

# **BROTÉRIA GENÉTICA**

**REVISTA QUADRIMESTRAL**

**ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA**

**Subsidiada pelo  
Instituto Nacional de Investigação Científica**

**NÚMERO 1**

**VOLUME IV**

**1983**

**REVISTA "BROTÉRIA"  
BIBLIOTECA**



ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

#### CONSELHO DE REDACÇÃO :

Prof. Dr. Luís J. Archer (Director e Proprietário)  
Cristina Marinho (Secretário)  
Prof. Dr. Jorge Antunes-Correia  
Prof. Dr. Miguel Pereira Coutinho  
Eng.º Tristão Mello-Sampayo  
Prof. Dr. Luís Sieuve Monteiro  
Prof. Dr. Amândio S. Tavares

ADMINISTRADOR : Januário Geraldes

#### CONDIÇÕES DE ASSINATURA :

Portugal: Esc.: 400\$00 (oferecida gratuitamente pela Sociedade Portuguesa de Genética aos seus sócios)  
Espanha e Países de expressão portuguesa. Dol. \$7.00  
Outros Países: Dol. \$12.00  
Número avulso: Esc. 150\$00

#### REDACÇÃO E ADMINISTRAÇÃO :

**BROTÉRIA GENÉTICA**  
R. Maestro António Taborda, 14  
1293 LISBOA CODEX  
Telef. 66 16 60

Composto e Impresso nas oficinas gráficas da Editorial Império, Lda.  
Rua do Salitre, 155, 1.º — Telef. 57 31 73 — 1296 Lisboa Codex — Portugal

# ÍNDICE

## TEMAS EM FOCO

- Perspectivas de aplicação da engenharia genética ao homem ..... 5  
por *Luís J. Archer*
- Breve visita à conversão Genética ..... 7  
por *A. Madeira Lopes*

## ARTIGOS GERAIS E DE REVISÃO

- O Debate Europeu sobre Engenharia Genética ..... 9  
por *Luís J. Archer*

## ARTIGOS DE INVESTIGAÇÃO

- Two newly isolated temperate phages of *Bacillus subtilis* ..... 27  
por *Rosa M. Fernandes, Herminia de Lencastre e Luís J. Archer*
- Modificações ultraestruturais do nucléolo de Células CV<sub>1</sub>, induzidas pela Ribavirina ..... 35  
por *M. Luísa Valdeira e A. P. Alves de Matos*

## NOTAS E NOTÍCIAS

- III Reunião Anual da Sociedade Belga de Mutagénese Ambiental ..... 45
- 6th European Meeting on Bacterial Transformation and transfection ..... 51
- Ficheiro de Actividades dos Sócios ..... 57



FORM NO 1000

1. This form is to be used for the purpose of recording the results of the examination of the specimen submitted for the purpose of determining the presence or absence of the disease in question.

2. The specimen should be submitted in a clean, dry, and sealed container, and should be accompanied by a label containing the following information:

3. The name of the patient, the date of collection, the name of the collector, and the name of the institution.

4. The results of the examination should be recorded in the space provided on this form, and should be signed by the examiner.

5. This form should be retained for a period of one year after the date of collection, and should be destroyed thereafter.

6. This form is available for use by all members of the staff of the institution, and should be used in accordance with the instructions given above.

## PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO DA ENGENHARIA GENÉTICA AO HOMEM

Luís J. Archer

Tive a oportunidade de ouvir, nos E. U. A., num dos últimos dias do ano findo, uma conferência do Dr. W. French Anderson (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) sobre o tema em referência, e que pôs em evidência a extraordinária intensidade com que se está a trabalhar e a fazer progressos nesta área. Aquele autor em breve publicará sobre o tema um artigo de revisão na *Science*. Para já, aqui fica este breve apontamento.

Antes de tentar aplicar engenharia genética ao homem será preciso assegurar, através de estudos em animais, que se consegue:

- a) introduzir, nas células de determinado tecido, o novo gene, e mantê-lo activo;
- b) regular adequadamente a actividade desse gene;
- c) verificar que o novo gene não tem efeitos deletérios secundários .

Dos vários métodos correntemente usados para a introdução dum gene novo em células de mamíferos (microinjecção, transformação, transdução) julga-se que a técnica com mais futuro para o caso do homem é a do tipo vírus. Mas por causa de possíveis perigos no uso de vírus naturais mesmo quando modificados e tornados defectivos, está a trabalhar-se na construção de vírus artificiais («virus-like particles»).

O seu genoma é constituído, além dum segmento de DNA que lhe dê capacidade de auto-replicação, pelo novo gene, por uma região regulatória, e por uma zona determinante da integração apropriada do gene novo no cromossoma receptor. O invólucro proteico desse vírus artificial é construído em parte com antígenos específicos, de modo a que ele reconheça apenas as células do tecido que se pretende atingir. A encapsulação do genoma no invólucro proteico é feita *in vitro*, como já se pratica com o fago  $\lambda$  e com os cósmidos (Methods in Enzymology, 68:299-309).

Importantes progressos se têm feito no conhecimento da regulação de genes humanos, como por exemplo no caso das globinas, em que se começou por

analisar os casos de persistência hereditária de globinas fetais (devidos à ausência da zona regulatória que deveria desligar o respectivo gene) e se encontraram drogas, como a 5-azocitidina que, impedindo a metilação do DNA, mantém activos os genes respectivos (New Scientist 96 (1336): 725). Estes conhecimentos, além de darem esperanças para terapia não genética em casos de talassémias, são também aproveitados para a construção dos vírus artificiais.

Na opinião do Dr. French Anderson o grande número de laboratórios e a rapidez dos seus progressos no trabalho preparatório da aplicação da engenharia genética ao homem, permitem-lhe prever o seguinte calendário:

1) *Terapia génica em células somáticas* (como, por ex., células da medula óssea) começará a ser possível dentro de 5 a 10 anos. Esta terapia não afectará, evidentemente, as gerações seguintes.

2) *Terapia génica em células da linha germinal masculina* poderá começar a praticar-se dentro de 5 a 15 anos. Neste caso, o que se pretende é a modificação génica das espermatogónias por meio dos citados vírus artificiais.

Os dois citados tipos de terapia génica poderão ainda, um dia, vir a ser combinados com as técnicas de cirurgia fetal e de fertilização *in vitro* que também avançam rapidamente.

3) *Engenharia genética de melhoramento* não será possível iniciar-se em menos de 20 ou mais anos. Neste caso não se trata já de terapia duma enfermidade hereditária mas de conseguir que uma característica se manifeste em grau acentuado (como, por exemplo, maior tamanho e força muscular para um jogador de futebol). Muito mais se terá de conhecer acerca dos genes humanos até se estar seguro que essas alterações não vão perturbar o metabolismo celular e o equilíbrio do organismo.

4) *Engenharia genética eugénica* não será exequível nos próximos 50 ou mais anos. Um plano de melhoramento genético da humanidade tem numerosas objecções e dificuldades.

Objecções que lhe vêm do ensinamento biológico de que a diversidade genética é a estratégia evolutiva a favor da sobrevivência das espécies, e também das inúmeras explorações sociais que poderiam provir da capacidade de controlar, mesmo que só muito pontualmente, a evolução da nossa espécie.

Além disso, do ponto de vista tecnológico, perde-se no tempo o dia em que o conhecimento biológico do homem seja tão completo que permita uma decisão consciente sobre a sua evolução futura.

No entanto notemos que, há 15 anos, só a ficção científica poderia, com muita imaginação, sonhar com engenharia genética. E se, há 10 anos, tivéssemos dito ao mais optimista dos geneticistas que em 1983 seria fornecida a diabéticos insulina humana produzida por bactérias, ele certamente nos responderia com um sorriso céptico.

Igualmente, a aplicação de alguma engenharia genética ao homem não estará talvez tão longe de nós como por vezes se pensa.

## BREVE VISITA À CONVERSÃO GÉNICA

A. Madeira Lopes

As leveduras dos géneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, e outros fungos ascomicetas, como *Neurospora* e *Sordaria*, têm-se revelado particularmente convenientes para o estudo da recombinação quer recíproca, quer não-recíproca (conversão génica). A escolha destes organismos deve-se não só à facilidade da sua manipulação laboratorial e de obtenção de mutantes experimentais, como ainda à formação de esporos meióticos sequestrados em sacos especiais (Brotéria Genética 2, 83-84; 1981).

Já em 1953 tinha Lindegren mostrado que a capacidade, ou incapacidade, de fermentar  $\alpha$ -metil-glucosido em *Saccharomyces cerevisiae* segregava, por vezes de 3:1 ou de 1:3 (J. Genet. 51, 625-637; 1953). Esta descoberta foi encarada com cepticismo e só conseguiu ser mais geralmente aceite após a publicação dum trabalho realizado por Mitchell em *Neurospora crassa* (Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A. 41, 215-220; 1955): utilizando marcas genéticas localizadas dum e doutro lado do gene em estudo, encontrou ela uma segregação de 3:1 (conversão de mutantes auxotróficos para a piridoxina, enquanto que nos genes vizinhos as proporções eram de 2:2 (recombinação recíproca).

Experiências posteriores de Roman (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21, 175-183; 1956) e mais recentemente de Fogel e Mortimer (Proc. Nat. Acad. Sc. U. S. A. 62, 96-103; 1969) vieram apoiar a hipótese de que a transferência de informação entre os dois alelos, num ou noutro sentido, isto é de mutante para selvagem ou de selvagem para mutante, se efectua duma maneira precisa, excluindo a ocorrência de mutação no mecanismo da conversão génica.

Contrariamente a Loprieno e Schüpbach (Molec. Gen. Genetics 110, 348-354; 1971) que observaram diminuição pela cafeína da frequência de recombinantes intergénicos em *Schizosaccharomyces pombe*, foi por nós encontrado, em *Saccharomyces cerevisiae*, que esse efeito somente se dava na recombinação heteroalélica — preferencialmente não-recíproca, mas não na recombinação intergénica preferencialmente recíproca (M. Sc. Thesis, Univ. Washington; 1971), o que sugeria diferentes mecanismos recombinatórios. Destes resultados, os respeitantes a conversão génica mitótica, em que a detecção da recombinação era feita pela análise de colónias sectorizadas (vermelhas e brancas), assim como os de

Roman com material análogo (Genetics Lectures 2, 43-59; 1971), refutavam implicações dos modelos de Holliday (Genet. Res. 5, 282-304; 1964) e de Whitehouse (Towards an Understanding of the Mechanism of Heredity, E. Arnold; 1969). Propunham estes a formação obrigatória de áreas de DNA híbrido não complementar, que seriam reparadas por um mecanismo de excisão, altamente eficiente, estimulado pela própria natureza híbrida dos pares de bases.

Nova luz foi recentemente lançada sobre a interpretação das observações respeitantes à conversão génica. Munz e colaboradores verificaram que, ao invés do que se tinha encontrado em *Saccharomyces*, haveria casos, em *Schizosaccharomyces*, de alta frequência de conversão intergénica; este resultado vem desfazer a discrepância aparente descrita no início do parágrafo anterior. Além disso, a transferência de informação, observada entre genes repetidos de tRNAs, dar-se-ia mesmo que esses genes estivessem localizados em cromossomas diferentes (Nature 300, 225-231; 1982). Fenómenos semelhantes ocorreriam noutros genes repetidos de eucariontes superiores (Nature 299, 11-117; 1982) e eventualmente de arqueobactérias (Nature 295, 384-389; 1982 e Nature 299, 182-185; 1982). Para uma definição de arqueobactérias consultar Brotéria Genética 2, 13-14; 1981).

É possível que a conversão génica esteja ainda na base de acontecimentos recombinatórios de mamíferos (Nature 300, 216-217; 1982) onde os genomas de sequências repetidas parecem também constituir uma fracção apreciável do DNA.

De qualquer modo, a conversão teria duas consequências importantes alternativas: gerar diversidade em sequências nucleotídicas a partir de genomas mutados; ou produzir homologia de sequências. O efeito dependeria dos valores relativos da taxa de mutação e da taxa de conversão.



## O DEBATE EUROPEU SOBRE ENGENHARIA GENÉTICA

Luís J. Archer\*

Universidade Nova de Lisboa e Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras)

## ABSTRACT

The present review summarizes the european aspects of the controversy on recombinant DNA research. In the first part, the scientific, regulatory, legal, and socio-political factors are considered, which brought about the controversy on the potential biohazards of genetic engineering. In a second part, the evolution of the same factors is described as leading to the end of the debate. In the last part, the second generation problems are mentioned, with emphasis on the ethical issues connected with application of recombinant DNA to genetic change in humans.

## INTRODUÇÃO

O primeiro alarme contra a engenharia genética, a nível mundial, foi lançado num telefonema de Robert Polack a Paul Berg, depois de uma colaboradora deste ter anunciado, num Congresso havido durante o Verão de 1971, a possibilidade e a intenção de integrar o DNA do vírus animal SV40 no cromossoma de *Escherichia coli* (WATSON e TOOZE, 1981). O complexo fenómeno sócio-científico que, a partir daí se desenvolveu nos Estados Unidos tem sido abundantemente descrito (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1975-1978 e 1977-1982; BEERS e BASSETT, 1977; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977; BOYER e NICOSIA, 1978; MORGAN e WHELAN, 1979). Particularmente completo e bem documentado, em mais de 600 páginas, é o livro recente de WATSON e TOOZE (1981).

Nesta revisão, restringimo-nos fundamentalmente aos aspectos europeus. E pode dizer-se que o problema foi tomado a sério pela primeira vez na Europa em face da Carta Moratória de BERG e colabs. (1974). As primeiras reacções

\*Representante de Portugal na «European Science Foundation's Liaison Committee on Recombinant DNA Research» (Strasbourg).

europeias apareceram na *Nature* (STOKER, 1974) e no *MEDICAL TRIBUNE WORLD SERVICE* (1974).

A mais rápida e forte reacção organizada na Europa teve lugar na Grã-Bretanha, que foi mesmo o primeiro país do mundo onde este problema acarretou envolvimento governamental. Antes ainda da célebre conferência de Asilomar nos Estados Unidos, já estava publicado o Relatório a ser apresentado ao Parlamento inglês (ASHBY, 1975), e que deu origem às normas britânicas para experiências em engenharia genética (WILLIAMS, 1976) e à constituição dum «Genetic Manipulation Advisory Group» (GMAG) para decisão dos casos individuais.

Razões para este destacado pioneirismo britânico poderão ser várias. Mas sem dúvida influenciou decisivamente o fatal acidente ocorrido em 1973 com vírus da varíola na London School of Hygiene and Tropical Medicine.

Entretanto, começam a constituir-se, noutros países europeus, comissões nacionais encarregadas de estudar os perigos da engenharia genética e de regulamentar as suas experiências.

A nível europeu supra-nacional, três instituições desempenharam papel de relevo na evolução dos acontecimentos: a «European Molecular Biology Organization» (EMBO), a «European Economical Community» (CEE ou Mercado Comum) e a «European Science Foundation» (ESF).

A EMBO constituiu em 1976 uma «Standing Advisory Committee for Recombinant DNA Research». Esta Comissão, composta exclusivamente por biólogos moleculares, colocou-se, logo desde início, numa posição científica, e comprometeu-se a oferecer, aos governos, organizações, ou indivíduos que o pedissem, toda a espécie de informação e conselho sobre questões científicas ou técnicas relativas à engenharia genética.

A CEE também criou uma comissão encarregada de analisar os mesmos problemas, mas essa especificamente interessada nas consequências económicas da nova tecnologia e na sua regulação sobre os então 9 Estados membros. Mais concretamente, a CEE sentiu-se com a responsabilidade de:

1.º — Impedir divergências entre os Estados membros quanto às medidas de segurança.

2.º — Tentar evitar que as indústrias, quer privadas quer públicas, estivessem submetidas, nos diversos Estados-membros, a diferentes medidas regulatórias e limitações de experiências. É óbvio que tais diferenças levariam à migração de certas actividades industriais de uns países para outros, com os consequentes desequilíbrios económicos dentro da Comunidade.

Rapidamente se compreendeu que estas duas comissões— as da EMBO e da CEE — não cobriam totalmente as necessidades específicas do continente europeu.

Tratava-se de encontrar, igualmente para todos os países da Europa, o justo equilíbrio entre a aspiração, por parte dos cientistas, de máxima liberdade de investigação, e a exigência, por parte da sociedade, de condições de máxima

segurança. A comissão da EMBO, sendo exclusivamente científica, não poderia dar cobertura aos aspectos sociais do problema. A comissão da CEE, por se dirigir apenas a 9 Estados, não atingia suficientemente o conjunto da Europa.

Por isso, e já em 1975, surgiu uma proposta de países escandinavos no sentido de que o problema fosse tratado também pela European Science Foundation (ESF) — uma instituição criada em 1974 com o objectivo de promover todas as formas de cooperação intra-europeia de investigação científica e que, já nos primeiros anos de existência, mantinha relações com 16 estados europeus.

Logo no 1.º Relatório Anual da ESF (1974-75) se previu a criação de um grupo de trabalho sobre engenharia genética com o objectivo de conseguir «a common European Attitude as regards both the responsibility of the scientists concerned and the regulations which are necessary to minimize the risks of experiments combining genetic material, without preventing such scientific progress as these experiments can bring by prohibitive injunctions» (EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1974-1975).

Constituiu-se então um pequeno grupo de trabalho na ESF que preparou uma «comissão *ad hoc*» — 21 membros representando 16 países europeus, a CEE, EMBO e European Medical Research Councils (EMRC) — que reuniu em Amesterdão em 10/9/76, e cujas recomendações foram adoptadas pela Assembleia da ESF em 26/10/76 (EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1976). Foi esse o documento que constituiu e especificou o mandato da «Liaison Committee on Recombinant DNA Research» que veio a funcionar com regularidade de 1977 a 1981.

Essa «Liaison Committee» da ESF era constituída por um representante de cada um dos 11 países europeus que, ao tempo tinham comissões nacionais para engenharia genética, por um representante de cada um dos outros países que ainda não as tinham, por um jurista, por um representante da EMBO, da CEE, da EMRC e também, a título informativo, do NIH.

A mim coube-me participar nessa European Liaison Committee como representante de Portugal, e grande parte do que vou referir baseia-se no profusa documentação que circulou nas reuniões que tivemos em Estrasburgo ao longo de 4 anos.

Já no 1.º Relatório Anual da ESF (1974/75) se acentuava, a propósito do trabalho dessa comissão, que ele se deveria basear «on scientific expertise much wider than that of molecular biology alone, and should have regard to legal, philosophical and religious aspects as well as the direct implications for agriculture and health» (EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1974-75). E explicava que o contexto deste estudo se inseria na preocupação da ESF na área das «social responsibilities of scientists» (EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1974-75).

Só nesta ampla perspectiva de aspectos científicos, jurídicos e sócio-políticos se podem entender as normativas europeias sobre engenharia genética. Por isso

o presente trabalho encara separadamente estes aspectos, tanto na fase do desencadear do problema, como na da sua desdramatização.

## O DESENCADear DO DEBATE

### 1. *A previsão científica dos perigos*

Não havia então (nem há hoje) resultados experimentais que demonstrem perigos reais da engenharia genética como tal. Mas os cientistas foram os primeiros a falar em «perigos potenciais», isto é, perigos considerados como possíveis através de extrapolações baseadas em alguns dados experimentais tratados por pressupostos hipotéticos.

Poderíamos dividir os perigos em duas grandes áreas: os intencionais e os indeliberados.

Exemplo dos primeiros seria a construção programada de novos génotipos contendo combinações de genes conhecidos como produtores de elementos patogénicos, com a conseqüente criação de organismos de mais intensa acção patogénica.

Os perigos indeliberados proviriam do surgir inesperado de novos génotipos maléficos para a saúde pública ou para o equilíbrio ecológico. Um cenário frequentemente considerado nos tempos da conferência de Asilomar era, por exemplo, o seguinte. Imaginemos que, ao transferir para *E. coli* genes estranhos e inofensivos, se cotransferem também outros genes que, apesar de não se mostrarem patogénicos no hospedeiro de origem, o passam a ser no novo hospedeiro. Imaginemos, além disso, que esse novo microrganismo infecta seres humanos ou o ambiente e se transforma numa praga epidémica incontroável.

Os pressupostos destas hipóteses não estavam então cientificamente comprovados (e hoje, muitos deles estão até experimentalmente demonstrados como falsos). Aliás, logo na sua 1.<sup>a</sup> reunião em Londres (14/15 de Fevereiro de 1976) a «EMBO Standing Advisory Committee on Recombinant DNA» tinha considerado que, cientificamente a seqüência de acontecimentos acima referida era «in our opinion, very unlikely to be realized» (TOOZE, 1977).

Apesar de tudo isso, e antes que os pressupostos científicos pudessem ser testados por experiências já programadas, entravam logo em funcionamento normas regulatórias da engenharia genética e começavam a movimentar-se os aspectos jurídicos e legais do problema, com todas as conseqüências sócio-políticas.

## 2. As normas regulatórias

Em contraste com os Estados Unidos, em que o NIH programa e executa uma política científica que afecta uma população de mais de 200 milhões, a Europa confronta-se com a situação do elevado número de países, cada qual com um diferente aparelho político e administrativo de regulamentação da Ciência.

Por outro lado, são óbvios os inconvenientes económicos e sociais que poderiam provir da disparidade, entre os países europeus, da regulamentação das experiências de engenharia genética.

Por isso, já na reunião de 10/9/76 da «European Science Foundation's *ad hoc* Committee on Recombinant DNA Research» se exprimiu a preocupação de conseguir, nos vários países europeus, uma substancial uniformidade nas normas regulatórias.

Nessa altura havia só duas séries de normas: as «Guidelines» do NIH e as da Grã-Bretanha — «The United Kingdom Report of the Working Party on the Practice of Genetic Manipulation», geralmente conhecido como o «Williams Report».

A «Ad hoc Committee» da ESF fez o estudo desses dois documentos e, em conclusão, exprimiu a recomendação de que as normas britânicas fossem adoptadas para a regulação da engenharia genética na Europa (EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1976).

Apesar disso, já pouco tempo depois vários países tinham elaborado as suas próprias normas. Foi o caso da França, Alemanha, Holanda e Itália (além do Canadá, do outro lado do Atlântico), enquanto noutros países europeus se notava a tendência de preferir as normas americanas às britânicas.

Assim se chegou, rapidamente, a uma multiplicidade de «Guidelines» (nada menos que 7) diferentes na nomenclatura, na classificação das experiências, na atribuição de medidas de segurança, e nos processos administrativos da sua execução. Além disso, todas elas foram sofrendo frequentes revisões, o que ainda mais aumentou a confusão na comunidade científica.

Por reconhecer que esta multiplicidade está em parte baseada nas diferentes realidades sócio-políticas de cada país, a Liaison Committee não quis impor uma uniformidade, e considerou apenas como sua missão fomentar o diálogo aberto e continuado entre os vários representantes e, através dele, promover uma caminhada para um consenso livre ou, pelo menos, impedir que nalguns países se estabelecessem normas excessivamente estritas. Mas a decisão final foi sempre deixada a cada país, como um direito a respeitar.

### 3. Aspectos legais

Logo na 1.<sup>a</sup> reunião da Liaison Committee da ESF (Março de 1977) se sentiu a necessidade de se estudar certos aspectos jurídicos do problema.

Começou por se verificar que, para que a Liaison Committee pudesse desempenhar a sua missão teria que possuir ampla informação sobre as experiências concretas de engenharia genética que se planeiam na Europa. Por outro lado, essa informação seria certamente negada se fizesse invalidar o sigilo legalmente necessário para a obtenção de patentes por parte dos respectivos cientistas ou indústrias. Este era um primeiro problema jurídico a estudar.

A partir daí, passou a discutir-se a conveniência de que normas reguladoras fossem urgidadas por força de lei.

Julgou-se necessário que um grupo de juristas analisasse ambos os problemas e estudasse, além disso, qual a legislação já existente em cada país europeu que, como tal ou adaptada, pudesse eventualmente vincular com acção coercitiva, as normas reguladoras da engenharia genética.

Constituiu-se, por isso, uma subcomissão jurídica, presidida pelo Prof. H. L. A. Hart (Oxford) que terminou os seus trabalhos em Londres a 22/6/77. As conclusões dessa subcomissão foram apresentadas na reunião da «Liaison Committee» de 19-20 de Setembro de 1977.

Em resumo, concluiu-se existir uma forma mitigada de informação (omissa em certos pormenores experimentais) que seria perfeitamente suficiente para avaliar das condições de segurança e que, por outro lado, não faria perigar nem as exigências legais para posterior obtenção de patentes nem a prioridade de autoria.

Quanto ao outro ponto, concluiu-se que só na Grã-Bretanha e talvez na Dinamarca existia legislação capaz de fornecer base para tornar legalmente compulsória a notificação das experiências e autorização prévia de locais e pessoas para as realizar. Verificou-se, no entanto, que a maioria dos outros países (e em especial os da CEE) mostravam a vontade política de introduzir, para o efeito, nova legislação..

A Grã-Bretanha estava então a preparar-se para vincular, por força de lei, com acção coercitiva, o Williams Report, sob o «Health and Safety at Work Act», o que de facto aconteceu, com efeitos a partir do 1.º de Agosto de 1978.

Nos Estados Unidos, dois projectos-leis tinham sido apresentados nesse mesmo ano: um ao Congresso por Stagers e Rogers, e o outro ao Senado pelo Senador Robert Kennedy.

Pela mesma altura, nova legislação expressamente para engenharia genética foi proposta na Alemanha, e na Holanda, enquanto na Suécia, Áustria, Bélgica, Noruega e Suíça se planeava uma forma de utilização de legislação já existente para dar apoio legal às regulamentações da engenharia genética.

A CEE preparava-se, então, para emitir uma «Council Directive» que obrigaria cada país-membro, sob pena de sanções, à notificação das experiências e à aprovação prévia das comissões nacionais.

#### 4. *Consequências sócio-políticas*

A multiplicidade e diversidade das «Guidelines» nos diversos países europeus mostra, já por si, que essas normas não se baseavam exclusivamente em dados científicos objectivos. Há, na realidade, factores sócio-políticos que se foram adensando em torno do problema.

Aos cientistas encarregados de redigir a 1.<sup>a</sup> versão das Guidelines do NIH foi recomendado que fossem exigentes e restritivos nas suas normas, pois que assim se mostrariam socialmente responsáveis, capazes de autodomínio, e dotados de atitude científica desinteressada. Foi-lhes dito que deste modo evitariam que sobre eles viessem a cair normas e legislações oriundas de sectores não-científicos (SZYBALSKI, 1979).

Assim fizeram. E só depois verificaram que o resultado final foi muito diferente do previsto. Normas estritas foram entendidas como «prova» dos perigos, e tiveram o efeito de persuadir o grande público de que não se tratava de hipóteses mas de certezas; que os perigos não eram só «potenciais» mas reais.

Em resumo, o tratamento de hipóteses científicas pelos aparelhos regulatório, jurídico, e de meios de comunicação, desencadeou um fenómeno sócio-político que se foi tornando num misto de pânico, contestação e exploração.

Com a especialização, tecnicização e êxitos da ciência, no último século, acrescidos da mentalidade do «magister dixit», o grande público criou para o cientista o mito do «sábio», que jamais se desdirá porque nunca erra, uma vez que as suas conclusões são baseadas nos «factos» das «ciências exactas», que o grande público sabe não poderá entender totalmente, mas em que acredita cegamente.

Em vez de gradualmente desmitificar este endeusamento do sábio, os cientistas tiveram a inconsciência de lançar subitamente para o grande público perguntas para as quais ainda não tinham resposta. Deste modo, a sua actuação em vez de ser formativa, gerou a confusão. E porque se tratava de questões apresentadas como podendo afectar a sobrevivência humana, essa confusão transformou-se em pânico.

A previsão de perigos reais que o público julga saber controlar (como desastres de viação) não costuma gerar pânico. Este provém mais dos perigos, como os da engenharia genética, cuja natureza e controlo são desconhecidos. A compensação psicológica da incerteza científica é então baseada em regulamentações e moratórias, que passam então a satisfazer a necessidade psicológica de controlo.

Na Holanda, por ex., a Comissão para engenharia genética elaborou e publicou «Guidelines» mais rigorosas que as do NIH e entregou-as ao Governo. Diferenças de opinião entre os membros do Governo atrasaram uma decisão sobre o assunto. A situação complicou-se com a publicação dum relatório alternativo, elaborado por um grupo da Universidade de Amesterdão, que propôs uma política científica diferente e uma moratória até que essa política científica fosse implementada.

O governo decidiu criar uma nova comissão com funções mais gerais, e manter a comissão já existente mas com novas funções. O resultado final desta situação foi impedir durante muito tempo o começo de investigações nesta área e criar um mal-estar considerável, propício à exploração política.

Na Grã-Bretanha surgiram também problemas sérios de cooperação entre a Indústria e o GMAG sobretudo a partir da relutância da Indústria em cumprir com a notificação das experiências, que julgavam poderia prejudicar o seu poder de competição no mercado.

Entretanto, ao Parlamento do Conselho da Europa subiu uma moção em que os proponentes se confessavam alarmados pelas consequências éticas e humanitárias da investigação sobre DNAs híbridos (COUNCIL OF EUROPE, 1978).

O problema tinha-se tornado mais político do que científico. E por isso mesmo, em vários países, as comissões de regulação da engenharia genética passaram a ser constituídas não só por cientistas mas também e maioritariamente por representantes da sociedade, do governo, dos sindicatos e dos principais partidos políticos. Ainda hoje isso sucede, por exemplo na Suécia.

A partir daqui o problema da engenharia genética entra facilmente num contexto de luta de classes, tanto mais que ele tem várias das características convenientes a uma arma política: cientificamente obscuro e controverso; capaz de sensibilizar fortemente as populações e de polarizar velhas reacções anti-ciência e anti-técnica; o povo será a vítima dos cientistas, que lançaram o problema mas não querem tomar a responsabilidade do que acontecer.

E, de facto, deu-se alguma exploração política da engenharia genética mesmo em países europeus, e bem nitidamente na Grã-Bretanha e Holanda.

## A DESDRAMATIZAÇÃO

### 1. *Testes experimentais de risco*

Enquanto sobre hipóteses de riscos potenciais se ia construindo todo esse processo administrativo, jurídico, social e político, os investigadores realizavam em laboratórios de máxima segurança (P4), experiências especialmente desenhadas para testar em que medida os pressupostos hipotéticos que baseavam as previsões de risco eram ou não verdadeiros.



Os principais desses pressupostos poderão resumir-se do seguinte modo:

1.º — Ao introduzir DNA estranho em bactérias (nomeadamente *E. coli*) poderá causar-se involuntariamente um aumento da sua virulência natural e patogenicidade.

2.º — Por descuidos no laboratório, essa ou outra bactéria (de modo especial a mais frequentemente utilizada como receptora em engenharia genética: *E. coli* K<sub>12</sub>) poderia colonizar no corpo humano e originar uma perigosa epidemia.

3.º — Genomas de vírus patogénicos clonizados em bactérias poderão tornar patogénicos esses organismos, alargando assim perigosamente a capacidade infecciosa desses vírus.

4.º — Em todos estes e outros casos, o perigo da engenharia genética reside em construir novos organismos que não mais deixarão de se multiplicar, e poderão competir vantajosamente com os tipos selvagem.

5.º — Se bactérias produzindo polipeptídeos eucarióticos colonizarem no corpo humano, graves riscos poderão daí advir.

Foram estas e outras as hipóteses testadas através dos chamados «risk assessment experiments» realizados nos Estados Unidos e também na Europa (sobretudo no laboratório P<sub>4</sub> da EMBO em Heidelberg) e de que resultou uma massa considerável de resultados, de que vamos apenas citar os mais salientes.

1.º — O «Falmouth Risk-Assessment Workshop» (Junho de 1977) apresentou uma grande variedade de resultados experimentais (RISK ASSESSMENT, 1977) que mostram que é praticamente impossível aumentar a virulência natural por adição ao acaso de fragmentos de DNA, e que patogenicidade é o resultado final da combinação complexa de uma variedade de mecanismos dotados de regulação fina.

2.º — O mesmo Workshop apresentou dados que demonstram que é sumamente improvável que *E. coli* K<sub>12</sub> pudesse ser convertida numa estirpe patogénica, e isto por 3 razões: por falta de capacidade de colonização no corpo humano, de virulência, e de comunicabilidade dos seus plasmídeos.

As últimas palavras da discussão final desse Workshop foram as seguintes, proferidas pelo Dr. Sherwood Gorbach: «All participants have had an opportunity to comment on Dr. Fornal's statement concerning the lack of epidemic potential for *E. coli* K<sub>12</sub>. In the absence of any expressed disagreement, I believe we have a consensus on this issue. (No further comments from the participants)» (RISK ASSESSMENT, 1977).

Certas dúvidas expressas durante este Workshop acerca da possibilidade da transferência de vectores plasmídicos de *E. coli* K<sub>12</sub> para outras bactérias intestinais foram clarificadas por estudo de mais de 2 anos (PETROCHEILOU

e RICHMOND, 1977) em que essa transferência não se verificou sob condições laboratoriais normais, mesmo usando os plasmídeos mais perigosos. Conclusões semelhantes foram apresentadas por Holliday (1977).

3.º — Programas de «Risk Assessment» da EMBO e do NIH chegaram a importantes conclusões acerca da não-infectividade de genomas virais quando clonizados em plasmídeos.

O genoma completo do vírus políoma foi covalentemente integrado no plasmídeo pBR322 e também no genoma de fagos derivados de  $\lambda$ . Estes plasmídeos quiméricos foram fornecidos a fibroblastos de murganho, em condições em que, na amostra controlo, um só vírus políoma nativo ou o seu DNA infectam eficientemente as células, com conseqüente produção de novos vírus.

Nessas condições, os plasmídeos quiméricos contendo um genoma completo do vírus políoma não se mostraram infecciosos, apesar de a subsequente excisão artificial desses genomas virais lhes ter restituído a sua infecciosidade normal (FRIED e colabs., 1979).

Só plasmídeos quiméricos contendo dímeros (duas cópias do genoma viral na mesma orientação) revelaram infecciosidade que, no entanto, foi apenas de cerca de 10 % da do vírus original. Mas estes plasmídeos tendem a ser instáveis (FRIED e colabs., 1979).

Estes resultados, obtidos no âmbito do programa da EMBO foram confirmados por outros realizados no NIH, e em que o DNA do vírus políoma foi clonizado na estirpe *E. coli*  $\chi$ 1776. Também neste caso, só dímeros se mostraram biologicamente activos quando injectados em animais (ISRAEL e colabs., 1979; CHAN e colabs., 1979).

4.º — Uma grande variedade de dados experimentais (incluindo muitos apresentados no Falmouth Workshop revelam que plasmídeos quiméricos se perdem com particular facilidade se não forem cultivados em condições altamente selectivas, e que não é sempre fácil manter patogenicidade em condições laboratoriais.

5.º — Em Abril de 1980 realizou-se em Pasadena, Califórnia um outro «Risk Assessment Workshop» referente aos riscos que poderiam estar associados a bactérias *E. coli* K<sub>12</sub> produtoras de polipeptídeos eucarióticos biologicamente activos (como hormonas e outros). O Workshop concluiu que «risk to the individual were minimal» (NIAID, 1980).

O conjunto dos resultados obtidos por «Risk Assessment Experiments» (e em especial os referidos no n.º 3) demonstram que a engenharia genética é uma tecnologia que minimiza consideravelmente os perigos naturais de elementos patogénicos (STETTEN, 1979).

Daí o protesto contra a anomalia, praticada durante muitos anos, de exigir maiores cautelas e restrições no uso de genomas de vírus patogénicos integrados em plasmídeos bacterianos do que na utilização dos próprios vírus.

## 2. Presente e futuro das regulamentações

A medida que se iam acumulando os resultados dos «risk assessment experiments» e que foi aumentando a lista de organismos entre os quais se conhece troca espontânea de material genético, começaram todas as «Guidelines» a ser repetidamente revistas, e as medidas de segurança a serem progressivamente reduzidas.

Na sua última versão, as «Guidelines» do NIH datam de 27 de Agosto de 1982, e estão profundamente simplificadas. Muitas experiências que anteriormente requeriam aprovação prévia e grau de contenção que podia ir até P3, permite-se agora que sejam iniciadas simultaneamente com notificação e usando apenas condições de boa prática microbiológica. As experiências proibidas diminuíram. Praticamente todas as experiências de engenharia genética em *E. coli* estão isentas de ser registadas (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1982).

A Dinamarca, Irlanda, Jugoslávia, Noruega, Suécia e Suíça seguem esta última versão das «Guidelines» do NIH e adoptarão os seus futuros abrandamentos. Na Holanda as normas agora revistas também se aproximam muito das actuais do NIH.

Na Grã-Bretanha a última versão das «Guidelines» data de Junho de 1981. Todas as experiências que não envolvam organismos patogénicos (incluindo as que utilizam como vectores vírus eucarióticos defectivos) e que não conduzam à produção de toxinas podem ser executadas usando apenas o nível mais baixo de contenção, que corresponde aos cuidados normais em técnicas microbiológicas, e não precisam de ter autorização prévia do GMAG. Apenas devem registar-se as experiências nas comissões locais de segurança, as quais deverão anualmente, enviar a lista completa ao GMAG.

Na República Federal da Alemanha a última revisão das Normas entrou em vigor em 7 de Agosto de 1981. As experiências catalogadas nas duas classes mais baixas também não precisam de ser previamente aprovadas pela Comissão Central.

Em resumo, a vasta maioria das experiências de engenharia genética que actualmente se realizam são permitidas em condições que apenas exigem o cumprimento das regras de boa prática microbiológica.

Já em 1979 o NIH julgava que o tempo que tem dispendido com a revisão dos perigos potenciais da engenharia genética era desproporcionado em comparação com o dispensado a perigos reais de outros tipos.

Já há anos o presidente do NIH, Dr. Fredrickson, exprimiu publicamente a esperança e o desejo de ver abolidas todas as «Guidelines» para engenharia genética. Esta atitude é partilhada por uma forte corrente de cientistas (MORGAN e WHELAN, 1979).

Num futuro próximo as normas que restarem ficarão provavelmente englobadas, como um pequeno capítulo, nas directrizes gerais de segurança em experimentação biológica e, em particular, no tratamento de materiais patogénicos e produção de toxinas.

### 3. Aspectos jurídicos

Actualmente, em nenhum país da Europa as Normas da engenharia genética têm propriamente estatuto legal. No entanto, o registo das experiências é compulsório na Holanda e no Reino Unido debaixo de regulamentações a leis vigentes. Na Suécia, aditamentos a leis previamente existentes regulam o controlo da experimentação em engenharia genética.

Devido a este ambiente geral de abrandamento das normas e de abandono de compulsão jurídica, e também devido às pressões exercidas pela Comissão da ESF, a CEE transformou a sua «Council Directive» (de que falámos antes) numa «Recommendation». Isto significa que não obriga os países-membros ao seu cumprimento, nem a sua inobservância poderá ser punida.

### 4. O ambiente socio-político

Ao longo dos 3 ou 4 últimos anos a exacerbação socio-política no seu triplo aspecto antes citado — pânico das populações, contestação social e exploração política — foi baixando progressivamente e, na maior parte dos países, pode já considerar-se um problema ultrapassado.

Este rápido progresso deve-se, em grande parte, à inteligente actuação de muitas comissões nacionais e locais (reconhecidamente, nos Estados Unidos das «Institutional Biosafety Committees: IBS») e também de organizações internacionais como a EMBO e a ESF.

No fim de quase todas as reuniões da «Liaison Committee» da ESF emitiam-se curtos comunicados que eram divulgados na Imprensa e tinham sido redigidos no sentido de fomentar a possível e solidamente justificada desdramatização do problema.

Igualmente importante foi o fomentar de Workshops e outras amplas reuniões internacionais como, por ex., a COGENE Conference em Wye (Grã-Bretanha) em Abril de 1979 (MORGAN e WHELAN, 1979).

A última e talvez a mais importante actuação da «Liaison Committee» da ESF no sentido de desdramatizar o problema foi a sua decisão, tomada na reunião de 15 de Janeiro de 1981 e posteriormente aprovada pela Assembleia Geral da ESF, de considerar concluídos os seus trabalhos. Talvez seja de interesse citar, na íntegra, o comunicado final desta última reunião:

«The ESF Liaison Committee on Recombinant DNA, at its meeting on 14-15 th January, 1981, unanimously decided that its work of promoting the necessary harmonisation of national recombinant DNA guidelines is now sufficiently complete for the Liaison Committee to be wound up.

Although the national guidelines of some countries are still evolving towards the position already reached by others, the Committee believes that there is no further need for formal and regular liaison at the ESF between representatives of national recombinant DNA committees. Extensive information supports the view that recombinant DNA work entails no significant novel biohazards. This is already accepted by some national recombinant DNA committees and in those countries special safety precautions beyond good microbiological practise are no longer required for recombinant DNA work except when known pathogens or toxin producing organisms are involved; it is widely accepted that recombinant DNA techniques offer safer ways of studying and using pathogens and toxin producers than conventional methods. The Liaison Committee endorses these national decisions.

In several countries microorganisms produced by recombinant DNA methods are now being grown on an industrial scale and concern has been expressed about the biosafety of these large scale operations. The Liaison Committee points out that the fermentation industry already has long and extensive experience of large scale fermentation, including that of known natural and dangerous pathogens. Consistent with its statements in the preceding paragraph the Committee emphasises that the large scale fermentation of microorganisms produced by recombinant DNA methods does not pose novel or special problems.

Finally, the Liaison Committee reaffirms its opinion that there is no scientific justification whatsoever for legislation specific for recombinant DNA research and moreover, it sees no justification for further extensive recombinant DNA risk assessment programmes» EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1981).

Os «perigos» da engenharia genética foram desdramatizados, e o debate está praticamente encerrado. Por isso se escreveu já um livro que recolhe cuidadosamente os documentos e os entrega à História; livro que se autodefine como um epitáfio a esta bizarra fase da biologia (WATSON e TOOZE, 1981). Por isso também se tenta uma análise filosófica e psicológica do fenómeno humano que esse debate significou, explicando-o não em termos de perigos objectivos mas do condão de acordar velhos mitos, entretecidos de monstros e castigos, e que se inserem nas profundezas da angústia humana (JACOB, 1982).

Vencido o medo, a engenharia genética avança agora ao ritmo das suas enormes potencialidades, e em benefício da bio-industrialização e da melhoria da qualidade de vida. Já há centenas de firmas industriais a investir em engenharia genética. Quase 100 patentes foram já registadas nesta área científica nos últimos 3 anos. Nalguns países, como Dinamarca e Alemanha, já a engenharia genética é reconhecida como a primeira prioridade para subsídios de investigação biológica. Para o fim do século estará em curso uma revolução bio-industrial com todas as suas consequências, e o homem ver-se-á em condições técnicas de tomar importantes decisões sobre o futuro da vida e da genética humana.

Com este avanço tecnológico e com uma mentalidade pública já libertada da obsessão de perigos imaginários, começa agora a despertar-se para uma nova série de problemas, bem mais reais que os anteriores. Citemos alguns.

1.º — A introdução *deliberada* no ambiente de organismos construídos por engenharia genética. Até que ponto, por exemplo, o conhecimento actual dos sistemas ecológicos naturais pode ou não pode apoiar a construção de sistemas ecológicos artificiais que sejam benéficos para a condução da evolução futura da vida?

2.º — Desequilíbrios demográficos entre cientistas das Universidades e da Indústria. Êxodo de investigadores (incluindo Prémios Nobel) das Universidades para os laboratórios da Indústria. Problemas criados por cientistas que estão simultaneamente em ambos os tipos de Instituição, quanto à impossibilidade de publicação rápida e discussão livre, na Universidade, de resultados científicos obtidos sob contracto da Indústria. Temas aplicados da Indústria impróprios para teses de doutoramento. Problemas de financiamento para a Universidade quando descobertas feitas no seu Campus são objecto de direitos exclusivos da Indústria.

3.º — Os graves desequilíbrios económicos que poderão ser desencadeados a nível internacional. Como ciência de ponta, a engenharia genética exige investimentos muito elevados em investigação básica e aplicada e, também, na conversão das tecnologias produtivas. O seu desenvolvimento vai ser muito desigual de país para país, conforme o nível tecnológico de cada um, ao mesmo tempo que o poder de competitividade dos respectivos produtos será elevado. Há perigo de novos monopólios tecnológicos. Rapidamente se criarão profundas alterações na repartição económica, na produção de muitos bens, na sua transformação, transporte, troca e custo, assim como na distribuição de postos de trabalho.

Além disso, há que evitar formas de neo-colonialismos industriais. Há já

grandes investimentos de Companhias americanas para custear indústrias de engenharia genética em Jerusalém, Índia, Coreia do Sul e outros países.

4.º — Os problemas éticos resultantes da possível aplicação da engenharia genética ao homem. Estes problemas são particularmente agudos. O primeiro alerta foi lançado numa conferência internacional no Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, Mass.), em Julho de 1979, sobre «Faith, Science and Future» organizada pelo Conselho Mundial das Igrejas (ABRECHT, 1980).

Já em 1980 o debate se iniciou na Suécia e na Holanda. Neste último país, estabeleceu-se mesmo uma Comissão especificamente para este tema.

Nos Estados Unidos, Martin Cline tentou em 1980 aplicar engenharia genética a dois pacientes de  $\beta$ -talassémia. Essas experiências não resultaram, e foram criticadas como prematuras, mal preparadas e não devidamente autorizadas (WADE, 1980). Entretanto, e por pressões do «National Council of the Churches of Christ» (USA) a «Presidential Commission for the Study of Ethical Problems in Medicine and Biomedical Behavioral Research» (USA) desencadeou, em 12/7/80 um estudo preliminar sobre problemas éticos envolvidos na aplicação da engenharia genética ao homem. No final de 1982 essa Comissão propôs a criação dum grupo especial para o estudo e controlo desses problemas. Esse grupo ficará provavelmente ligado ao Congresso americano através da sua «Science and Technology Committee», e não será dominado por cientistas. Além destes, o grupo incluirá representantes do Governo, da Indústria, de agremiações religiosas e do público em geral.

Os problemas éticos mais difíceis não se referem tanto à possibilidade, cada vez mais próxima, de aplicação da engenharia genética à terapia de genes humanos, mas sobretudo aos abusos possíveis no que se refere ao «melhoramento»(?) da espécie humana ou à deliberada construção de indivíduos sub-humanos que eventualmente pudessem ser mais docilmente utilizados numa espécie de neo-escravatura.

Em Janeiro de 1982 também a Assembleia Parlamentar do Conselho da Europa emitiu uma recomendação (COUNCIL OF EUROPE, 1982) que, em parte, se refere a esses problemas éticos. Reconhecem-se as condições que legitimam a modificação genética de seres humanos quando se tratar de verdadeira terapia, apesar de implicitamente se confessar a dificuldade em claramente delimitar, nos casos concretos, até onde vai o conceito duma verdadeira terapia.

Com excepção dessas situações, a Recomendação faz a estranha proposta de que seja explicitamente inscrita na Convenção Europeia dos Direitos Humanos o direito a receber, hereditariamente, um material genético que não tenha sido artificialmente alterado. Propõe ainda «Guidelines» que protejam os indivíduos contra aplicações não terapêuticas da engenharia genética. A Recomendação foi enviada ao Comité de Ministros do Conselho da Europa, aos governos dos países membros e à European Science Foundation.

O Papa João Paulo II também pronunciou, sobre o assunto um discurso na Academia Pontifícia de Ciência ao encerrar, no dia 23 de Outubro de 1982, uma semana de estudos que congregou os melhores cientistas mundiais nesta área. A dominante desse discurso (L'Osservatore Romano, 23/10/82) foi o elogio da moderna experimentação biológica que virá a contribuir para a cura genética de doenças hereditárias e para o bem geral do homem, mas acentuou que deverá ser para o seu bem integral, e condenou como exploração da pessoa humana aquilo que designou como manipulação experimental de embriões humanos.

Um bom número de grupos internacionais trabalham activamente no esclarecimento destes problemas de bioética. Entre eles destaco, por razões de conhecimento directo, o «Kennedy Institute of Ethics» (Washington, D.C.) e o «International Working Group on Bioethics» (com sede em San Cugat del Vallès, Barcelona).

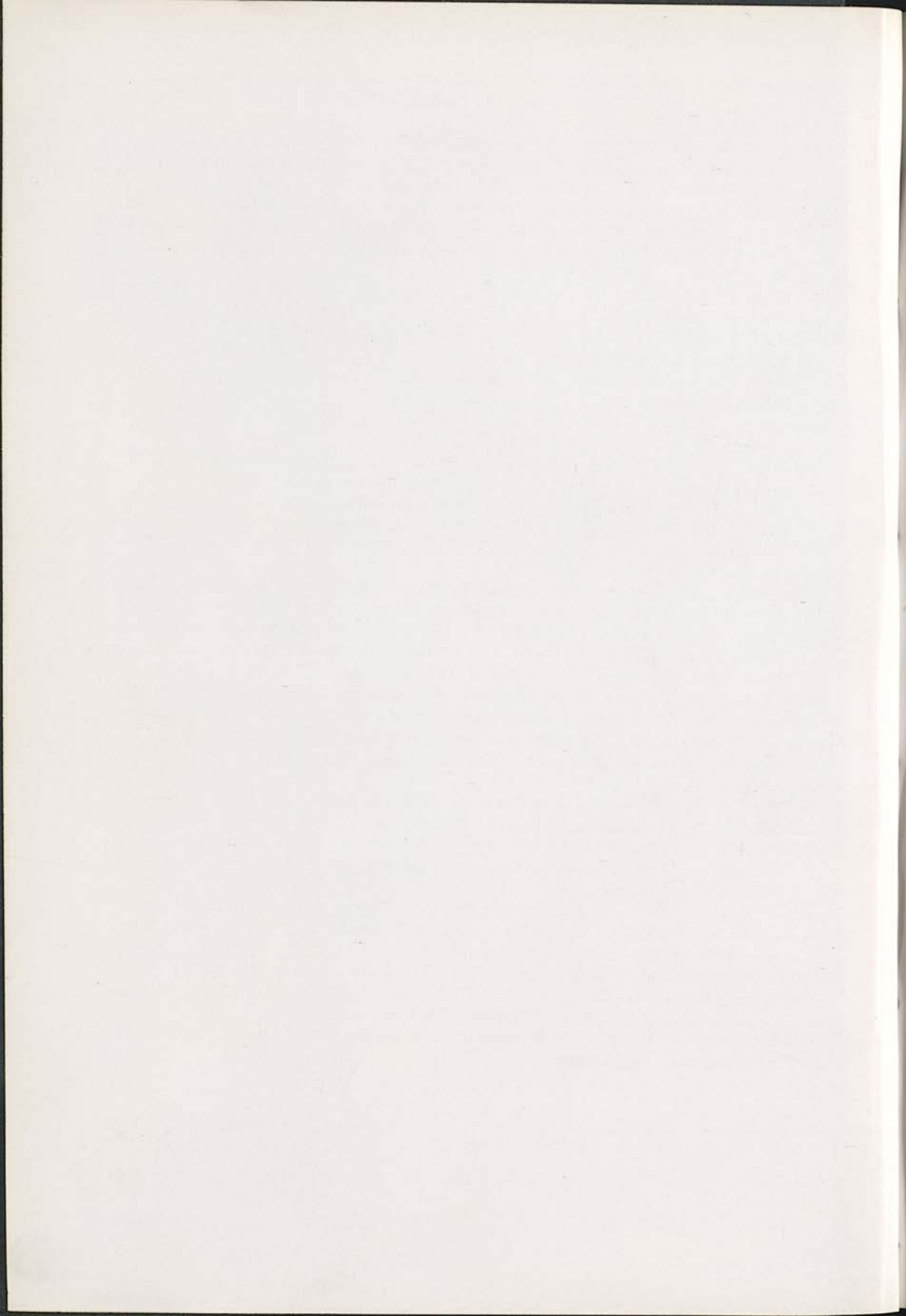
Por toda a parte domina a preocupação de não cair nos mesmos erros que se cometeram na primeira fase do debate, referida no início desta revisão. Nota-se, por isso, a preocupação de evitar declarações públicas prematuras, de impedir experiências abusivas que pudessem despertar a oposição pública contra progressos legítimos, e de fornecer adequada informação científica aos moralistas, filósofos, e pensadores, de modo a provocar um adequado repensar da ética religiosa e social que leve a evitar controvérsias desnecessárias.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABRECHT, P., 1980 — Faith and Science in an Unjust World, Report of the World Council of Churches' Conference on Faith, Science and the Future, vol. 2, World Council of Churches, Geneva.
- ASHBY, 1975. — Report of the Working Party on the Experimental Manipulation of the Genetic Composition of Micro-Organisms, HMSO Cmnd. 5880, London.
- BEERS, R. F. e E. G. BASSETT (ed.), 1977 — Recombinant Molecules: Impact on Science and Society, Raven Press, N.Y.
- BERG, P., D. BALTIMORE, H. W. BOYER, S. N. COHEN, R. W. DAVIS, D. S. HOGNESS, D. NATHANS, R. ROBLIN, J. D. WATSON, S. WEISSMAN e N. D. ZINDER, 1974 — Potential biohazards of recombinant DNA molecules, *Science* 185: 303; e *Proc., Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2593-2594.
- BOYER, H. W. e S. NICOSIA (ed.), 1978 — Genetic Engineering, Elsevier/North-Holland.
- CHAN, H. W., ISRAEL, M. A., GARON, C. F., ROWE, W. P., & MARTIN, M. A., 1979 — Molecular Cloning of Polyoma Virus DNA in *Escherichia coli*: Lambda Phage Vector System, *Science* 203: 887-892.
- COUNCIL OF EUROPE, 1978 — Motion for a Recommendation on Research Concerning DNA Hybrids (Manipulation of Genes), Doc. 4173, 28/4/78, Strasbourg.
- 1982 — Recommendation 934 (1982) on Genetic Engineering from the Parliamentary Assembly, Strasbourg.
- EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION, 1974-1975, — First Annual Report, 1, Quai Lesay Marnesia, 67 000 Strasbourg.



- 1976 — Recommendations Concerning Recombinant DNA Research, Strasbourg.
- 1981 — Draft Minutes of the 6th Meeting of the ESF Liaison Committee for Recombinant DNA Research, Strasbourg.
- FRIED, M., KLEIN, B., MURRAY, K. GREENAWAY, P., TOOZE, J., BOOL, W., & WEISSMANN, C., 1979 — Infectivity in mouse fibroblasts of polyoma DNA integrated into plasmid pBR322 or lambdoid phage DNA, *Nature* 279: 811-816.
- HOLLIDAY, R., 1977 — Should genetic engineers be contained? *New Scientist* 73: 399-401.
- ISRAEL, M. A., CHAN, H. W., ROWE, W. P. & MARTIN, M. A., 1979 — Molecular Cloning of Polyoma Virus DNA in *Escherichia coli*: Plasmid Vector System, *Science* 203: 883-887.
- JACOB, F., 1982. — O Jogo dos Possíveis: ensaio sobre a diversidade do mundo vivo, Publ. Gradiva, Lisboa, pp. 93-97.
- MEDICAL TRIBUNE WORLD SERVICE, 1974. — Europeans Divided on *E. coli* Manipulation, *Medical Tribune* 15:3.
- MORGAN, J. e W. J. WHELAN, 1979 — Recombinant DNA and Genetic Experimentation, Pergamon Press, N.Y.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977 — Research with Recombinant DNA, An Academy Forum, Washington, D. C.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1975-1978 — Recombinant DNA Research, vol. 1-4, Office of the Director, DHEW Publications, Bethesda, Md.
- 1977-1982 — Recombinant DNA Technical Bulletin, vol. 1-5, Office of the Recombinant DNA Activities, DHEW Publications, Bethesda, Md.
- 1982 — Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules, Federal Register, 47 (167): 38048-38068.
- NIAID, 1980 — Workshop on Recombinant DNA Risk Assessment. Huntington-Sheraton Hotel, Pasadena, Cal., Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, Office of Director of NIAID, p. 5; ver também: National Institutes of Health, Office of the Recombinant DNA Activities, Recombinant DNA Technical Bulletin, 1980, vol. 3, n.º 4, pp. 195-206.
- PETROCHEILOU, V., e M. H. RICHMOND 1977 — Absence of plasmid or *E. coli* K<sub>12</sub> infection among laboratory personnel engaged in R-plasmid research. *Gene* 2: 323-327.
- RISK ASSESSMENT, 1977. — Recombinant DNA Experimentation with *Escherichia coli* K<sub>12</sub>. Proceedings from Workshop held at Falmouth, Mass. June 20-21, 1977, *J. Infect. Dis.* 137: 613-714.
- STETTEN, D. W., 1979 — Microbial Containment, *Science* 203: 1292.
- STOKER, M., 1974 — Molecular dirty tricks ban, *Nature* 250: 278.
- SZYBALSKI, W., 1979 — What Lessons does the Recombinant DNA Debate teach us. *in* Recombinant DNA and Genetic Experimentation (Morgan, J. & Whelan, W. J. eds.), Pergamon Press, N.Y., p. 224.
- TOOZE, J., 1977 — Emerging Attitudes and Policies in Europe, *in* Recombinant Molecules: Impact on Science and Society (Beers, R. F. & Bassett, E. G. eds.), Raven Press, New York, p. 469.
- WADE, N., 1980 — Human Gene Treatment Stirs New Debate, *Science* 210: 508-511.
- WATSON, J. D. e J. TOOZE, 1981 — The DNA Story. A Documentary History of Gene Cloning, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- WILLIAMS, 1976 — Report of the Working Party on the Practice of Genetic Manipulation, HMSO Cmnd. 6600, London.



## TWO NEWLY ISOLATED TEMPERATE PHAGES OF *BACILLUS SUBTILIS*

Rosa M. Fernandes\*, Hermínia de Lencastre\*\* and Luís J. Archer\*\*  
Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras; Faculdade de Farmácia de Lisboa\*  
e Universidade Nova de Lisboa\*\*

### RESUMO

Dois fagos temperados de *Bacillus subtilis* foram isolados do solo, designados IG1 e IG3, e comparados com os já descritos SP02,  $\phi$ 3T,  $\phi$ 105, SP $\beta$  e SP16. O estudo do espectro de hospedeiros, serologia, imunidade de superinfecção, e fragmentação do DNA por enzimas de restrição indica que IG1 e IG3 são fagos temperados diferentes dos já descritos.

### INTRODUCTION

Only a few temperate bacteriophages of *B. subtilis* were so far isolated and studied, but some of their derivatives proved of interest as vectors for molecular cloning in this organism (DEAN, PERKINS and ZARLEY, 1978; KREFT and HUGHES, 1981). We decided, therefore, to try the isolation, from the soil, of some more temperate phages. In the present paper we describe several properties of two newly isolated *B. subtilis* temperate viruses, which appear to be different from other known bacteriophages.

### MATERIAL AND METHODS

*Bacteria and phages.* The strains used are described in Table I. The lysogens were picked from turbid plaques with sterile toothpick and streaked on M medium plates (YEHLE and DOI, 1967).

*Isolation of new bacteriophages.* Soil samples from Parede (Cascais) and Rio Maior were treated by the method described by DEAN, FORT and HOCH (1978). As indicator strain IGCg100 (SP $\beta$  sensitive) was used. Two from the newly isolated phages (IG1 and IG3) were further studied.

*Production of IG1 and IG3 lysates.* A 25ml amount of M broth was inoculated with a single colony from the host strain IGCg100 grown on a MA

TABLE I—BACTERIAL STRAINS AND PHAGES

Strains	Relevant properties	Source
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	J. Spizizen
<i>B. subtilis</i> 17	<i>thyA thyB leu2</i>	Transformant of SB566 (Farmer and Rothman, 1965)
<i>B. subtilis</i> 12	<i>trp str<sup>r</sup></i>	O. E. Landman
<i>B. subtilis</i> W23	wild type	F. E. Young
<i>B. amyloliquefaciens</i> RUB501	Ery <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Rfm <sup>r</sup>	F. E. Young
<i>B. pumilus</i> RUB502	Ery <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Rfm <sup>r</sup>	F. E. Young
<i>B. licheniformis</i> RUB503	Ery <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Rfm <sup>r</sup> lys	F. E. Young
<i>B. licheniformis</i> 9545A	wild type	American type culture collection
<i>B. subtilis</i> SP $\beta$ <sup>s</sup>	<i>thr5 met5 leu8</i>	C. Anagnostopoulos
IGCg100	<i>thr5 met5 leu8 Str<sup>r</sup></i>	Transformant of SP $\beta$ <sup>s</sup> with <i>B. subtilis</i> 12, obtained in this Laboratory
Lysogens		
IGCg201	IGCg100 lysogenic for IG1	this Laboratory
IGCg202	IGCg100 » » IG3	this Laboratory
IGCg203	IGCg100 » » $\phi$ 3T	this Laboratory
IGCg204	IGCg100 » » SP $\beta$	this Laboratory
IGCg205	IGCg100 » » $\phi$ 105	this Laboratory
IGCg206	IGCg100 » » SP02	this Laboratory
1L4	<i>B. subtilis leuA8 metB5 thr5</i> lysogenic for SP $\beta$	D. Dean
1L6	<i>B. subtilis trpC2</i> lysogenic for SP02	D. Dean
1L8	<i>B. subtilis trpC2</i> lysogenic for SP16	D. Dean
1L11	<i>B. subtilis trpC2</i> lysogenic for $\phi$ 105	D. Dean
	<i>B. subtilis gtaA</i> lysogenic for $\phi$ 105	F. E. Young
RUB830 ( $\phi$ 3T)	<i>B. subtilis pheA trpC2 thyA</i> <i>thyB</i> lysogenic for $\phi$ 3T	C. Anagnostopoulos
Phages		
IG1	Temperate	Described in this paper
IG3	Temperate	Described in this paper
		Induced by mit. C from:
$\phi$ 3T	Temperate	RUB830
SP $\beta$	Temperate	1L4
$\phi$ 105	Temperate	1L11 and RUB813
SP02	Temperate	1L6
SP16	Temperate	1L8

plate. The liquid culture was incubated overnight at 30° C and used to inoculate 1 liter of M broth medium to yield an initial cell density of  $O.D._{600}=0.05$ . The culture was incubated with shaking at 37° C until an  $O.D._{600}=0.3$ . At this point, the phages were added at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 3. When the O.D. started declining, lysozyme was added to a final concentration of 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The culture was shaken until lysis was complete, centrifuged for 10 min at 7,000 g and filtered. At this point the titer was in the order of  $10^8$  plaque forming units (p.f.u.)/ml.

*Concentration and purification of the phage lysates.* The lysates were concentrated by ultracentrifugation (90 min at 60,000 g), and purified by discontinuous CcCl<sub>2</sub> gradient (1.3, 1.5, 1.7 g/cm<sup>3</sup>) for 4 h at 40,000 g. The other phages used in this study were obtained through induction by mitomycin C, from their lysogens. They were concentrated and purified by the procedure described above.

*Phage assay.* The two layer plating procedure (ADAMS, 1959) with M agar plates was used to assay all the phages.

*Endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis.* Phage DNAs (1  $\mu\text{g}$ ) were mixed with a site-specific endonuclease in digestion buffer, and incubated at 37° C for 3 hours. Samples were applied to 0.8 % agarose gels and electrophoresed.

## RESULTS

The newly isolated IG1 and IG3 behaved as temperate bacteriophages. They produced, on *B. subtilis* IGCg100 lawns, the turbid plaques typical of temperate phages (Fig. 1). The frequency of spontaneous mutation to clear plaques was of the order of  $4.12 \times 10^{-3}$  for IG1 and  $1.82 \times 10^{-3}$  for IG3. Stable cell lines of lysogens for each of the two phages were isolated, and showed immunity to superinfection. Both viruses were induced by mitomycin C.

In order to test whether IG1 and IG3 are new viruses, they were compared with other known *B. subtilis* temperate phages in respect to several properties.

*Host range tests* (Table II) showed that IG1 and IG3 grow on *B. subtilis* 168 but fail to infect either strain W23 or the other bacilli tested. In this respect, they are different from SP16 but indistinguishable from  $\phi 3T$ , SP $\beta$ ,  $\phi 105$  and SP02.

*Serological relatedness*, is being tested with antisera prepared against each of the phages. Results to be published indicate that IG1 and IG3 are serologically different from  $\phi 105$  and SP02 but related to  $\phi 3T$  and SP $\beta$ , as well as to each other.

*Immunity properties*, studied by plating each of the six phages on each of the six corresponding lysogens, also show (Table III) that IG1 and IG3 are

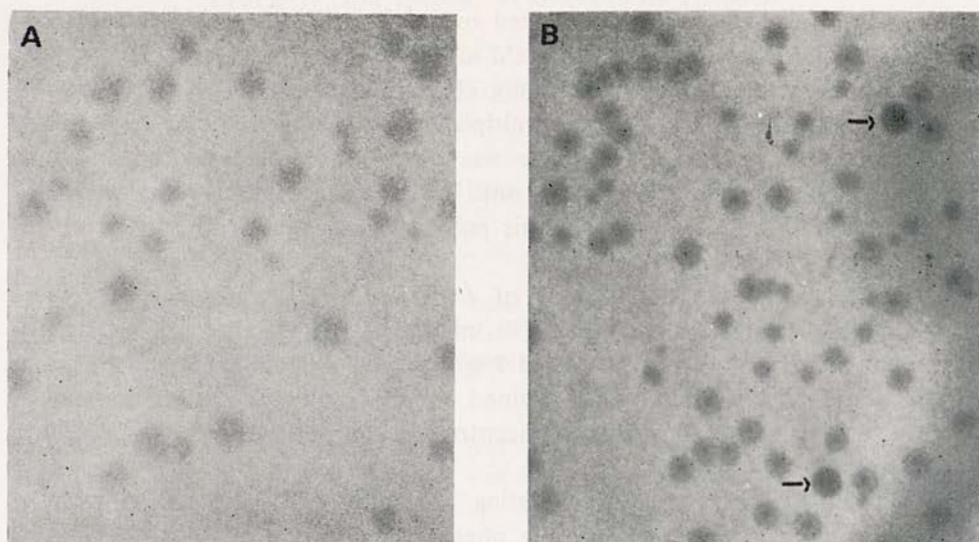


Fig. 1: (A) — IG1 turbid plaques  
 (B) — IG3 turbid plaques (the arrows indicate the clear mutant)

TABLE II — HOST RANGE OF TEMPERATE *BACILLUS SUBTILIS* PHAGES

HOSTS	PHAGES						
	IG1	IG3	$\phi$ 3T	SP $\beta$	$\phi$ 105	SP02	SP16
<i>B. subtilis</i> 168 .....	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> W23 .....	—	—	—	—	—	—	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> RUB501 .....	—	—	—	—	—	—	—(a)
<i>B. pumilus</i> RUB502 .....	—	—	—	—	—	—	+
<i>B. licheniformis</i> RUB503 .....	—	—	—	—	—	—	+
<i>B. licheniformis</i> 9945A .....	—	—	—	—	—	—	+

The hosts were overlaid onto agar plates; dilutions of a phage lysate ( $10^8$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  p. f. u./ml) were spotted on the plate. +: turbid plaques; —: no infection.

a) DEAN, FORT and HOCH (1978) report individual plaques of SP16 on *B. amyloliquefaciens* H.

TABLE III—IMMUNITY PROPERTIES OF TEMPERATE *BACILLUS SUBTILIS* PHAGES ON LYSOGENIC HOSTS

Lysogens	PHAGES (a)					
	IG1	IG3	$\phi$ 3T	SP $\beta$	$\phi$ 105	SP02
IGCg201	0	0	1.37	1.55	1.06	.40
IGCg202	0	0	1.19	1.12	2.50	.08
IGCg203	0	0	0	0	.40	0
IGCg204	0	0	.42	0	0	0
<i>B. subtilis</i> 168	+	+	+	—	+	+ (b)
IGCg205	1.84	.60	.96	0	0	.35
IGCg206	1.20	.38	.99	1.54	.52	0
IGCg100	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)	(1.00)

- a) Phages were plated on lysogens used as indicators. The values are given as plating efficiencies on the lysogens relative to the non lysogenic IGCg100.  
 b) Only spot tests were used in view of the low efficiencies of plating.  
 (+: ability to plate; —: inability to plate).

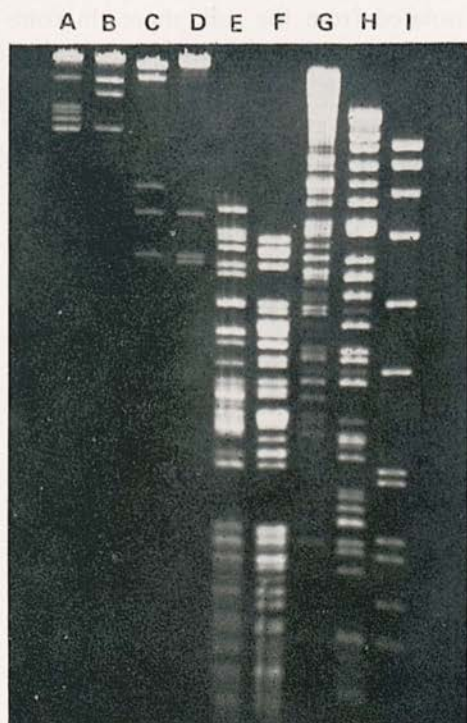


Fig. 2 — Agarose gel electrophoresis of phage DNAs digested by restriction endonucleases

- (A) IG3 DNA + *Bam* HI
- (B) IG1 DNA + *Bam* HI
- (C) IG3 DNA + *Sal* I
- (D) IG1 DNA + *Sal* I
- (E) IG3 DNA + *Hae* III
- (F) IG1 DNA + *Hae* III
- (G) IG3 DNA + *Eco* RI
- (H) IG1 DNA + *Eco* RI
- (I) SFP1 DNA + *Eco* RI  
(as standard)

clearly homoimmune to each other, but heteroimmune in respect to SP02 or  $\phi$ 105. In addition, lysogens for either IG1 and IG3 also supported good growth of  $\phi$ 3T and SP $\beta$ , showing heteroimmunity. That the reciprocal relationship was not expressed should be interpreted in the light of the other results (Table III), showing that the lysogens for  $\phi$ 3T and SP $\beta$  were poor indicators for all temperate phages. A similar result was obtained by DEAN, FORT and HOCH (1978). In addition, strain *B. subtilis* 168 (also lysogenic for SP $\beta$ ) was infected by IG1 and IG3 on spot tests.

Upon lysogenization, both IG1 and IG3 did confer thymine independence to the thymine auxotroph *B. subtilis* 17 (results not shown). In this respect they resemble  $\phi$ 3T (TUCKER, 1969) and other related phages (DEAN, *et al.*, 1976).

The restriction patterns of the DNAs from IG1 and IG3 were also compared, using *EcoRI*, *SalI*, *BamHI* and *HaeIII* digestion. The results (Fig. 2) show that the restriction patterns of IG1 and IG3 are different, and distinct from those obtained for  $\phi$ 3T (WILSON *et al.*, 1974; DEAN *et al.*, 1978) and SP $\beta$  (NOYER-WEIDNER *et al.*, 1981) DNAs.

## CONCLUSIONS

Bacteriophages IG1 and IG3, newly isolated from the soil, share, in common with  $\phi$ 3T and SP $\beta$  the same serological determinants. In addition, their DNAs harbour a thymine gene, like  $\phi$ 3T-related phages (TUCKER, 1969).

Nevertheless, the newly isolated phages reveal an immunity determinant, which is different from the ones operating in all other phages tested. Furthermore, the restriction patterns of phages IG1 and IG3 are markedly different from each other and from those of the other phages. In particular *HaeIII* enzyme, which leaves unaffected the DNAs from both  $\phi$ 3T (NOYER-WEIDNER *et al.*, 1981) and SP $\beta$  (TRAUTNER *et al.*, 1980) cuts IG1 and IG3 DNAs into more than twenty fragments.

These different observations, taken together, indicate that IG1 and IG3 are new temperate phages. Their further characterization is currently being undertaken.

## REFERENCES

- ADAMS, M. H. (1959) — *Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers.  
DEAN, D. H., C. L. FORT and J. A. HOCH (1978) — Characterization of Temperate phages of *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, vol. 11: 213-217.  
DEAN, D. H., J. C. ORREGO, K. W. HUTCHISON and H. O. HALVORSON (1976) — New temperate bacteriophage for *Bacillus subtilis*,  $\rho$ 11. *J. Virol.* 20: 509-519.



- DEAN, D. H., J. B. PERKINS and C. D. ZARLEY (1978)—Potencial temperate bacteriophage molecular vehicle for *Bacillus subtilis*. *Spores VII*. Edited by G. Chambliss and J. C. Vary—Washington D. C., American Society for Microbiology: 144-149.
- FARMER, J. L. and F. ROTHMAN. (1965)—Transformable thymine-requiring mutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 89: 262-263.
- KREFT, J. and C. HUGHES (1981)—Cloning vectors derived from plasmids and phages of *Bacillus*. *Current topics in Microbiology and Immunology* 96: 1-17.
- NOYER-WEIDNER, M. B. PAWLEK, S. JENTSCH, U. GUNTHER, and T. A. TRAUTNER (1981)—Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: gene coding for a BsuR-specific modification methyltransferase in the temperate bacteriophage  $\phi$ 3T. *J. Virol.* 38: 1077-1080.
- TRAUTNER, T. A., B. PAWLEK, U. GÜNTHER, U. CANOSI, J. JENTSCH, and M. FREUND (1980)—Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: identification of a gene in the temperate phage  $SP\beta$  coding for a BsuR specific modification methyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* 180: 361-367.
- TUCKER, R. G. (1969)—Acquisition of thymidylate sintetase activity by a thymine requiring mutant of *Bacillus subtilis* following infection by the temperate phage  $\phi$ 3T. *J. Gen. Virol.* 4: 489-504.
- WILSON, G. A., M. T. WILLIAMS, H. W. BANEY and F. E. YOUNG (1974)—Characterization of temperate bacteriophages of *Bacillus subtilis* by the restriction endonuclease *EcoRI*: evidence for three different temperate bacteriophages. *J. Virol.* 14: 1013-1016.
- YEHLE, O. C. and R. H. DOI (1967)—Differential expression of bacteriophage genomes in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*, *J. Virol.* 1: 935-947.



## MODIFICAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DO NUCLÉOLO DE CÉLULAS CV<sub>1</sub> INDUZIDAS PELA RIBAVIRINA

M. Luísa Valdeira

Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex

A. P. Alves de Matos

Instituto Nacional de Veterinária, 1500 Lisboa Codex

### SUMMARY

Ribavirin has been studied as an antiviral drug, but it is not yet clear whether the compound is specifically antiviral in its mode of action or whether it inhibits virus replication as a result of its effect(s) on the host cell.

The effects on cellular metabolism are not well known and we have no notice any work about the effects of Ribavirin on the cellular ultrastructure.

In preliminary results, treatment of CV<sub>1</sub> culture cells with Ribavirin in varying concentrations produced marked alterations in nucleolar ultrastructural organization: — segregation, increase of the volume and extrusion of the fibrillar centers and in some cells the appearance of some nucleolar remnants, consisting only of segregated amorphous and fibrillar components, with or without the presence of several fibrillar nodules in the interchromatin space. However, no alterations in the ultrastructure of either the nucleus or cytoplasm were observed in cells examined in the same period of time.

The incorporation of thymidine in CV<sub>1</sub> cells in presence of Ribavirin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) is delayed, although there is no difference, compared with the controls, after a period of nine hours after treatment.

Similar ultrastructural lesions were analysed in treated cells with other antimetabolites and in several cases, they are a consequence of the inhibition of the synthesis of nucleolar precursor RNA. The possible mechanism of Ribavirin is the inhibition of the enzyme inosine 5'-phosphatase (IMP) dehydrogenase, that blocks the biosynthesis of nucleotides.

The images observed lead to this interpretation and it is known that these antimetabolites primarily affect nucleolar precursor biosynthesis.

### INTRODUÇÃO

A Ribavirina, um nucleósido análogo à guanosina e inosina (PRUSINER and SUNDARALINGAM, 1973) é conhecido há alguns anos pela sua activi-

dade antiviral (SIDWELL et al. 1979; MALINOSKI and STOLLAR, 1981) e antitumoral (POTTER et al. 1976; NEWMAN et al. 1977), e tal como outros agentes inibidores deste grupo o seu mecanismo de acção não é bem conhecido.

Vários autores propõem como mecanismo de acção antiviral da Ribavirina: — a inibição de polimerases e polipéptidos virais, a competição com a guanósina no «capping» do ARNm viral, a inibição da guanósina 5'fosfato ou ainda a diminuição da síntese dos ácidos nucleicos (MALINOSKI and STOLLAR, 1981; ERIKSSON et al. 1977; OXFORD, 1975; GOSWAN et al. 1979).

Também se sabe que ao nível celular o antimetabolito nas concentrações utilizadas, não afecta grandemente o metabolismo da célula e são referidas apenas fracas inibições da síntese proteica, do ARN e só nalguns casos do ADN (ERIKSSON et al. 1977; OXFORD, 1975). Há autores, porém, que referem uma inibição da divisão celular, uma diminuição marcada da síntese das proteínas, do ADN e ARN e do «pool» da guanósina 5'trifosfato explicando que estes efeitos se devem à inibição do enzima inosina 5'monofosfato (IMP) dehidrogenase da célula (MULLER et al. 1977; ZIMMERMAN and DEEPROSE, 1978; SIDWELL and DONALD, 1981).

Não sendo conhecido nenhum trabalho ultraestrutural sobre os efeitos da Ribavirina em estruturas celulares, analisámos esses efeitos com o fim de obtermos mais informações quanto aos possíveis efeitos inibidores da Ribavirina no metabolismo celular.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAIS:

A Ribavirina foi gentilmente cedida pelo Dr. Kirkpatrick W., da ICN Pharmaceuticals — Covina, Califórnia. A Ribavirina foi adicionada nas concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  em meio de manutenção Eagle (M. E. M.) com 5 % de soro de vitela.

— [Metyl- $^3\text{H}$ ] thymidine foi obtida da Amersham/Searle Corp.

— A timidina fria foi obtida da Sigma Grade.

### MÉTODOS:

*Culturas de células:* Utilizámos células do clone 12 da linha contínua CV<sub>1</sub>, (rim de Cercopithecus aethiopsis), cultivadas em meio de Eagle (M. E. M.) com 10 % de triptose-fosfato e 10 % de soro de vitela. Antes de utilizar as culturas, que continham aproximadamente  $10 \times 10^6$  células, o meio de crescimento era substituído por meio de manutenção com 5 % de soro de vitela com as concentrações de Ribavirina referidas.

*Incorporação do isótopo radioactivo:* As culturas de células anteriormente referidas com meio com Ribavirina às concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/ml}$  foram incubadas a 37° durante 1,5; 2,5; 5,5; 8,5; 11,5; 15,5; e 23,5 horas. Ao fim de cada intervalo de tempo foi adicionado no meio 10 $\mu\text{Ci}$  de [methyl<sup>3</sup>H] thymidine (5 Cimmol) em culturas de células em duplicado. As culturas foram incubadas novamente durante 30 min. a 37°. No fim deste período de pulso, juntámos algumas gotas de uma solução de timidina fria. Lavámos as culturas em tampão PBS e removemos as células com uma solução de tripsina-versene. As células foram lisadas a 0°, em tampão isotónico contendo 0,6 % NP-40, segundo a técnica descrita por ORTIN and VINUELA, 1977.

A fracção nuclear foi precipitada com ácido tricloroacético e o precipitado recolhido em papel de fibra de vidro e contado num Packard (modelo 3320, tri-carb Scintillation Spectrometer).

*Microscopia Electrónica:* As células que foram tratadas com a Ribavirina nas diferentes concentrações e em diferentes intervalos de tempo foram fixadas em gluteraldeído a 2,5 % em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH (7,2-7,4). A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio a 1 % e finalmente em acetato de uranilo a 1 % em tampão acetato-ácido acético 0,1 M pH 5.

Após encapsulação em Agar a 2 % em água bidestilada, os fragmentos de Agar com as células foram desidratados com etanol de concentrações crescentes e passagem por epoxipropano. A inclusão foi feita numa mistura de Epon-Araldite. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranilo e com citrato de chumbo e observadas num microscópio electrónico Jeol 100C a 80 Kv.

## RESULTADOS

### *Observações morfológicas:*

A Ribavirina nas várias concentrações ensaiadas induz marcadas alterações nucleolares em muitas células, embora no núcleo e no citoplasma das células observadas não se tenham observado mudanças ultraestruturais.

A ultraestrutura normal do nucléolo das células CVI foi já descrita anteriormente (VALDEIRA e MATOS, 1981).

A estrutura normal trabecular do nucleolonema mostra-se mais compacta (Fig. 1), depois de 1 h. de tratamento com a Ribavirina e nos nucléolos compactos o componente granular está disposto dum modo mais denso. Depois de 5 h. de tratamento, quase todas as células mostram degradação do componente granular formando estas massas compactas ovais ou redondas onde estão localizados os centros fibrilares com um maior volume (Figs. 2 e 3).

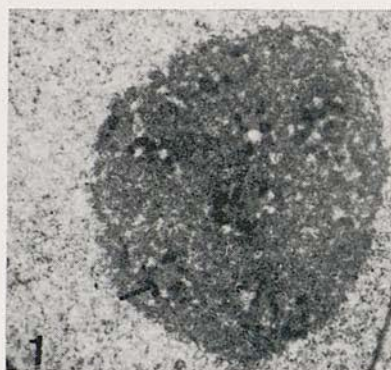


Fig. 1 — Nucléolo duma célula CV1 depois de 1 h. de tratamento com 50  $\mu\text{g/ml}$  de Ribavirina. O nucleolone-ma está mais condensado. A seta indica um dos centros fibrilares. x12000

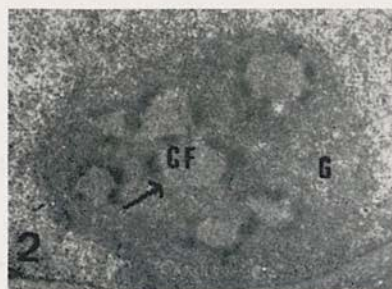
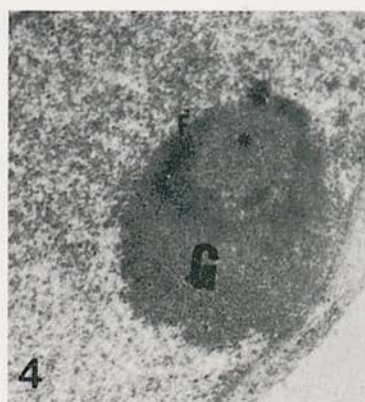
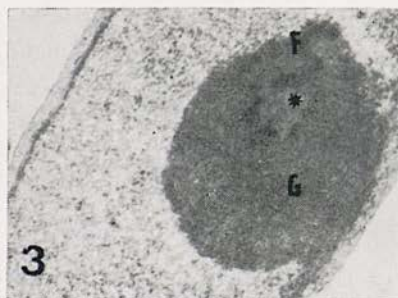


Fig. 2 — Nucléolo duma célula CV1 tratada durante 1 h. com 100  $\mu\text{g/ml}$ . O componente granular (G) está disposto de um modo mais denso, onde estão localizados os centros fibrilares com maior volume (CF). A seta indica o componente fibrilar denso. x15600

Mais tarde, eles são desviados para a superfície nucleolar completando assim a segregação dos vários constituintes (Figs. 3 e 4). Quase todos os nucléolos atingiram esta fase pelas 16 horas, observando-se também já em alguns nucléolos a desintegração da substância fibrilar feita em forma de nódulos que é associada algumas vezes ao centro fibrilar (Figs. 5 e 6).



Figs. 3 e 4 — Nucléolos de células CV1 depois de 6 h. de tratamento com Ribavirina (50  $\mu\text{g/ml}$ ). O componente granular (G) mostra-se como uma massa compacta oval e a segregação é evidente. (\*) centro fibrilar. (F) componente denso fibrilar.

Fig. 3 — x 15600; Fig. 4 — x 13600



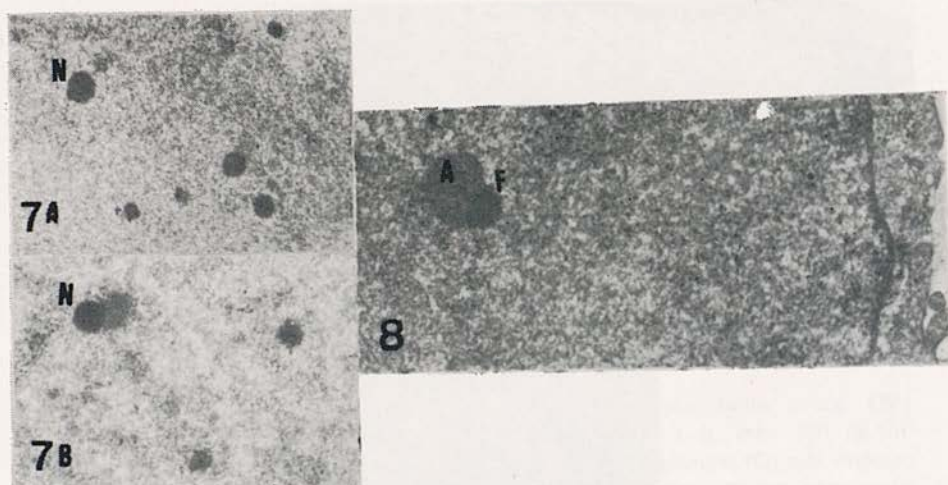
Figs. 5 e 6 — Nucléolos de células CV1 tratadas com Ribavirina durante 16 horas  
 Fig. 5 — Note o centro fibrilar (CF) a separar-se do nucléolo que foi tratado com 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de droga. x-15600; Fig. 6 — A desintegração da substância fibrilar em forma de nódulos está a processar-se. A célula estava em presença de 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  da Ribavirina. x15800

Pelas 24 e 48 horas o número de nódulos com estrutura fibrilar que estão presentes no espaço intercromatínico são múltiplos (Figs. 7A e 7B) e são, ou não, acompanhados de restos das estruturas nucleolares, consistindo de componentes segregados de estrutura amorfa e fibrilar (Fig. 8).

É importante referir que a natureza das lesões e a rapidez da indução das diferentes alterações morfológicas foram os mesmos para as três diferentes concentrações do antimetabolito (50, 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

#### *Incorporação Radioactiva:*

Na presença de Ribavirina (50 ou 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) as células CV1 mostram uma leve inibição da incorporação de timidina, que é seguida pela recuperação aos níveis do controlo depois de 9 horas de tratamento (Fig. 9).



Figs. 7A e 7B—Nódulos fibrilares localizados no espaço intercromatínico de células CVI tratadas com  $100 \mu\text{g/ml}$  de Ribavirina, durante 24 horas. (N) nódulos fibrilares. Fig. 7A — x 6996; Fig. 7B x 14740.

Fig. 8—Célula em presença da Ribavirina ( $150 \mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas. O núcleo apenas contém restos de estrutura nucleolar que consiste de componentes segregados de estrutura amorfa (A) e fibrilar (F). x 15600.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo indica que o nucléolo é marcadamente afectado nas células CVI tratadas com Ribavirina.

As alterações nucleolares consistem numa compactização do componente granular do nucléolo com segregação dos componentes fibrilares.

Efeitos semelhantes foram observados por RECHER et al. 1971 em células tratadas com proflavina, substância que inibe a síntese do ADN e do ARN, numa maneira semelhante à da Actinomicina C. Outros antimetabolitos (DASKAL et al. 1978; RECHER et al. 1971; GOESSENS, 1978), conhecidos como inibidores da síntese do ARN, provocam também efeitos de segregação nucleolar.

Observámos também um aumento do volume dos centros fibrilares e a desintegração de substância fibrilar do nucléolo para o espaço intercromatínico. Essa desintegração é feita em forma de nódulos e é por vezes associada ao centro fibrilar.



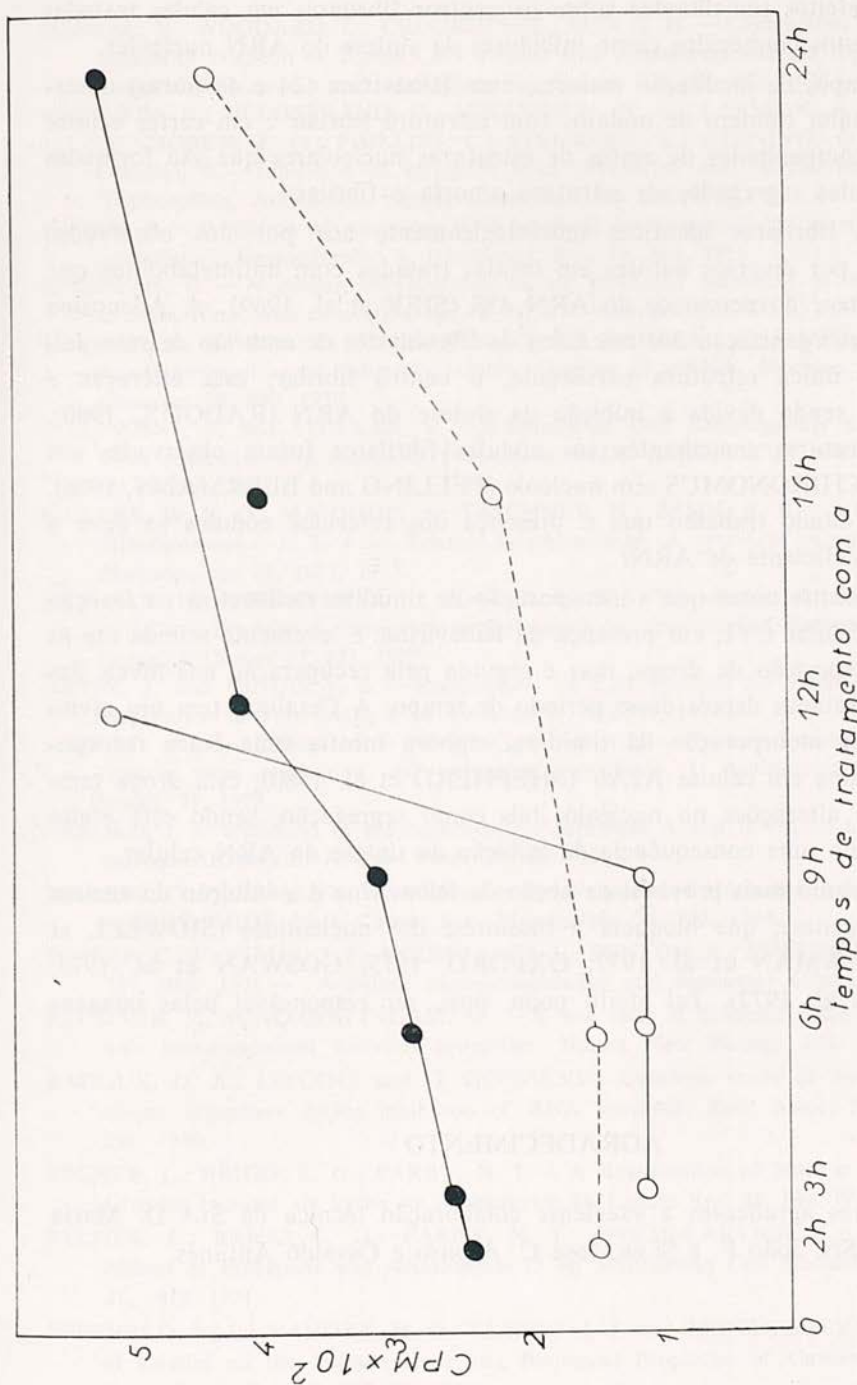


Fig. 9— Resultados da incorporação de [methyl<sup>3</sup>H] thymidine na A.D.N de células CV1 depois do tratamento com a Ribavirina (50, ou 100 µg/ml) em diversos intervalos de tempo.

*Ribavirina*

- células testemunha
- células CV1 tratadas com Ribavirina (50 µg/ml)
- células CV1 tratadas com Ribavirina (100 µg/ml)

Vários autores (DASKAL et al. 1978; GOESSENS, 1978; FAKEN, 1971), observaram efeitos semelhantes sobre os centros fibrilares em células tratadas como compostos conhecidos como inibidores da síntese do ARN nucleolar.

Com tempos de incubação maiores, com Ribavirina (24 e 48 horas) observámos um maior número de nódulos com estrutura fibrilar e em certas células eles estão acompanhados de restos de estruturas nucleolares que são formadas de componentes segregados de estrutura amorfa e fibrilar.

Nódulos fibrilares idênticos morfológicamente aos por nós observados foram vistos por diversos autores em células tratadas com antimetabolitos que inibem a síntese do precursor do ARN 45S (SIEV et al. 1969). A Adenosina induz uma desorganização dos nucléolos de fibroblastos de embrião de rato deixando como única estrutura persistente, o centro fibrilar; esta alteração é citada como sendo devida à inibição da síntese do ARN (RADOUX, 1980). Também estruturas semelhantes aos nódulos fibrilares foram observadas em embriões de *CHIRONOMUS* sem nucléolo (PELLING and BEERMANN, 1966), indicando o citado trabalho que a presença dos referidos nódulos se deve a uma síntese deficiente de ARNr.

É interessante notar que a incorporação de timidina radioactiva na fracção nuclear das células CV1, em presença da Ribavirina, é levemente inibida até às 9 horas de exposição da droga, mas é seguida pela recuperação aos níveis das células não tratadas depois desse período de tempo. A Cesalina, tem um efeito semelhante na incorporação da timidina, embora mostre uma fraca incorporação de uridina em células A1Ab (SHEPHERD et al. 1980); esta droga também provoca alterações no nucléolo, tais como segregação, sendo este efeito explicado como uma consequência da inibição da síntese do ARN celular.

O mecanismo mais provável da acção da Ribavirina é a inibição do enzima IMP dehidrogenase, que bloqueia a biosíntese dos nucleótidos (SIDWELL et al. 1979; NEWMAN et al. 1977; OXFORD, 1975; GOSWAN et al. 1979; MULLER et al. 1977). Tal efeito pode, pois, ser responsável pelas imagens observadas.

#### AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a excelente colaboração técnica da Sr.<sup>a</sup> D. Maria Lapão e dos Srs. João F. e Silva, José C. Afonso e Osvaldo Antunes.

## BIBLIOGRAFIA

- DASKAL, Y.; WOODARD, C.; CROOKE, S. T.; BUSCH, H. — Comparative ultrastructural Studies of Nucleoli of Tumor Cells Treated with Adriamycin and the Newer Anthracyclines, Carminomycin and Marcellomycin. *Cancer Res.* 38, 467, 1978.
- ERIKSSON, B.; HELGSTRAND, E.; JOHANSSON, N. G.; LARSSON, A.; MISIORNY, A.; NOREN, J. O.; PHILLIPS, L.; STENBERG, K.; STENING, G.; STIDH, S.; OBERG, B. — Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin Triphosphate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 946, 1977.
- FAKEN, S. — Inhibition of nucleolar RNP synthesis by cycloheximide as studied by high resolution radioautography. *J. Ultrastruct. Res.* 34, 586, 1971.
- GOESSENS, G. — Nucleolar ultrastructure during reversible inhibition of RNA synthesis in chick fibroblasts cultivation «in vit.o». *J. Ultrastruct. Res.* 65, 83, 1978.
- GOSWAN, B. B.; BOREK, E.; SHARME, O. K.; FUJITAKI, J.; SMITH, R. A. — The Broad antiviral agent Ribavirin Inhibits Capping of mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 89, 830, 1979.
- MALINOSKI, F. and STOLLAR, V. — Inhibitors of IMP dehydrogenase prevent Sindbis virus replication and reduce GTP levels in AEDS ALBOPICTUS cells. *Virology* 110 (2) 281-291, 1981.
- MULLER, W. E. G.; MAIDHOF, A.; TASCHNER, H.; ZAHN, R. K. — Virazole (1-*D*-Ribofuranosyl-1, 2, 4 — Triazole-3-carboxamide: A cytostatic Agent. *Biochemical Pharmacology* 26, 1071, 1977.
- NEWMAN, H.; VODINELICH, L.; POTTER, L. W. — The effects of 1-*D*-Ribofuranosyl — 1,2,4 — Triazole -3- carboxamide (Ribavirin) on Transplanted Tumours of Animals. *Europ. J. Cancer* 13, 821, 1977.
- ORTIN, J. and VINUELA, E. — Requirement of Cell Nucleus for African Fever Virus Replication in Vero Cells, *J. of Virology* 21, 902-905, 1977.
- OXFORD, J. S. — Effects of 1-*D*-Ribofuranosyl 1,2,4 — Triazole-3-carboxamide on influenza virus replication and polypeptide synthesis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1 (Suppl), 71, 1975.
- OXFORD, J. S. Inhibition of the replication of influenza A and B viruses by a nucleoside analogue (Ribavirin) *J. Gen. Virol.* 28, 409, 1975.
- PELLING, C.; BEERMANN, W. — Diversity and Variation of Nucleolar Organizing Regions in CHIROMIDS. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 23, 393, 1966.
- POTTER, C. W.; PHAIR, J. P.; VODINELICH, L.; FENTON, R.; JENNINGS, R. — *Nature* 259, 496, 1976 — Antiviral, immunosuppressive and antitumor effects of Ribavirin.
- PRUSINER, P.; SUNDARALINGAM, M. — A new class of synthetic nucleoside analogues with broad-spectrum antiviral properties. *Nature New Biology* 244, 116-117, 1973.
- RADOUX, D. A.; LEPOINT and G. GOESSENS — Cytologic study of nucleoli and nucleolar organizers during inhibition of RNA synthesis. *Bull. Assoc. Anat.* 64 (185) 259, 1980.
- RECHER, L.; BRIGG, L. G.; PARRY, N. T. — A Reevaluation of Nuclear and Nucleolar Changes Induced «in vitro» by Actinomycin D. *Cancer Res.* 31, 140, 1971.
- RECHER, L.; BRIGG, L. G.; PARRY, N. T.; WHITE-CARVIER, J. — Difference in Effects of Proflavine and Actinomycin D on Mammalian Cell Nucleoli. *Cancer Res.* 31, 1915, 1971.
- SHEPHERD, V. L.; VANDRÉ, D. D.; ELTING, J. J. and MONTGOMERY, R — Effects of Cesalin on the Ultrastructure and Biological Properties of Cultured Mammalian Cells. *Cancer Res.* 40, 225-231, 1980.

- SIDWELL, R. W. and DONALD, F. S. — Bovine leukemia virus inhibition «in vitro» by Ribavirin. *Antiviral Res.* 1 (1), 47-54, 1981.
- SIDWELL, R. W.; ROBINS, B. K.; HILLYARD, I. W. — Ribavirin: An Antiviral Agent. *Pharmac. Ther.* 6, 123, 1979.
- SIEV, M.; WEINBERG, R.; PENMAN, S. — The Selective Interruption of Nucleolar RNA Synthesis in HeLa Cells by Cordycepin. *J. Cell. Biol.* 41, 510, 1969.
- VALDEIRA, M. L. e MATOS, A. P. — Efeitos da Ribavirina (Virazole) sobre a ultraestrutura nucleolar em células CV1. *Rep. Trab. I. N. V.* XIII, 1981, p. 27-32.
- ZIMMERMAN, T. P.; DEEPROSE, R. D. — Metabolism of 5-Amino-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Imidazole-4-Carboxamide And Related Five-membered Heterocycles to 5'-Triphosphates in Human Blood And L 5178y cells. *Bioch. Pharmacology* 27, 709, 1978.

### III REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BELGA DE MUTAGÉNESE AMBIENCIAL

(3rd ANNUAL MEETING OF THE BELGIAN  
ENVIRONMENTAL MUTAGEN SOCIETY)

R. DE BOELPAEPE

A Belgian Environmental Mutagen Society (BEMS) é uma Associação científica fundada em 1980 e cujos estatutos têm uma base legal desde Outubro de 1982. Representa a secção nacional belga da European Environmental Mutagen Society (EEMS), sendo esta última afiliada à International Environmental Mutagen Society (IEMS).

Os objectivos da nova Sociedade são de favorecer o estudo dos efeitos de agentes mutagénicos do ambiente humano, mais particularmente os que dizem respeito à Saúde Pública, promover as investigações bem como o estudo e a difusão das informações neste campo científico. Além destas finalidades, a BEMS representa a Bélgica nas associações internacionais de mutagénese.

Realizou-se em 22 de Outubro passado no *Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie* em Bruxelas a 3.ª Reunião Anual da Sociedade Belga de Mutagénese Ambiental presidida pelo seu presidente, Professor Doutor Jean Moutschen, Director do Laboratório de Genética e Citologia Gerais da Universidade de Liège. Participaram nesta reunião 52 cientistas, a maioria de instituições belgas. A Universidade dos Açores foi representada pelo autor desta nota. Durante este encontro, a Assembleia Geral da Sociedade procedeu à eleição dos novos Órgãos Directivos (novo Comité) para o biénio 1983+84. À semelhança do ano anterior o *Annual Meeting da BEMS* foi um êxito científico apesar da Sociedade ser ainda muito jovem.

Houve duas conferências inaugurais sobre temas cruciais em foco. A primeira foi proferida pelo Professor R. Impens da Faculdade de Ciências Agrónomicas de Gembloux sobre um assunto empolgante e complexo de Ecologia intitulado «Transferts des polluants et contaminants dans les chaînes trophiques». Ao longo da sua conferência realçou as múltiplas actividades dos agrónomos no meio ambiente, nomeadamente melhorar quantitativamente e qualitativamente a produção da biomassa, preservar a qualidade da vida e proteger o meio natural, con-

servar as espécies vegetais e animais ameaçadas, proceder ao ordenamento paisagístico e respeitar os biótopos naturais, manter a fertilidade dos solos, depurar as águas usadas e participar na reciclagem de certos resíduos. Debruçou-se em detalhe sobre o problema da contaminação dos solos pelos metais pesados que apresenta na Bélgica uma acuidade particular, se tomarmos em conta a antiguidade e o número de instalações industriais tratando metais não ferrosos. Concluiu logicamente que a Bélgica desempenha um papel piloto nos estudos da contaminação metálica do meio ambiente. Incitou à vigilância das transferências solo-planta e da acumulação dos metais no solo, como meio indispensável para o controlo dos riscos de contaminação metálica das cadeias alimentares. Fez notar que a produção de legumes por métodos agro-biológicos em hortas particulares não está ao abrigo da poluição em zonas onde se observe uma regressão da vegetação, relacionada com um teor dramaticamente elevado de metais pesados. A segunda conferência representou uma proveitosa contribuição dos Doutores G. Cantillon e R. Kirchmann, investigadores do Centro de Energia Nuclear de Mol (C. E. N. - S. C. K.) sobre «Programmes belges d'études et de surveillance radiologiques de l'environnement: acquis et perspectives». O Doutor G. Cantillon descreveu as fontes de irradiação potenciais ou reais que atingem as populações humanas. Focou a questão da radiocontaminação dos alimentos, subsequente aos ensaios nucleares das grandes potências terminados por volta de 1963 e à rejeição de resíduos nucleares internacionais. Falou dos objectivos e da evolução da radioprotecção bem como de uma rede de vigilância à volta das centrais nucleares. Desmistificou contudo o perigo da indústria nuclear, lembrando um inquérito feito no Reino Unido que mostra paradoxalmente ser a irradiação médica, seguidamente à radioactividade natural, a principal fonte de radiações a que a humanidade está exposta (Taylor, F. E. e Webb, G. M. A., 1978 — National Radiological Protection Board, Harwell, Dideot, Oxon, OXII ORQ, 86 páginas). O Doutor R. Kirchmann, prosseguindo a conferência, limitou-se a falar dos aspectos da radioactividade proveniente do ciclo do combustível nuclear.

É habitual nas Reuniões Anuais da BEMS dar aos membros da Sociedade a oportunidade de apresentar uma breve comunicação seguida eventualmente de uma discussão. O Comité aconselhou aos participantes o uso da língua inglesa para além das línguas nacionais — o francês e o flamengo — autorizadas. Esta iniciativa original estimula os jovens investigadores e outros, que não podem deslocar-se ao Estrangeiro, a apresentarem os resultados de trabalhos em curso e promove a prática da expressão numa língua científica internacional, o inglês. Para além deste aspecto, a BEMS assegura a publicação dos resumos na Revista Internacional Mutation Research. No 3.º Encontro Anual, houve um total de 15 comunicações versando sobre temas muito variados. O autor desta nota apresentou a comunicação «Cytogenetic effects of the insecticide pirimicarb on *Nigella damascena* L. chromosomes» onde realçou as propriedades clastogé-

nicas deste aficida específico com base na determinação dos tipos de lesões cromossómicas detectadas em células meristemáticas da raiz, na 1.ª mitose após tratamento de sementes em dormência. As observações permitiram estabelecer uma relação linear entre a dose e a frequência de células lesadas, de quebras cromossómicas (excepto os microfragmentos) e de dicêntricos. Os resultados apontam para um risco potencial deste pesticida em relação às plantas.

O Laboratório de Genética e Citologia Gerais da Universidade de Liège, dirigido pelo Professor Dr. Jean Moutschen, fez-se representar pela Doutora M. C. Chollet. A comunicação que apresentou «Mutagenic efficiency of chlorotriazine herbicides after chronic treatment» versou sobre a avaliação do potencial mutagénico de 3 herbicidas. A atrazina, a simazina e a propazina foram testadas em baixas concentrações. Um dos processos de avaliação consistiu na detecção de lesões cromossómicas observadas em células da medula óssea e em espermatogónias em diacinese imediatamente após tratamento crónico, cuja duração correspondeu à da espermatogénese. O estudo citogenético mostrou não existir qualquer diferença significativa em relação aos valores do controlo. O teste da letalidade dominante no ratinho revelou um aumento significativo da letalidade em pré-implantação, mas não em pós-implantação no que respeita aos herbicidas atrazina e simazina. Quanto à propazina, não foi observada qualquer diferença significativa na letalidade em pré e pós-implantação. Concluiu o autor que na ausência de perdas fetais em pós-implantação, não é possível imputar um efeito mutagénico a estas substâncias.

O Laboratório de Biofísica e Radiobiologia da *Université Libre de Bruxelles* está orientado para estudos de mutagénese fundamental, mais do que de mutagénese ambiental, como se pode constatar através das comunicações apresentadas. Assim a Doutora M. Bourguignon-Van Horen e o Professor Dr. M. Radman abordaram o tema «Random mismatch repair as a mechanism for localized mutagenesis» e a Doutora G. Maenhaut-Michel falou sobre «Role of mismatch repair in spontaneous and induced mutagenesis in *E. coli*». O mesmo Laboratório apresentou um contributo metodológico sobre «*E. coli* genotoxicity test measuring simultaneously mutation, induction and recombination» cuja 1.ª parte «Description of the test system» é da autoria de Doutor Z. Toman e col. e a segunda «A quantitative method for measurement of respective potencies» deve-se aos Doutores L. Tenenbaum e M. Radman. Ainda no campo da mutagénese fundamental, houve a comunicação do Doutor C. Dinsart e col. relacionada com as transferências génicas em células de mamíferos: «Irradiated DNAs of different configuration and origin confer a mutator phenotype to transfected mammalian cells».

No campo da detecção de mutagénicos em alimentos tratados termicamente, ouvimos uma atraente comunicação do Laboratório de Toxicologia e Bromatologia da Universidade Católica de Lovaina, apresentada pelo Doutor K. Ngoy: «Mutagenicity of broiled meat. Effect of heat treatment». Tratou da influência

da temperatura e do tempo de aquecimento sobre a formação de produtos mutagénicos na carne picada cozida, fervida sozinha e acompanhada de açúcares redutores. Os extractos em presença ou na ausência do sistema metabólico activador (fracção pós-mitocondrial de fígado de rato) foram submetidos ao teste de Ames (*Salmonella typhimurium* estirpe TA 98). Concluiu que a elevação da temperatura determina um aumento da actividade mutagénica, podendo estabelecer-se dentro de certos limites uma correlação entre a duração do tratamento térmico e a intensidade da actividade mutagénica. Acrescentou ainda que o método de tratamento térmico é decisivo sobre o efeito mutagénico revelado. As experiências realizadas por esta equipa demonstram que as mutações induzidas pelos agentes formados nos alimentos tratados termicamente (ex. Hamburgers) são de tipo «frameshift». A actividade metabólica é indispensável para que o efeito mutagénico se manifeste. Mostrou ainda que a adição de açúcares redutores à carne submetida a aquecimento desencadeou um aparecimento de produtos com intensa actividade mutagénica.

Sabe-se que as nitrosaminas estão muito espalhadas na cadeia alimentar visto poderem ser encontradas nos alimentos mais variados, nomeadamente em peixe e carne fumados, em certos cogumelos comestíveis e ainda no fumo do cigarro. Para além de serem reputadas de mutagénicas, podem possuir ainda propriedades cancerígenas. Assim se justifica o interesse do estudo dos efeitos da dimetilnitrosamina sobre a actividade nucleolar de hepatócitos do rato. Esta investigação resulta de uma colaboração entre o Laboratório de Genética Antropológica da *Vrije Universiteit Brussel*, a Universidade de Liège e o *Institut Bordet* (Bruxelas). Uma comunicação respeitante a este assunto: «Does dimethylnitrosamine treatment of rats influence the nucleolar activity of their hepatocytes?» foi apresentada pelo Doutor A. Deleener.

Outras comunicações merecem ser assinaladas, respeitantes a substâncias químicas poluentes do ambiente (epóxidos, cloreto de mercúrio e cloreto de metilmercúrio) e a substâncias com propriedades antitumorais (mitomicina C):

«Carcinogen mediated gene amplification in SV40 transformed Chinese hamster embryo cells correlates with microchromosomes formation» (W. Moens, C. Vleminckx, Y. Rös, M. Van Horick).

«Increased mutagenicity of 2-3-epoxybutane by rat liver subcellular fractions». (C. De Meester, M. Mercier, F. Poncelet).

«Nucleolus organizing regions in mercury chloride and methylmercury chloride treated human lymphocytes». (V. Verschaeve).

«Study on the repair of cytogenetic damages induced in human lymphocytes by exposure to Mitomycin C». (L. Fabry, L. Dubois).

«The effect of methylmercuric chloride and mercuric chloride on microtubules in vitro». (L. de Saint-Georges, V. Mabilille, A. Leonard).



«Are prenatal losses due to sperm abnormalities?». (J. Arany, J. Henrotte, G. Jenar-Dubuisson).

O Professor Dr. Jean Moutschen encerrou a 3.<sup>a</sup> Reunião Anual da BEMS após ter sido tomada a decisão por unanimidade de que a próxima Reunião Anual teria lugar em Liège em 21 de Outubro de 1983.



## 6th EUROPEAN MEETING ON BACTERIAL TRANSFORMATION AND TRANSFECTION\*

Luís J. Archer

Foi na Gulbenkian (Av. de Berna) e sob a égide da Sociedade Portuguesa de Genética que se realizou, no Verão passado, este Congresso Internacional, largamente anunciado na imprensa.

Abriu com a lição de um dos cientistas inscritos — Hamilton O. Smith, Prémio Nobel em engenharia genética (Fig. 1). Na mesa da Presidência (Fig. 2) encontravam-se o Dr. J. Ribeiro dos Santos, Director do Serviço de Ciência da Fundação Gulbenkian, o Prof. Doutor F. Dias Agudo, Director do Instituto Nacional de Investigação Científica, o Prof. Doutor J. Antunes-Correia, Presidente da Sociedade Portuguesa de Genética, e eu próprio como organizador do Congresso. A assistência (Fig. 3) contava, além dos portugueses, com quase 100 estrangeiros.

O programa científico primorosamente organizado pela Prof. Doutora Hermínia de Lencastre implicou 127 autores e co-autores (12 dos quais portugueses) e pôs em evidência importantes avanços em transformação bacteriana, incluindo engenharia genética e outros mecanismos moleculares. Houve também várias sessões de Posters, que decorreram exemplarmente devido aos cuidados de Maria Cândida Lopes.



Fig. 1 — Prémio Nobel abre o Congresso

\* Congresso subsidiado pelo Serviço de Ciência da Fundação Calouste Gulbenkian, pelo Instituto Nacional de Investigação Científica e pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica.



Fig. 2 — O capital e o trabalho



Fig. 3 — Imaginando interpretações alternativas

O «Summing up» final esteve a cargo do Dr. John Spizizen (Fig. 4) — um nome diariamente pronunciado por qualquer cientista, ou até técnico, que trabalhe em genética de bacilos. Os resumos de todas as comunicações foram já publicados no último número desta Revista.

Mas o intercâmbio científico neste grupo continuou muito para lá de todas essas sessões formais, e prolongou-se, durante aqueles 4 dias, ao longo dos

almoços, jantares e passeios. Resultados científicos intrigantes e linhas de futuro foram extensamente percorridos desde Lisboa e Oeiras até ao cabo do mundo (ou da Roca), do que também se obteve prova científica (Fig. 5). E daí, alguns dos nossos bacteriófagos deram um salto até ao Japão, e outros até Berlim em projectos de colaboração de que já se estão a colher frutos.

É a vantagem dum grupo muito homogéneo de cientistas em que todos, apesar de provenientes de 18 países diferentes, estão interessados nos resultados de cada um, e por isso fomentam há pelo menos 10 anos, relações científicas, pedagógicas e humanas.

E por isso também, muita coisa (desde o desenhar de cartazes e capas (Fig. 6) ou feitura de crachás, até pormenores de organização) foi conduzida pela informalidade amistosa da nossa própria improvisação, apoiada pelo trabalho secretarial, criterioso e exaustivo, de Maria Adelaide e Ana Cristina Madureira.



Fig. 4 — Dr. Spizizen encerra



Fig. 5 — No «Muchaxo» (Guincho), os diplomas do Cabo da Roca

No dia preciso em que se cumpria o 10.º aniversário da inauguração do primeiro destes Congressos, que então se havia realizado em Oeiras, tivemos, lá mesmo, uma sessão anabolizante e gaudiosa, organizada por um grupo das

nossas doutorandas, durante a qual se distribuiu (Fig. 7) uma medalha comemorativa desse aniversário (Fig. 8) — uma das ideias felizes do Dr. José A. Rueff, e oferta do Banco Pinto & Sotto Mayor.

No fim do último dia, e depois duma recepção oferecida pelo Presidente da Câmara de Lisboa, tivemos o jantar de despedida na Sala Ogival do Castelo de S. Jorge, durante o qual se praticaram rituais bioquímicos cuja tradição vem desde o primeiro Congresso, e por entre os quais se juraram colaborações científicas (para a vida e para a morte).

Tudo parecia acabado. Mas, passado algum tempo, começámos a receber os comentários epistolares dos nossos melhores amigos. Eis alguns fragmentos. «It was a memorable



Fig. 6 — O perfil que se via por toda a parte



Fig. 7 — Todos ganharam uma medalha

meeting» (C. Anagnostopoulos, Gif-sur-Yvette). «I found that the Transformation Meeting which you had organized was of all the Meetings which we have had scientifically the most stimulating one. The quality of the presentations was much higher than at previous Meetings. The entire conference became remarkably delightful through the social program which you had organized» (T. Trautner, Max-Planck Institute, Berlin). «Several specific things we learned on this trip will shape the pneumococcus work in Chicago



Fig. 8 — A medalha

for the next few years, and the chance to talk and see what others are doing was very valuable as well» (D. Morrison, Univ. of Chicago). «The Lisbon Meeting was a big success. I thoroughly enjoyed it scientifically and otherwise, and I am truly thankful for that» (N. Sueoka, Univ. of Colorado).

O Congresso seguinte (já o 7.º...) será nos primeiros dias de Setembro do próximo ano, em Paris, nada menos que na Sala Médicis do Palais du Luxembourg.

The first part of the paper discusses the general principles of the method. It is shown that the method is applicable to a wide range of problems, and that it is particularly well suited to the solution of problems involving the determination of the maximum and minimum values of a function. The method is based on the use of a series of straight lines, which are drawn through the points of the function. The slope of each line is determined by the method of least squares, and the maximum and minimum values of the function are then determined by the intersection of the lines.



Fig. 1. A graph showing the method of least squares applied to a curve. The lines are drawn through the points of the curve, and their slopes are determined by the method of least squares. The maximum and minimum values of the function are then determined by the intersection of the lines.

The second part of the paper discusses the application of the method to the solution of problems involving the determination of the maximum and minimum values of a function. It is shown that the method is particularly well suited to the solution of problems involving the determination of the maximum and minimum values of a function, and that it is particularly well suited to the solution of problems involving the determination of the maximum and minimum values of a function.



Fig. 2. A graph showing the method of least squares applied to a curve. The lines are drawn through the points of the curve, and their slopes are determined by the method of least squares. The maximum and minimum values of the function are then determined by the intersection of the lines.



## SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

## FICHEIRO DE ACTIVIDADES DOS SÓCIOS

*ALMEIDA, Luís Meneses de* (\*)  
 Instituto de Biologia Médica, Faculdade de Medicina, 3049 Coimbra  
 Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Aconselhamento  
 genético, osteopatias genotípicas. G. H.  
 G. E.

*ALMEIDA, Maria Leonor Osório Solano de*  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14; 2781 Oeiras Codex. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Estrutura primária de ácidos nu-  
 cleicos particularmente ácidos nucleicos de transferência de clorosplas-  
 tos; localização de genes desses ácidos nucleicos no D. N. A. cloro-  
 plástico. G. M.

*ALMEIDA, Vasco Manuel Leal Martins de*  
 Centro de Genética Humana e Biologia Social, Faculdade de Medi-  
 cina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citoge-  
 nética e Genética Humana. C. G.  
 G. H.

*ARCHER, Luís Jorge Peixoto*  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14; 2781 Oeiras Codex. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Mecanismos moleculares de trans-  
 formação e transdução em *Bacillus subtilis*. Estudo dos genes da utili-  
 zação da arabinose e da produção do antibiótico bacitrocina. Engenharia  
 genética com genes da esporulação. G. M.

*BAGULHO, Francisco João Cortes*  
 Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex.  
 Linhas de Investigação: Melhoramento de cereais autogâmicos. G. P.

(\*)

C.G.	...	Citogenética
G.A.	...	Genética e Melhoramento Animal
G.D.	...	Genética da Diferenciação e Desenvolvimento
G.E.	...	Genética das Populações e Evolutiva
G.H.	...	Genética Humana
G.M.	...	Genética Molecular e Microbiana
G.P.	...	Genética e Melhoramento de Plantas

**BAPTISTA, Manuel Bonet Monteiro**

Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Fixação do Azoto; Fisiologia Vegetal.

**BARRADAS, Manuel Torres**

Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhoramento de trigos, triticales, aveias e cevadas. G. P.

**BARRADAS, Maria do Céu**

Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. Linhas de Investigação: Estudos citogenéticos em *Triticum* e *Hordeum*. C. G.

**BETTENCOURT, Aníbal Jardim**

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Genética da resistência à «ferrugem» em *Coffea*; Melhoramento de *Coffea arabica* para a resistência à «ferrugem». G. P.

**BOAVIDA, Maria Guida**

Laboratório de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1699 Lisboa Codex. Linhas de Investigação: Mapa Genético Humano; Estudos Cromossómicos nas populações. G. H.  
C. G.

**BOELPAEPE, Robert Emile Angèle de**

Laboratório de Ecologia Aplicada, Universidade dos Açores, 9502 Ponta Delgada Codex Açores. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Efeitos citotóxicos e mutagénicos de pesticidas ao nível da célula vegetal e animal. C. G.

**BRANCO, João António Frazão Rodrigues**

Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Médicas 1198 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Isolamento e caracterização química dos fotoprodutos do triptofano e estudo dos seus efeitos biológicos em estirpes de *Salmonella typhimurium* de Ames. G. M.

**BRANDÃO, Celeste Fernandes da Silva**

Instituto de Antropologia, Faculdade de Ciências, 4000 Porto. Linhas de Investigação: Estudo do endocruzamento em algumas populações humanas. Biologia e Ecologia das populações humanas. G. H.  
G. E.

**CABRAL, Maria Antónia Sampaio Trigo**

Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica — citogenética das Leucemias. G. H.

**CARNEIRO, Ana Paula Capelas da Conceição**

Centro de Estudos de Bioquímica e Fisiologia Animal, Instituto Rocha Cabral, 1200 Lisboa, Linhas de Investigação: Regeneração Hepática.

- CARNEIRO, Maria Filomena L. I. M. N.*  
Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Indução de mutação em *coffea arabica*, visando a resistência à ferrugem alaranjada; mutação para a patogenicidade na ferrugem alaranjada «Hemileia vastatrix». G. P.
- CARNIDE, Olinda da Conceição Pinto*  
Divisão de Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudos citológicos e Melhoramento de cereais (centeio, trigo e triticales). G. P.
- CARVALHO, Maria Egídia de Sousa Bettencourt de*  
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Sistemas autolíticos nos gram. +. Lise de *S. faecalis* induzido por enzimas muralíticas. G. M.
- CARVALHO, Miguel António Ponces de*  
Rua da Bela Vista à Lapa, 55, 1200 Lisboa. Ensino Liceal.
- CASTEDO, Sérgio Manuel Madeira Jorge*  
Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica. Farmacogenética. Indução de anomalias cromossómicas por fármacos. G. H.
- CASTRO, António Ferreira de*  
Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Investigação Aplicada no âmbito do melhoramento do milho, com especial incidência na obtenção de plantas haplóides, a partir da cultura de anteras e posterior utilização em esquemas especiais de melhoramento. G. P.
- CATARINO, Fernando Pereira Mangas*  
Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências de Lisboa, 1294 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Endopoliploidia na diferenciação de suculência salina. C. G.  
G. D.
- CHAVECA, Maria Teresa Cardoso Marques da Cruz Franco*  
Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo genético da trissomia 21. C. G.  
G. H.
- CONDEÇO, Filomena Marques*  
Escola Secundária Rainha D. Leonor, 1700 Lisboa. Ensino Liceal. Linhas de Investigação: Marcadores bioquímicos em populações de peixes da costa portuguesa. G. E.
- COSTA, António Maurício Pinto da*  
Escola Secundária de Bocage, 2900 Setúbal. Ensino Secundário.

- COSTA, José Eduardo Lima Pinto da*  
 Instituto de Medicina Legal do Porto, Faculdade de Medicina, 4200 Porto.  
 Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Hereditariedade das im-  
 pressões digitais. Genética da Psiquiatria, Criminalidade e Genética. G. H.
- CONSTANT, Ruth Arez*  
 Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1699 Lisboa Codex.  
 Linhas de Investigação: Mapa Genético. C. G.  
 G. H.
- CORREIA, Aníbal Leal*  
 Laboratório Químico, EPAC—Empresa Pública de Abastecimento de  
 Cereais, 1000 Lisboa. Linhas de Investigação: Electroforese de proteínas  
 dos cereais. Essa aplicação no melhoramento do trigo. G. M.
- CORREIA, Jorge Calado Antunes*  
 Departamento de Genética, Escola Superior de Medicina Veterinária,  
 1199 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Com-  
 pensação de dosagem dos genes ligados ao sexo, polimorfismos bio-  
 químicos em mamíferos e peixes. Melhoramento genético de porcos  
 e coelhos. C. G.  
 G. E.  
 G. A.
- COUTINHO, Miguel Pereira*  
 Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lis-  
 boa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhora-  
 mento da Videira particularmente no que se refere à resistência a doenças  
 criptogâmicas. G. P.
- CRUZ, Gil Silva*  
 Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049  
 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Cultura  
 de órgãos e tecidos com vista à indução de morfogénese e regeneração de  
 plantas «*in vitro*». G. D.
- FEIJÓ, Maria de Jesus Portas*  
 Serviço de Genética, Hospital Egas Moniz, 1300 Lisboa. G. H.
- FERNANDES, Abílio*  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coim-  
 bra Codex. Linhas de Investigação: Citotaxonomia das plantas vas-  
 culares de Portugal. C. G.
- FERNANDES, Maria Emília Queirós dos Santos Ribeiro*  
 Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino Universitário. Linhas de  
 Investigação: Estudo do Cariótipo nas Neoplasias Pulmonares e alte-  
 rações do mesmo após terapêutica citostática. G. H.
- FERREIRA, Margarida do Rosário D. D. Martins*  
 Escola Secundária D. João de Castro, Alto de Santo Amaro, 1300 Lisboa.  
 Ensino Liceal.

- FIALHO, Maria da Graça Monteiro de Azevedo*  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética da Produção de Bacitracina. G. M.
- FIGUEIREDO, Maria Teresa Rangel de*  
 Divisão de Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Universitário. C. G.  
 G. P.
- FREITAS, Alberto Palyart do Carmo e*  
 Departamento de Fitopatologia, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Fisiologia e genética de patogenicidade de *Puccinia recondita* do trigo. Resistência do trigo à *P. recondita*. G. P.
- GONÇALVES, Aires Humberto da Penha*  
 Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mecanismos genéticos de resistência bacteriana. Mutações induzidas em vírus. Microplasma anaeróbios. G. M.
- GONÇALVES, André Dias*  
 Escola Secundária D. Pedro V, 1500 Lisboa. Ensino Liceal.
- GONÇALVES, Maria Helena Lobo Maia*  
 Instituto de Ciências Biomédicas «Abel Salazar», 4000 Porto. Ensino Universitário. Genética Molecular e Microbiana. Linhas de Investigação: Localização cromossómica de genes em procariotas (*B. subtilis*). G. M.
- GRILO, Maria Leonor H. Teles*  
 Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo da interacção nucleo-citoplasmática em mutantes deficientes na síntese da enzima citocromooxidase de *Neurospora crassa*, com o objectivo de obter informação sobre o mecanismo de regulação da síntese da enzima. G. M.
- GUIMARÃES, Maria Ludovina Vieira Lopes Silva*  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Morfogénese em cultura de tecidos vegetais. Cariótipo em cultura de tecidos vegetais. C. G.  
 G. P.
- INEZ, Maria de Lourdes Ulcêncio Fernandes Catroça*  
 Escola Secundária da Amadora. Ensino Liceal.
- JÚDICE, Maria Luísa D. F. R. Alarcão*  
 Direcção-Geral do Ensino Secundário, Av. 24 de Julho, 140-4.º, 1300 Lisboa. Ensino Liceal.
- LEÃO, Maria Cecília de Lemos Pinto Estrela*  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Termomicrobiologia. Produção de Etanol.

- LENCASTRE, Herminia Garcez de**  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Clonização de Genes de Esporu-  
 lação de *Bacillus subtilis*. Mecanismo de transdução em *Bacillus subtilis*.  
 Caracterização de mutantes de *Bacillus subtilis* resistentes ao fago SPPI. G. M.
- LOPES, Amândio Joaquim Madeira**  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Ap. 14, 2781 Oeiras Codex. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Efeitos da temperatura e de anti-  
 bióticos na morte e no crescimento de populações de leveduras. G. M.
- LOUÇÃO, Maria Amélia Martins**  
 Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências, 1294 Lisboa Codex.  
 Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo fisiológico e cito-  
 lógico de uma possível associação simbiótica fixadora de N em *Cera-  
 tonia siliqua* (alfarrobeira). C. G.
- MADRUGA, Maria José R. Moisés**  
 Direcção do Ensino Secundário, Av. 24 de Julho, 140-4.º, 1300 Lisboa.  
 Ensino Liceal.
- MAIA, José dos Santos Nascimento**  
 INIA — CRIDA de Entre-Douro e Minho, Gualter, 4700 Braga. Linhas  
 de Investigação: Melhoramento de milho, melhoramento de milho no  
 sentido de resistência a doenças e pragas; melhoramento do milho no  
 sentido do aumento em conteúdo de proteína. C. G.  
 G. P.
- MALHEIRO, Maria Isabel da Silva Nogueira Bastos**  
 Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Uni-  
 versitário. Linhas de Investigação: Cromossomopatias. G. H.
- MARQUES, Duarte Victorino**  
 Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Estação Agronó-  
 mica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Análise genética  
 e transferência de genes de resistência em *Coffea sp.* Cultura de tecí-  
 dos de plantas *in vitro*, nomeadamente do gén. *Coffea*. G. P.
- MARTINS, Antero Lopes**  
 Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lis-  
 boa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhora-  
 mento da videira em relação à resistência a doenças criptogâmicas, selec-  
 ção clonal da videira. G. P.
- MARTINS, Deolinda da Costa**  
 Instituto de Higiene e Medicina Social, Faculdade de Medicina, 3049  
 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Níveis  
 e evolução de imunoglobulinas e antitoxinas nas populações. G. E.

- MARTINS, João Manuel Neves**  
 Departamento de Botânica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Caracterização, Selecção e melhoramento do Gen. *Lupinus*. Estudo da variabilidade em alcalóides, teores proteicos e teores em óleo do *L. albus*, *L. luteus* e *L. augustifolius*. G. P.
- MENDES, Benilde Simões**  
 Núcleo de Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia 2825 Monte da Caparica. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Protozoários como agentes de depuração biológica e fonte de single cell protein. Estudo da relação predada-presa (protozoário-bactéria) em cultura contínua. Modelização. G. M.
- MENDES, Maria Cesaltina dos Santos**  
 Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, 1198 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética (carióticas, cromatina sexual) e Bioquímica (electroforese em gell, cromatografia). Determinação de alterações metabólicas. C. G.  
 G. H.
- MONTEIRO, Luís Sieuve**  
 Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética de sistemas de controlo; Crescimento e eficiência alimentar. G. A.  
 G. E.
- MOTA, Miguel**  
 Departamento de Genética, Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Poliploidia e anfidiplóidia. Estrutura e movimento dos cromossomas. Ultraestrutura celular. C. G.  
 G. M.  
 G. H.  
 G. P.
- NEVES, João Cláudio Martins das**  
 Av. João das Regras, 72-3.º, Santa Clara, 3000 Coimbra.
- NEVES, João Vasco E. Roxo**  
 Rua C — Bloco 21-5.º, Dt.º Queluz Ocidental, 2745 Lisboa. Ensino Liceal.
- PAIVA, Isabel Maria Palaio de Freitas Rodrigues**  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Cultura de tecidos vegetais (cultura de anteras para indicação de androgénese). C. G.  
 G. P.
- PAIVA, Jorge Américo Rodrigues de**  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citotaxinomia e biosistemática de plantas vasculares; aeropalinologia. C. G.
- PARANHOS, António Henrique da Silva**  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Linhas de Investigação: Cultura de células e tecidos com vista à indução de morfogénese e ao estudo da diferenciação celular *in vitro*. G. D.

- PAVEIA, Helena*  
Grupo de Botânica, Faculdade de Ciências, 1200 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo da utilização da L. arabinose em *Bacillus subtilis*. G. M.
- PENEDA, Isabel Maria de Salles Guerra Jonet de Almeida*  
INIA — Estação Agronómica Nacional, 2780 Oeiras. Linhas de Investigação: Localização de genes responsáveis por caracteres componentes da produção em trigo hexaploide. C. G.  
G. P.
- PEREIRA, António da Silva Pinto de Nazaré*  
Departamento de Microbiologia e Tecn. Prod. Aliment., Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mobilização microbiológica de recursos naturais, selecção e caracterização de m.o. para usos biotecnológicos. Estudo de mecanismo de controlo. G. M.
- PIMENTA, Maria Celestina D. C. dos Santos*  
Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Linhas de Investigação: Cultura de tecidos vegetais *in vitro*, (Diferenciação Citogenética). G. D.
- PINTO, Henrique Guedes*  
Divisão de Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001 Vila Real Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética de Cereais (triticale, trigo e centeio), com particular incidência em aspectos de estabilidade cromossómica de diploides e de emparelhamento cromossómico; melhoramento do Triticale e trigo. C. G.  
G. P.
- PINTO, Mary Claire Dolan Ferreira*  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1699 Lisboa Codex. C. G.
- QUEIROZ, Maria Clara de Almeida de Barros*  
Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências, 1200 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mutação. Processo de expressão da mutação. G. M.
- QUEIROZ, Maria Margarida Marini A. A. Vilar*  
Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citotaxonomia das Plantas espontâneas e subespontâneas da flora de Portugal. C. G.
- RAMOS, Albino Aroso*  
Hospital de Santo António, 4000 Porto. Ensino Universitário. G. H.
- REBIMBAS, Maria do Céu Tavares*  
Instituto de Antropologia, Faculdade de Ciências 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo dos coeficientes de consanguinidade das populações e sua evolução e o polimorfismo genético dessas mesmas populações. G. H.



- REYS, LESSEPS José António Lourenço*  
 Instituto de Medicina Legal de Lisboa, Faculdade de Medicina, 1100 Lisboa. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo de marcadores genéticos; Aplicações da genética em medicina forense: na identificação e estabelecimento de filiação. G. H.
- RIBEIRO, Ruy André Ferreira de Figueiredo*  
 Departamento de Genética, Escola Superior de Medicina Veterinária, 1199 Lisboa Codex. Ensino Universitário. G. A.
- ROMANO, Maria da Conceição Gonçalves Silva*  
 Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, 7351 Elvas Codex. Linhas de Investigação: Citogenética de Trigo. Localização de genes em trigo cuja interferência tenha repercussão no melhoramento deste cereal. Estudos relativos à produção de trigo híbrido. C. G.  
 G. P.
- ROMÃO, José Manuel da Luz*  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra Codex. Linhas de Investigação: Replicação e estrutura do cromossoma eucariótico. C. G.
- ROSA, Maria Isabel Borrego Franco da*  
 Escola Secundária de Sebastião e Silva, 2780 Oeiras. Ensino Liceal.
- ROSÁRIO, Jorge Luís A. Lopes do*  
 Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, 1198 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Rastreamento de doenças genéticas. C. G.  
 G. H.
- RUEFF, José A.*  
 Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Médicas, 1198 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Mutagenese ambiental, Cancerígenese. G. M.  
 G. D.
- SALAVESSA, João José Duarte Santos*  
 Departamento de Genética, Escola Superior de Medicina Veterinária, 1199 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Melhoramento genético de coelhos, polimorfismos bioquímicos em mamíferos. G. A.
- SAMPAYO, Tristão José de Mello de*  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. Linhas de Investigação: Citogenética do Trigo. C. G.
- SANTOS, António Manuel Amorim dos*  
 Instituto de Antropologia, Faculdade de Ciências, 4000 Porto. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Marcadores Genéticos Humanos; Genética Populacional Humana; Localização Cromossómica de Marcadores. G. H.  
 G. E.

- SANTOS, Heloisa Gonçalves dos*  
 Unidade de Genética, Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria  
 1600 Lisboa, Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Genética  
 Médica. C. G.  
 G. H.
- SARAIVA, Maria José Simões*  
 Escola Secundária Veiga Beirão, 1200 Lisboa. Ensino Secundário.
- SEQUEIROS, António Jorge dos Santos Pereira de*  
 Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel  
 Salazar, 4000 Porto. Ensino Universitário. Citogenética Clínica. Linhas  
 de Investigação: Cromossopatias, Polineuropatia Amiloidótica Familiar,  
 Doença de Machado-Joseph. C. G.  
 G. H.
- SILVA, Alberto Manuel Barros da*  
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. En-  
 sino Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica. Citogené-  
 tica de meioses humanas. Factores genéticos na infertilidade masculina. C. G.  
 G. H.
- SILVA, Maria Cecília Cabeça*  
 Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. Li-  
 nhas de Investigação: Acção do etanol e da temperatura na mutação  
 para deficientes respiratórios em leveduras. G. M.
- SILVA, Rosa Maria Vieira da*  
 Escola Secundária n.º 1, 2560 Torres Vedras. Ensino Liceal.
- SILVA, Rui Vidal Correia da*  
 Faculdade de Farmácia, 1699 Lisboa Codex. Ensino Universitário. Linhas  
 de Investigação: Caracterização e estudo de ácidos ribonucleicos ribosso-  
 mais de P. M. baixo (2S a 6S, excluindo 4S), nomeadamente por sequen-  
 ciação de RNA e DNA estudo de plasmídeos e de DNA mitocondrial  
 por Engenharia Genética.
- TAVARES, Amândio Gomes Sampaio*  
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética do intersexo no  
 homem. Genética das malformações congénitas multifactoriais. Efeitos  
 populacionais da acção médica e do conselho genético. Genética do cancro. C. G.  
 G. H.  
 G. E.
- TAVARES, Maria do Carmo Valenzuela Sampaio*  
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Linhas  
 de Investigação: Citogenética em Patologia Humana, Estudos dos cro-  
 mossomas humanos em bandas finas. C. G.  
 G. H.
- TAVARES, Maria da Purificação Valenzuela Sampaio*  
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Genética Médica, Genética e  
 Citogenética dos casais com esterilidade ou abortamentos de repetição.  
 Aconselhamento Genético e seu efeito Bio-social. G. H.

- TEIXEIRA, Rogério dos Santos Cardoso*  
 Instituto de Biologia, Faculdade de Medicina, 3000 Coimbra. Ensino  
 Universitário. Linhas de Investigação: Pesquisa de doenças monofacto- G. H.  
 riais, multifactoriais e por aberrações cromossómicas. Aconselhamento  
 Genético.
- VICENTE, Joaquim Adelino Ferreira*  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 3049 Coimbra  
 Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética (Ban- C. G.  
 ding) — em fase de iniciação de investigação nessa linha.
- VIEIRA, Dina Manuela da Trindade Morais Masseneiro*  
 Rua Henry Delgado, 6, r/c. Dt.º, 2775 Parede. Ensino Liceal.
- VIEIRA, Maria da Graça Calisto Laureano Santos Alves*  
 Grupo de Botânica, Faculdade de Ciências, 1200 Lisboa. Ensino Uni- G. M.  
 versitário. Linhas de Investigação: Mecanismos moleculares da trans-  
 dução de *Bacillus subtilis* pelo bacteriófago PBS1.
- VIEIRA, Maria Rita de Almeida Madeira Clemente da Mota*  
 Instituto Botânico, Faculdade de Ciências e Tecnologia. 3049 Coimbra C. G.  
 Codex. Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética do G. P.  
 Triticales. Cultura de tecidos e protoplastos em cereais.
- VOUGA, Luís Carlos Ferreira Pinto*  
 Serviço de Genética Médica, Faculdade de Medicina, 4200 Porto. En- C. G.  
 sino Universitário. Linhas de Investigação: Citogenética Humana. Este- G. H.  
 rilidade masculina, do ponto de vista genético. Cardiopatias congénitas.
- WARDEN, Juana*  
 Laboratório de Botânica, Faculdade de Ciências, 1294 Lisboa Codex. C. G.  
 Ensino Universitário. Linhas de Investigação: Estudo dos mecanismos G. D.  
 de controlo da actividade meristemática no *Bryophyllum*. Estudo da  
 variação da endopoliploidia em *Bryophyllum*.