-1-43770126-5.
483. Alonso A, Martín P, Albarrán C, García P, García O, de Simón LF, et al. (Janeiro de 2004). "Real-Time PCR Designs to Estimate Nuclear and Mitochondrial DNA Copy Number in Forensic and Ancient DNA Studies". *Forensic Science International*. **139** (2–3): 141–9. doi:10.1016/j.forsciint.2003.10.008. PMID 15040907.
484. Boehnke M, Arnheim N, Li H, Collins FS (Julho de 1989). "Fine-structure genetic mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations". *American Journal of Human Genetics*. **45** (1): 21–32. PMC 1683385. PMID 2568090.
485. Zhou YH, Zhang XP, Ebright RH (Novembro de 1991). "Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with Taq DNA polimerase". *Pesquisa de*

- Ácidos Nucleicos. **19** (21): 6052.  
doi:10.1093/nar/19.21.6052. PMC 329070. PMID 1658751.
486. Stursberg, Stephanie (2021). "Criação de um laboratório PCR a partir do zero". INTEGRA Biociências.
487. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. (Abril de 1989). "Análise de qualquer mutação pontual no ADN". O sistema de mutação refractária de amplificação (ARMS)". Pesquisa de Ácidos Nucleicos. **17** (7): 2503–16. doi:10.1093/nar/17.7.2503. PMC 317639. PMID 2785681.
488. Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, Heyneker HL (Outubro de 1995). "Montagem num só passo de um gene e plasmídeo inteiro de um grande número de oligodeoxirribonucleotídeos". Gene. **164** (1): 49–53. doi:10.1016/0378-1119(95)00511-4. PMID 7590320.
489. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA (Dezembro de 1988). "Sequenciamento de ADN com *Thermus aquaticus* DNA polimerase e sequenciamento directo de ADN amplificado por reacção em cadeia da polimerase". Actas da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América. **85** (24): 9436–40. Bibcode:1988PNAS...85.9436I. doi:10.1073/pnas.85.24.9436. PMC 282767. PMID 3200828.

490. Pierce KE, Wangh LJ (2007). Linear-fter-the-exponential polimerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells. *Métodos em Medicina Molecular*. **132**. pp. 65-85. doi:10.1007/978-1-59745-298-4\_7. ISBN 978-1-58829-578-1. PMID 17876077.
491. Krishnan M, Ugaz VM, Burns MA (Outubro de 2002). "PCR numa célula de convecção Rayleigh-Bénard". *Ciência*. **298** (5594): 793. doi:10.1126/science.298.5594.793. PMID 12399582.
492. Priye A, Hassan YA, Ugaz VM (Novembro de 2013). "Avanço caótico à escala microscópica permite uma forte replicação de DNA convectivo". *Química Analítica*. **85** (21): 10536–41. doi:10.1021/ac402611s. PMID 24083802.
493. Schwartz JJ, Lee C, Shendure J (Setembro de 2012). "Síntese exacta de genes com recuperação de moléculas de ADN validadas em sequência". *Métodos da Natureza*. **9** (9): 9135. doi:10.1038/nmeth.2137. PMC 3433648. PMID 22886093.
494. Vincent M, Xu Y, Kong H (Agosto de 2004). "Amplificação do ADN isotérmico dependente da hélice". *Relatórios EMBO*. **5** (8): 795–800. doi:10.1038/sj.embor.7400200. PMC 1249482. PMID 15247927.

495. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (Abril de 1992). "Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications". *Nucleic Acids Research*. **20** (7): 1717–23. doi:10.1093/nar/20.7.1717. PMC 312262. PMID 1579465.
496. Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A (Junho de 1994). "TaqStart Antibody": PCR "hot start" facilitada por um anticorpo monoclonal neutralizante dirigido contra a Taq DNA polimerase". *BioTechniques*. **16** (6): 1134–7. PMID 8074881.
497. San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J (Dezembro de 2013). "Exercício online para a concepção e simulação de experiências de PCR e PCR-RFLP". *Notas de Investigação da BMC*. **6**: 513. doi:10.1186/1756-0500-6-513. PMC 4029544. PMID 24314313.
498. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (Março de 1994). "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification". *Genómica*. **20** (2): 176–83. doi:10.1006/geno.1994.1151. PMID 8020964.
499. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (Novembro de 1988). "Genetic applications of an inverse polymerase chain

- reaction". *Genética*. **120** (3): 621–3. doi:10.1093/genetics/120.3.621. PMC 1203539. PMID 2852134.
500. Mueller PR, Wold B (Novembro de 1989). "In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR". *Ciência*. **246** (4931): 780–6. Bibcode:1989Sci...246.. 780M. doi:10.1126/science.2814500. PMID 2814500.
501. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (Setembro de 1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands". *Actas da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América*. **93** (18): 9821–6. Bibcode:1996PNAS...93.9821H. doi:10.1073/pnas.93.18.9821. PMC 38513. PMID 8790415.
502. Isenbarger TA, Finney M, Ríos-Velázquez C, Handelsman J, Ruvkun G (Fevereiro de 2008). "Miniprimer PCR, uma nova lente para ver o mundo microbiano". *Microbiologia Aplicada e Ambiental*. **74** (3): 840–9. doi:10.1128/AEM.01933-07. PMC 2227730. PMID 18083877.
503. Shen C, Yang W, Ji Q, Maki H, Dong A, Zhang Z (Novembro de 2009). "NanoPCR observation: different levels of DNA replication fidelity in nanoparticle-enhanced polymerase chain reactions". *Nanotecnologia*. **20** (45):

455103. Bibcode:2009Nanot..20S5103S. doi:10.1088/0957-4484/20/45/455103. PMID 19822925. S2CID 3393115.
504. Shen, Cenchao (2013). "An Overview of Nanoparticle-Assisted Polymerase Chain Reaction Technology". Uma visão geral da Tecnologia de Reacção em Cadeia da Polimerase Assistida por Nanopartículas. US: Wiley-Blackwell Publishing Ltd. pp. 97-106. doi:10.1002/978111818451915.ch5. ISBN 9781118451915.
505. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR (Abril de 1989). "Engineering hybrid genes sem o uso de enzimas de restrição: emenda de genes por extensão de sobreposição". *Gene*. **77** (1): 61–8. doi:10.1016/0378-1119(89)90359-4. PMID 2744488.
506. Moller, Simon (2006). PCR: The Basics. US: Grupo Taylor & Francis. p. 144. ISBN 9780415355476.
507. David F, Turlotte E (Novembro de 1998). "[Um método de amplificação de genes isotérmicos]". [Um Método de Amplificação Isotérmica]. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III*. **321** (11): 909–14. Bibcode:1998CRASG.321.. 909D. doi:10.1016/S0764-4469(99)80005-5. PMID 9879470.
508. Fabrice David (Setembro-Outubro de 2002). "Utiliser les propriétés topologiques de l'ADN: une nouvelle arme

- contre les agents pathogènes"(PDF). Fusão. Arquivado do original (PDF) a 28 de Novembro de 2007.(em francês)
509. Dobosy JR, Rose SD, Beltz KR, Rupp SM, Powers KM, Behlke MA, Walder JA (Agosto de 2011). "RNase H-dependent PCR (rhPCR): melhoria da especificidade e detecção de polimorfismo de nucleótido único usando primers cliváveis bloqueados". *BMC Biotecnologia*. **11**: 80. doi:10.1186/1472-6750-11-80. PMC 3224242. PMID 21831278.
510. Shyamala, V.; Ferro-Luzzi, Ames G. (1993). Primer-Polimerase em Cadeia (SSP-PCR) e Genome Walking. *Métodos em Biologia Molecular*. **15**. pp. 339–48. doi:10.1385/0-89603-244-2:339. ISBN 978-0-89603-244-6. PMID 21400290.
511. Bing DH, Boles C, Rehman FN, Audeh M, Belmarsh M, Kelley B, Adams CP (1996). "Amplificação de ponte: um sistema de PCR de fase sólida para a amplificação e detecção de diferenças alélicas em genes de cópia única". *Genetic Identity Conference Proceedings, Seventh International Symposium on Human Identification*. Arquivado do original em 7 de Maio de 2001.
512. Khan Z, Poetter K, Park DJ (Abril de 2008). "Enhanced solid phase PCR: mechanisms to increase priming by solid

- support primers". *Bioquímica Analítica*. **375** (2): 391–3. doi:10.1016/j.ab.2008.01.021. PMID 18267099.
513. Raoult D, Aboudharam G, Crubézy E, Larrouy G, Ludes B, Drancourt M (Novembro de 2000). "Identificação molecular por "PCR suicida" de *Yersinia pestis* como o agente da morte negra medieval". *Actas da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América*. **97** (23): 12800–3. Bibcode:2000PNAS...9712800R. doi:10.1073/pnas.220225197. PMC 18844. PMID 11058154.
514. Liu YG, Whittier RF (Fevereiro de 1995). "PCR assimétrica térmica entrelaçada: amplificação e sequenciação automática de fragmentos de extremidade de inserção de clones P1 e YAC para caminhada cromossômica". *Genómica*. **25** (3): 674–81. doi:10.1016/0888-7543(95)80010-J. PMID 7759102.
515. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (Julho 1991). "'Touchdown' PCR para contornar priming espúrio durante a amplificação genética". *Nucleic Acids Research*. **19** (14): 4008. doi:10.1093/nar/19.14.4008. PMC 328507. PMID 1861999.
516. Myrick KV, Gelbart WM (Fevereiro de 2002). "Universal Fast Walking for direct and versatile

- determination of flanking sequence". *Gene*. **284** (1–2): 125–31. doi:10.1016/S0378-1119(02)00384-0. PMID 11891053.
517. "Full Text - LaNe RAGE: uma nova ferramenta para a determinação da sequência de flanqueamento do ADN genómico". [www.ejbiotechnology.info](http://www.ejbiotechnology.info).
518. Park DJ (Janeiro de 2005). "Um novo exão terminal de 5' GAPDH murino GAPDH identificado usando 5'RACE LaNe". *Biotecnologia Molecular*. **29** (1): 39-46. doi:10.1385/MB:29:1:39. PMID 15668518. S2CID 45702164.
519. Park DJ (Abril de 2004). "3' RACE LaNe: um método de PCR simples e rápido para determinar a sequência cDNA 3'-terminal". *BioTechniques*. **36** (4): 586-8, 590. doi:10.2144/04364BM04. PMID 15088375.
520. "O ingrediente chave nos testes do coronavírus provém dos lagos de Yellowstone". *Ciência*. 31 de Março de 2020. Recuperado em 13 de Maio de 2020.
521. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (Março 1971). "Estudos sobre polinucleotídeos. XCVI. Replicações de reparação de DNA sintético curto como catalisado por polimerases de DNA". *Journal of Molecular Biology*. **56**(2): 341–61. doi:10.1016/0022-2836(71)90469-4. PMID 4927950.

522. Rabinow, Paul (1996). Realização de PCR: A Story of Biotechnology. Chicago: Imprensa da Universidade de Chicago. ISBN 978-0-226-70146-2.
523. Mullis, Kary (1998). Dançando Nua no Campo da Mente. Nova Iorque: Livros Pantheon. ISBN 978-0-679-44255-4.
524. Mullis KB (Abril de 1990). "A origem invulgar da reacção em cadeia da polimerase". Científico Americano. **262** (4): 56–61, 64–5. Bibcode:1990SciAm.262d..56M. doi:10.1038/scientificamerican0490-56. PMID 2315679.
525. Patidar M, Agrawal S, Parveen F, Khare P (2015). "Perspectivas moleculares da saliva na resolução de disputas de paternidade". Journal of Forensic Dental Sciences. **7**(1): 76–9. doi:10.4103/0975-1475.150325. PMC 4330625. PMID 25709326.
526. Nichols D, Barker E (2016). "Psicadélicos". Revisões farmacológicas. **68**(2): 356. doi:10.1124/pr.115.011478. PMC 4813425. PMID 26841800. "The Nobel Prize in Chemistry 1993". NobelPrize.org. "The Nobel Prize in Chemistry 1993". NobelPrize.org.
527. "Citações para Prémios Chemical Breakthrough 2017 Awardees". Divisão da História da Química. Recuperado em 12 de Março de 2018.

528. "Conselhos sobre Como Sobreviver às Guerras Taq". GEN Genetic Engineering News - Canal Biobusiness. **26** (9). 1 de Maio de 2006.
529. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (Janeiro de 1999). "RT-PCR quantitativo: armadilhas e potencial". BioTechniques. **26** (1): 112-22, 124-5. doi:10.2144/99261rv01. PMID .
530. Mackay, Ian (2007). PCR em tempo real em Microbiologia: Do Diagnóstico à Caracterização. Norfolk, Inglaterra: Caister Academic Press. pp. 440. ISBN 978-1-904455-18-9.
531. Joyce C (2002). RT-PCR Quantitativa. Uma revisão das metodologias actuais. Métodos Mol. Biol. **193**. pp. 83-92. doi:10.1385/1-59259-283-X:083. ISBN 978-1-59259-283-8. PMID 12325527.
532. Kang XP, Jiang T, Li YQ, et al. (2010). "Um ensaio RT-PCR duplex em tempo real para detecção do vírus da gripe aviária H5N1 e do vírus pandémico da gripe H1N1". Virol. J. **7**: 113. doi:10.1186/1743-422X-7-113. PMC 2892456. PMID 20515509.
533. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (Junho de 2005). "Quantitative real-time RT-PCR--uma perspectiva". J. Mol. Endocrinol. **34** (3): 597-601. CiteSeerX

- 10.1.1.528.6638. doi:10.1677/jme.1.01755. PMID 15956331.
534. Varkonyi-Gasic E, Hellens RP (2010). "qRT-PCR de Pequenos RNAs". *Epigenética Vegetal. Métodos em Biologia Molecular*. **631**. pp. 109-22. doi:10.1007/978-1-60761-646-7\_10. ISBN 978-1-60761-645-0. PMID 20204872.
535. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M (Abril de 2010). "Uma abordagem prática à RT-qPCR- Publicação de dados em conformidade com as diretrizes MIQE". *Métodos*. **50** (4): S1–5. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005. PMID 20215014.
536. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al. (Setembro de 2002). "Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes". *J. Clin. Microbiol.* **40** (9): 3256–60. doi:10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002. PMC 130722. PMID 12202562.
537. "AUTORIZAÇÃO DE UTILIZAÇÃO DE EMERGÊNCIA ACELERADA (EUA) RESUMO COVID-19 RT-PCR TEST (LABORATÓRIO CORPORAÇÃO DA AMÉRICA)". FDA. Recuperado em 3 de Abril de 2020.
538. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (Dezembro de 1977). "Método de detecção de RNAs específicos em géis de

- agarose por transferência para papel diazobenziloximetilo e hibridação com sondas de ADN". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74** (12): 5350–4. Bibcode:1977PNAS...74.5350A. doi:10.1073/pnas.74.12.5350. PMC 431715. PMID 414220.
539. Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, Friess H (2009). "Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues". Nat Protoc. **4** (1): 37–43. doi:10.1038/nprot.2008.216. PMID 19131955.
540. Bustin SA (Outubro de 2000). "Quantificação absoluta do mRNA utilizando ensaios de transcrição inversa em tempo real de reacção em cadeia da polimerase". J. Mol. Endocrinol. **25** (2): 169–93. doi:10.1677/jme.0.0250169. PMID 11013345.
541. Hierro N, Esteve-Zarzoso B, González A, Mas A, Guillamón JM (Novembro de 2006). "PCR quantitativa em tempo real (QPCR) e transcrição inversa-QPCR para detecção e enumeração de leveduras totais no vinho". Aplic. Ambiente. Microbiol. **72** (11): 7148-55. doi:10.1128/AEM.00388-06. PMC 1636171. PMID 17088381.
542. Slomka MJ, Pavlidis T, Coward VJ, et al. (Julho de 2009). "Validated RealTime reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7

- avian influenza viruses". *Influenza e Outros Vírus Respiratórios*. **3** (4): 151-64. doi:10.1111/j.1750-2659.2009.00083.x. PMC 4634683. PMID 19627372.
543. Resumo da missão: Visita de campo da OMS a Wuhan, China 20-21 de Janeiro de 2020: <https://www.who.int/china/news/detail/22-01-2020-field-visit-wuhan-china-jan-2020>
544. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, et al. (Junho de 2007). "Real-Time PCR: Detecção Revolucionante e Análise da Expressão dos Genes". *Moeda. Genómica*. **8** (4): 234–51. doi:10.2174/138920207781386960. PMC 2430684. PMID 18645596.
545. Bustin SA (Agosto de 2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems". *J. Mol. Endocrinol.* **29** (1): 23–39. doi:10.1677/jme.0.0290023. PMID 12200227.
546. Souazé F, Ntodou-Thomé A, Tran CY, Rostène W, Forgez P (Agosto de 1996). "RT-PCR quantitativo: limites e precisão". *BioTechniques*. **21** (2): 280-5. doi:10.2144/96212rr01. PMID 8862813.
547. Wong ML, Medrano JF (Julho de 2005). "PCR em tempo real para quantificação do mRNA". *BioTechniques*. **39** (1): 75-85. doi:10.2144/05391rv01. PMID 16060372.

548. Li, Lang; He, Jian-an; Wang, Wei; Xia, Yun; Song, Li; Chen, Ze-han; Zuo, Hang-zhi; Tan, Xuan-Ping; Ho, Aaron Ho-Pui; Kong, Siu-Kai; Loo, Jacky Fong-Chuen (2019-08-01). "Desenvolvimento de um ensaio directo de PCR quantitativo de transcrição inversa (dirRT-qPCR) para diagnóstico clínico da Zika". *Revista Internacional de Doenças Infecciosas*. **85**: 167-174. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.007. ISSN 1201-9712. PMID 31202908.
549. Bachofen, Claudia; Willoughby, Kim; Zadoks, Ruth; Burr, Paul; Mellor, Dominic; Russell, George C. (2013-06-01). "A RT-PCR directa a partir do soro permite uma análise filogenética rápida e económica do vírus da diarreia viral bovina". *Journal of Virological Methods*. **190** (1): 1–3. doi:10.1016/j.jviromet.2013.03.015. ISSN 0166-0934. PMID 23541784.
550. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (Outubro de 2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods". *Anal. Biochem*. **285** (2): 194–204. doi:10.1006/abio.2000.4753. PMID 11017702. S2CID 258810.

551. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER (Fevereiro de 2001). "Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR". *J Mol Diagn.* **3** (1): 26–31. doi:10.1016/S1525-1578(10)60646-0. PMC 1907344. PMID 11227069.
552. Stone-Marschat M, Carville A, Skowronek A, Laegreid WW (Março de 1994). "Detection of African horse sickness virus by reverse transcription-PCR". *J. Clin. Microbiol.* **32** (3): 697–700. doi:10.1128/JCM.32.3.697-700.1994. PMC 263109. PMID 8195381.
553. Minton AP (Abril de 1995). "O confinamento como determinante da estrutura macromolecular e da reactividade. II. Efeitos de interações pouco atractivas entre macrossolutos confinados e estruturas confinadas". *Biofísica. J.* **68** (4): 1311–22. Bibcode:1995BpJ....68.1311M. doi:10.1016/S0006-3495(95)80304-8. PMC 1282026. PMID 7787020.
554. Hsu M, Yu EY, Sprušanský O, McEachern MJ, Lue NF (Julho de 2012). "A análise funcional do homólogo único Est1/Ebs1 em *Kluyveromyces lactis* revela papéis tanto na manutenção de telómeros como na resistência à rapamicina". *Célula eucariótica.* **11** (7): 932–42. doi:10.1128/EC.05319-11. PMC 3416500. PMID 22544908.

555. Schmittgen TD, Livak KJ (2008). "Análise de dados PCR em tempo real pelo método comparativo C(T)". *Nat Protoc.* **3** (6): 1101–8. doi:10.1038/nprot.2008.73. PMID 18546601.
556. Tang, Yi-Wei (2012-09-13), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, ISBN 978-1461439691
557. Gause WC, Adamovicz J (Junho de 1994). "A utilização da PCR para quantificar a expressão genética". *Métodos de PCR Aplic.* **3** (6): S123–35. doi:10.1101/gr.3.6.s123. PMID 7522722.
558. Tsai SJ, Wiltbank MC (Novembro de 1996). "Quantification of mRNA using competitive RT-PCR with standard-curve methodology". *BioTechniques.* **21**(5): 862-6. doi:10.2144/96215st04. PMID 8922627.
559. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (Março de 2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data". *Neurosci. Lett.* **339** (1): 62–6. doi:10.1016/S0304-3940(02)01423-4. PMID 12618301.
560. Halford WP, Falco VC, Gebhardt BM, Carr DJ (Janeiro de 1999). "A capacidade quantitativa inerente da reacção de transcrição-polimerase inversa em cadeia". *Anal. Biochem.* **266** (2): 181–91. doi:10.1006/abio.1998.2913. PMID 9888974.

561. Rei N (2010). "A utilização de RT-PCR quantitativa comparativa para investigar o efeito da incubação de cisteína na expressão de GPx1 em cardiomiócitos recém-isolados". *Protocolos RT-PCR. Métodos em Biologia Molecular*. **630**. pp. 215-32. doi:10.1007/978-1-60761-629-0\_14. ISBN 978-1-60761-628-3. PMID 20301000.
562. Chang JT, Chen IH, Liao CT, et al. (Novembro de 2002). "A reverse transcription comparative real-time PCR method for quantitative detection of angiogenic growth factors in head and neck cancer patients". *Clin. Biochem.* **35** (8): 591–6. doi:10.1016/S0009-9120(02)00403-4. PMID 12498992.
563. Holden, M. J.; Wang, L. (2008). "Quantitative Real-Time PCR": Opções e Problemas da Sonda Fluorescente". *Normalização e Garantia de Qualidade em Medições de Fluorescência II. Série Springer sobre Fluorescência*. **6**. p. 489. doi:10.1007/4243\_2008\_046. ISBN 978-3-540-70570-3.
564. Yang DK, Kweon CH, Kim BH, et al. (Dezembro de 2004). "TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus". *J. Vet. Sci.* **5** (4): 345–51. doi:10.4142/jvs.2004.5.4.345. PMID 15613819.

565. Sharkey FH, Banat IM, Marchant R (Julho de 2004). "Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology" (Detecção e quantificação da expressão genética em bacteriologia ambiental). *Aplic. Ambiente. Microbiol.* **70** (7): 3795–806. doi:10.1128/AEM.70.7.3795-3806.2004. PMC 444812. PMID 15240248.
566. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP (Julho de 2007). "Diagnóstico molecular de vírus médicos". *Questões Monetárias Mol Biol.* **9** (2): 87–102. PMID 17489437.
567. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (Outubro de 2000). "Multiplex PCR: otimização e aplicação em virologia diagnóstica". *Clin. Microbiol. Rev.* **13** (4): 559–70. doi:10.1128/cmr.13.4.559-570.2000. PMC 88949. PMID 11023957.
568. Bustin SA (Julho de 2005). "PCR quantitativa em tempo real, baseada em fluorescência: um instantâneo dos procedimentos e preferências actuais". *O perito Rev. Mol. Diagnóstico.* **5**(4): 493–8. doi:10.1586/14737159.5.4.493. PMID 16013967. S2CID 1833811.
569. Lin L, Chamberlain L, Zhu LJ, Green MR (Fevereiro de 2012). "Análise da activação da transcrição dirigida por Gal4 utilizando mutantes Tra1 selectivamente defeituosos para interacção com Gal4". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**

- (6): 1997–2002. Bibcode:2012PNAS. 109.1997L. doi:10.1073/pnas.1116340109. PMC 3277556. PMID 22308403.
570. Torres RJ, Garcia MG, Puig JG (Dezembro de 2012). "Carrier and prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan disease due to a defect in HPRT gene expression regulation". *Gene*. **511** (2): 306–7. doi:10.1016/j.gene.2012.09.121. PMID 23046577.
571. Xi L, Nicastrì DG, El-Hefnawy T, Hughes SJ, Luketich JD, Godfrey TE (Julho de 2007). "Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung lung cancers". *Clin. Quimioterapia*. **53** (7): 1206–15. doi:10.1373/clinchem.2006.081828. PMID 17525108.
572. "Coronavirus: il viaggio dei test". Istituto Superiore di Sanità.
573. Shiao YH (Dezembro de 2003). "A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification". *BMC Biotechnol.* **3**: 22. doi:10.1186/1472-6750-3-22. PMC 317330. PMID 14664723.
574. Gettemy JM, Ma B, Alic M, Gold MH (Fevereiro de 1998). "Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family". *Aplicar o*

- ambiente. *Microbiol.* **64** (2): 569–74. doi:10.1128/AEM.64.2.569-574.1998. PMC 106084. PMID 9464395.
575. Martel, Fátima; Dirk Grundemann; Edgar Schöig (2002-03-31). "Um método simples para a eliminação de resultados falso positivos em RT-PCR". *J Biochem Mol Biol.* **35** (2): 248–250. doi:10.5483/BMBRep.2002.35.2.248. PMID 12297038.
576. "High Transcript Tools OneStep Kit". Bioferramentas. Arquivado a partir do original em 20 de Maio de 2013. Recuperado a 12 de Dezembro de 2012.
577. Degen, Hans-Joachim; Deufel, Annette; Eisel, Doris; Grünewald-Janho, Stefanie; Keeseey, Joe (2006). Manual de Aplicações PCR (PDF) (3 ed.). Roche Diagnostics. pp. 135-137.
578. "RT-PCR Two-Step Protocol" (PDF). MIT. Recuperado em 12 de Dezembro de 2012.
579. "www.microarrays.ca" (PDF).
580. Bustin SA (Abril de 2010). "Porquê a necessidade de directrizes de publicação qPCR?--O caso do MIQE". *Os métodos.* **50** (4): 217–26. doi:10.1016/j.ymeth.2009.12.006. PMID 20025972.

581. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. (Abril de 2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments". Clin. Chem. **55** (4): 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797. PMID 19246619.

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**More  
Books!**



yes  
**I want morebooks!**

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at  
**[www.morebooks.shop](http://www.morebooks.shop)**

Compre os seus livros mais rápido e diretamente na internet, em uma das livrarias on-line com o maior crescimento no mundo! Produção que protege o meio ambiente através das tecnologias de impressão sob demanda.

Compre os seus livros on-line em  
**[www.morebooks.shop](http://www.morebooks.shop)**

KS OmniScriptum Publishing  
Brivibas gatve 197  
LV-1039 Riga, Latvia  
Telefax: +371 686 20455

[info@omniscryptum.com](mailto:info@omniscryptum.com)  
[www.omniscryptum.com](http://www.omniscryptum.com)

OMNIscriptum



FOR AUTHOR USE ONLY