



DO LABORATÓRIO À SALA DE AULA: OS RECENTES AVANÇOS DA GENÉTICA

Francis de Moraes Franco Nunes

Departamento de Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Email: francis@rge.fmrp.usp.br

Introdução

Quase um século após a descoberta das leis da hereditariedade (1865), Watson e Crick elucidaram a estrutura da dupla-hélice do DNA (1953), um marco entre a Genética Clássica e a Genética Molecular. Inaugurada a nova era, nunca se viu uma área do conhecimento avançar tanto, desde a compreensão da regulação da expressão gênica em procariotos e eucariotos, o isolamento de genes de interesse e clonagem em vetores (técnicas de DNA recombinante), a PCR (reação em cadeia da polimerase) até o desenvolvimento de métodos para sequenciar ácidos nucleicos e proteínas. A Genética representa muito mais que uma sub-área da Biologia, já se consolida como um campo científico capaz de estudar características hereditárias e suas variações com requinte de detalhes. Com as ferramentas disponíveis, Gregor Mendel seria capaz de analisar, com precisão, se um ou se muitos genes seriam responsáveis pela definição da cor ou rugosidade das ervilhas, além de identificar suas posições no genoma (locus cromossômico). Mendel também poderia reconhecer as diferenças entre as sequências nucleotídicas dos alelos (formas alternativas de um mesmo gene), diferenças essas que conferem diferenças biológicas (variabilidade). Em especial, num passado não tão remoto, as diferenças morfológicas na prole diferenciavam os indivíduos homocigotos (que possuem um par de alelos idênticos para um dado gene ou característica) dos heterocigotos (que possuem um par de alelos diferentes para um dado gene ou característica), mesmo sem conhecimentos moleculares. A Genética vive uma fase *ômica*, em que estudos em larga escala são cada vez mais comuns. Entende-se larga escala pela geração de uma infinidade de dados. É o caso dos trabalhos com genômica (sequenciamento completo de um genoma), transcriptômica (definição do conjunto de RNAs produzidos) e proteômica (definição do conjunto de proteínas produzidas). São dados que permitem explorar o código genético (DNA), o seu potencial de expressão gênica

(RNA), os seus produtos proteicos (polipeptídeos) e as interações e mecanismos moleculares do metabolismo de cada organismo. As tecnologias existentes permitem sequenciar genomas inteiros e compará-los (genômica comparativa), elucidando principalmente a história evolutiva dos seres vivos. Pode-se estudar *ômicamente* as fases do desenvolvimento de um organismo, as características genéticas comuns e exclusivas de uma espécie, tecidos sólidos (muscular, ósseo etc.) ou fluidos (sangue, linfa etc.). Por exemplo, é possível conhecer o transcrito de um tecido tumoral e comparar com o transcrito de um tecido sadio. A manipulação genética, como a produção de plantas e animais transgênicos, o silenciamento gênico e a reprogramação genética de células (fazer uma célula diferenciada retornar ao estado indiferenciado) são campos potencialmente aplicados e promissores para as áreas de saúde, economia, agricultura, pecuária, indústria baseada em produtos biotecnológicos e meio ambiente na manutenção de acervo genético de espécies em extinção. O objetivo deste texto é mostrar algumas das inúmeras abordagens e pesquisas em Genética, publicadas nos últimos três anos, as quais podem servir de exemplos a serem explorados e discutidos em sala de aula.

Curiosidades

- Pesquisadores egípcios estão mudando o contar da História por meio de testes genéticos (Hawass et al., 2010). Eles colheram material de 10 múmias, identificadas como pertencentes à família de Tutancâmon e, também, dos restos mortais do próprio faraó. Os resultados do estudo envolvem análises de DNA, tomografias, provas arqueológicas e registros históricos. Com base em análise de microssatélites, regiões repetitivas do DNA usadas em testes de paternidade, duas das múmias foram consideradas como sendo os pais do faraó e, muito provavelmente, Tutancâmon foi gerado num ato incestuoso. Os relatos históricos e os resultados genéticos corroboraram que a cosanguinidade e o acúmulo de malformações

nessa família eram comuns. A doença de Köhler II, semelhante à artrite, foi diagnosticada em Tutancâmon. O mais surpreendente foi a identificação de genes do protozoário *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária, no faraó e em mais quatro múmias. Os autores acreditam que a malária e as complicações ósseas decorrentes de uma fratura explicam melhor a morte do faraó, questionando outras causas até então debatidas, como envenenamento ou atropelamento.

- O debate sobre a origem humana está sempre em evidência. Há certo consenso de que a África é o berço do homem moderno, tendo surgido há aproximadamente 200 mil anos. Cientistas americanos, europeus e africanos genotiparam mais de 5 mil indivíduos africanos e não africanos, com uso de 1327 marcadores moleculares para regiões de microsátélites, inserções/deleções ou polimorfismos de base única (Tishkoff et al., 2009). Os dados buscaram mapear, com maior precisão, o local de origem e migração da espécie humana moderna. Os cientistas afirmam que, muito provavelmente, esse local é a região litorânea de fronteira entre a Angola e a Namíbia.

- Na mesma linha da evolução humana, foi mostrada, recentemente, a ocorrência de fluxo gênico entre o homem moderno e os Neandertais (extintos há 30 mil anos, aproximadamente). O contato sexual entre as duas espécies teria ocorrido entre 50 a 80 mil anos atrás (Green et al., 2010). Um dos principais autores do trabalho, o pesquisador Svante Pääbo, sempre negou a hipótese de que esse cruzamento tivesse existido. Porém, os resultados mostram que partes do DNA de um Neandertal constituem até 4% do genoma do homem moderno. Assim como no trabalho sobre o faraó Tutancâmon, os pesquisadores encontraram dificuldades para sequenciar o genoma de um Neandertal, isso porque esses genomas de indivíduos extintos não se encontram bem preservados e a taxa de contaminação bacteriana é muito alta. Estima-se que mais de 95% do DNA extraído de ossos são pertencentes a bactérias, o que dificultam as análises.

- Muito se questiona sobre a relação do DNA com algumas características humanas. Os cientistas, que por sua vez são movidos pela curiosidade e busca pelo conhecimento, tentam desvendar essas incógnitas. Recentemente foi caracterizado um gene que pode estar ligado ao crescimento de cabelo (Shimomura et al., 2010). Esse gene, chamado de APCDD1 (do inglês, *adenomatosis polyposis down-regulated 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 18 humano e codifica uma glicoproteína presente em abundância na membrana plasmática das células que formam os folículos pilosos. Os

cientistas descobriram uma mutação que impede a ocorrência de modificações químicas na proteína, necessária para ela seja transportada para a membrana. Num contexto mais amplo, essa alteração genética acarreta uma diminuição do folículo piloso e está relacionada com a queda de cabelos. Essa mutação está presente em indivíduos com hipotricose, um tipo raro de calvície com herança autossômica. Experimentos adicionais mostraram que APCDD1 interage com a via de sinalização Wnt, uma rede de proteínas conservadas entre vertebrados e invertebrados, com papel importante na comunicação entre células, especialmente durante a embriogênese. É a primeira vez que essa via de sinalização foi descrita como partícipe no crescimento de cabelos em humanos. A ocorrência da calvície é geneticamente complexa, não podendo ser explicada apenas por uma mutação nesse gene. Mas, certamente, tal descoberta é uma contribuição às informações já existentes, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de tratamentos.

Medicina/Saúde

- O mosquito *Aedes aegypti* é transmissor do vírus da dengue. A doença é transmitida somente através da picada da fêmea. A Organização Mundial da Saúde estima que 100 milhões de pessoas no mundo são infectadas anualmente, e cerca de 20 mil morrem em consequência da doença. Não há vacinas ou tratamentos específicos até o momento. Na tentativa de se controlar a dengue, cientistas de Oxford (Inglaterra) e Irvine (EUA) criaram mosquitos machos geneticamente modificados (Fu et al., 2010). A alteração foi feita no gene importante para a atividade muscular e voo, chamado actina 4. A alteração é pouco penetrante nos machos, que são capazes de voar e copular com fêmeas selvagens. Desse cruzamento é gerada uma prole totalmente mutante para o gene de interesse, na qual os machos são pouco ou nada afetados, mas as fêmeas são muito afetadas. Elas apresentam capacidade reduzida de sair da água após a emergência sendo, portanto, mais vulneráveis à predação. Quando saem da água, são incapazes de voar adequadamente, impossibilitando o contato com humanos. Existem questões éticas e de segurança relacionadas à liberação de animais transgênicos na natureza. Não se pode negar, no entanto, que os resultados apontam para alternativas no combate efetivo da dengue.

Metagenômica

- Com o progresso tecnológico dos métodos de sequenciamento, tornou-se possível a análise simultânea dos genomas de todas as espécies de microorganismos que compartilham um mesmo habitat. Esse emergente campo do conhecimento é chamado de Metagenômica

ou Ecogenômica, e já existem pesquisas com amostras de água doce e de oceanos, solos e microbiota de fósseis. Além de gerar informações biológicas em larga escala, e contribuir com o conhecimento científico, os dados podem ser aplicados, como, por exemplo, para a biorremediação de solos contaminados e para a descoberta de moléculas (especialmente enzimas) de interesse industrial e farmacêutico.

- Um consórcio de laboratórios europeus dedicou-se a compreender o impacto de micróbios que residem no intestino humano, dada a importância desses seres sobre nossa fisiologia e nutrição (Qin et al., 2010). Doenças intestinais e obesidade podem estar associadas a alterações dessa microbiota. Os cientistas usaram amostras fecais de 124 indivíduos europeus, entre saudáveis ou pacientes com doenças crônicas inflamatórias intestinais, diabetes ou obesidade. Foram caracterizados mais de 3 milhões de genes, sendo 99% desses pertencentes a bactérias. Estimaram que um indivíduo pode abrigar em seu trato intestinal no mínimo 160 espécies, de um conjunto de cerca de 1200, observada na totalidade das amostras analisadas. Muitos desses genes conferem a capacidade das bactérias sobreviverem e prosperarem em nossos intestinos. Outros genes estão associados com a captação de energia dos alimentos. As bactérias intestinais utilizam principalmente a fermentação para produção de energia a partir da conversão de açúcares (pectina, manose, frutose, sacarose, celulose) e ácidos graxos (gordura animal e vegetal). A partir de nossa dieta, as bactérias sintetizam, por exemplo, acetato, importante para a fisiologia de nossos músculos, coração e células nervosas. Os dados refletem a dependência humana desse metagenoma bacteriano para nosso bem-estar.

Silenciamento de genes

- Atualmente os geneticistas são capazes de “desativar” um gene, utilizando a técnica de “Interferência por RNA” (do inglês *RNA interference*, e sigla RNAi). O avanço se deve ao trabalho liderado por Andrew Fire e Craig Mello, publicado na revista Nature em 1998, que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 2006. A técnica baseia-se no uso de moléculas de RNA de fita dupla, em que uma das fitas possui complementaridade à sequência do RNA mensageiro (alvo) que se deseja silenciar. Essas moléculas são geralmente introduzidas nos organismos por injeção ou pela alimentação. Quando a molécula de RNAi encontra seu alvo no citoplasma, ativa-se uma maquinaria da própria célula hospedeira capaz de impedir a tradução do RNA mensageiro e, conseqüentemente, não se produzirá uma determinada proteína. A técnica viabiliza a descoberta da

função de um gene, pois, quando se impede sua expressão, as consequências são observadas nas alterações do fenótipo desses mutantes.

- Em abelhas, por exemplo, o silenciamento de um gene chamado vitelogenina, em operárias adultas, é capaz de mudar o comportamento, resultando num envelhecimento precoce da abelha. Ocorre que até cerca de 20 dias de vida adulta, uma operária desenvolve tarefas apenas no interior de suas colônias. A partir de então, mudam naturalmente seu comportamento, passando a cumprir atividades fora da colônia (forrageamento), como a busca por pólen, néctar, água e resinas e, indiretamente, promovem a polinização. Pesquisadores brasileiros injetaram moléculas de RNA de fita dupla em operárias recém-nascidas. As abelhas que receberam essas moléculas mudaram de comportamento antes de 10 dias, portanto, forrageando antes do previsto (Marco Antonio et al., 2008).

- Na prática, pesquisas médicas exploram o potencial terapêutico da técnica, por exemplo, no combate ao câncer, AIDS, hepatite e mal de Alzheimer. Os dados até o momento referentes às aplicações na medicina são apenas preliminares ou experimentais, mas apontam para um futuro promissor.

- No campo da produção alimentar, pesquisadores do Texas (EUA) apresentaram dados de experimentos *in vitro*, mostrando o silenciamento do gene miostatina em cultura de células de caprinos (Long et al., 2010). A expressão natural da miostatina impede o crescimento exagerado de músculos. Com base nesse experimento, os autores do trabalho querem agora silenciar artificialmente esse gene *in vivo*, buscando um efeito contrário, ou seja, o ganho de massa muscular, que geraria lucros dado o aumento da produção de carne.

Células-tronco

- As células-tronco têm sido um dos grandes alvos científicos nos últimos cinco anos. Muita esperança de cura de doenças e também debates éticos estão relacionados com o seu potencial terapêutico e ao uso de tecidos embrionários para pesquisas, respectivamente. São células totipotentes, isto é, totalmente indiferenciadas e que são capazes de se diferenciar em qualquer tecido. Assim, podem, potencialmente, substituir danos em órgãos e serem usadas em transplantes. Também criam perspectivas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes, leucemias, entre outras.

- De tantos exemplos, um deles, é a indução da

diferenciação de células-tronco em epiderme para o tratamento de queimaduras. Cientistas franceses conseguiram transformar, *in vitro*, células-tronco embrionárias humanas em células fenotipicamente similares a queratinócitos (células diferenciadas do tecido epitelial). Fizeram enxerto desses potenciais queratinócitos em camundongos e observaram, após 12 semanas, a formação da estrutura de uma epiderme pluriestratificada (Guenou et al., 2009).

- Uma alternativa ao uso de células embrionárias é a “desdiferenciação” de células adultas. Ou seja, células em estágio avançado de diferenciação podem ser reprogramadas geneticamente, retornando a estágios parcialmente indiferenciados ou também chamados de pluripotentes. Essa possibilidade é possível graças à pesquisa liderada pelo cientista Shinya Yamanaka, da Universidade de Quioto (Japão). Em 2006, Yamanaka e equipe descobriram um coquetel de moléculas (fatores de transcrição) capaz de induzir a pluripotência em células diferenciadas.

- Baseando-se no princípio e técnica de Yamanaka, um grupo de pesquisadores chineses gerou camundongos a partir de células pluripotentes induzidas (Zhao et al., 2009). Para tal, induziram pluripotência em fibroblastos de camundongos. Em seguida, geraram embriões tetraplóides (4N), na fase de blastocisto. Esses blastocistos servem como hospedeiros de células pluripotentes, criando um ambiente biológico propício e receptivo para a sobrevivência das células pluripotentes. No entanto, os blastocistos tetraplóides não contribuem genomicamente para o desenvolvimento do organismo. Em outras palavras, as informações genéticas para gerar os camundongos são exclusivamente oriundas do DNA contido do núcleo das células pluripotentes. Após injetar as células pluripotentes em embrião 4N, esses foram introduzidos no útero de uma fêmea adulta, para gestação. Os pesquisadores obtiveram 27 camundongos recém-nascidos que atingiram a fase adulta, mostraram-se férteis, cruzaram e tiveram prole viável.

Biologia Sintética

- A Biologia Sintética emerge como um campo científico em que o limite é a imaginação humana. Acaba de ser criada a primeira bactéria com genoma totalmente artificial. O pesquisador americano James Craig Venter e sua equipe trabalharam mais de uma década para conseguir tal feito. Eles sintetizaram quimicamente o genoma da bactéria *Mycoplasma mycoides*, que possui mais de 1 milhão de pares de bases. Para garantir a funcionalidade do genoma sintético, introduziram-no em outra bactéria,

chamada *Mycoplasma capricolum*, mas antes retiraram cromossomo da bactéria hospedeira. O genoma sintético foi capaz de controlar as funções biológicas para a correta replicação e crescimento da *M. capricolum*. Como esperado, a morfologia (fenótipo externo) das colônias bacterianas resultantes apresentou características de *M. mycoides*, o que prova o sucesso do experimento (Gibson et al., 2010).

Referências Bibliográficas

Fu G, Lees RS, Nimmo D, Aw D, Jin L, Gray P, Berendonk TU, White-Cooper H, Scaife S, Kim Phuc H, Marinotti O, Jasinskiene N, James AA, Alphey L. 2010. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. Proc Natl Acad Sci USA 107(10):4550-4554.

Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Merryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi ZQ, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC. 2010. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. Science. in press.

Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspina AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prüfer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Höber B, Höffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fordea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PL, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S. 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. Science 328(5979):710-722.

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. 2009. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet 374(9703):1745-1753.

Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, Ahmed A, Elleithy H, Ball M, Gaballah F, Wasef S, Fateen M, Amer H, Gostner P, Selim A, Zink A, Pusch CM. 2010. Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. JAMA 303(7):638-647.

Long CR, Tessanne KJ, Golding MC. 2010. Applications of RNA interference-based gene silencing in animal agriculture. Reprod Fertil Dev 22(1):47-58.

Marco Antonio DS, Guidugli-Lazzarini KR, Nascimento AM, Simões ZLP, Hartfelder K. 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. Naturwissenschaften 95(10): 953-961.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guamer F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464(7285):59-65.

Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A, Luria V, Wajid M, Baumer A, Belli S, Petukhova L, Schinzel A, Brivanlou AH, Barres BA, Christiano AM. 2010. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. Nature 464(7291):1043-1047.

Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, Hirbo JB, Awomoyi AA, Bodo JM, Doumbo O, Ibrahim M, Juma AT, Kotze MJ, Lema G, Moore JH, Mortensen H, Nyambo TB, Omar SA, Powell K, Pretorius GS, Smith MW, Thera MA, Wambebe C, Weber JL, Williams SM. 2009. The genetic structure and history of Africans and African Americans. Science 324(5930):1035-1044.

Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. Nature 461(7260):86-90.