

Lsdia1: um gene envolvido na quiralidade de moluscos



**Yasmin de Araújo Ribeiro^{1,2}, Vitor Nolasco de Moraes^{1,2},
Rodrigo Pantoni¹, Tiago Campos Pereira^{1,2}**

¹ Depto de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

² Programa de Pós-graduação em Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência - tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Palavras-chave: levógiro, dextrógiro, quiralidade, efeito materno, moluscos, *Lsdia1*

Genes relacionados à simetria dos seres vivos têm sido procurados há mais de um século. Finalmente, utilizando a técnica de edição de genes CRISPR/Cas9 e tendo como organismo modelo o caramujo *Lymnaea stagnalis*, cientistas puderam avaliar o efeito da perda do gene *Lsdia1*, que codifica uma proteína que participa da organização estrutural interna das células no início do desenvolvimento embrionário. Esse experimento mostrou que os caramujos mutantes que tinham o gene *Lsdia1* alterado apresentavam conchas em espiral no sentido anti-horário, enquanto os caramujos selvagens, que tinham o gene sem mutação, desenvolviam suas conchas no sentido horário. Esses achados sugerem o gene *Lsdia1* como um importante regulador da simetria nesses organismos. Pesquisas como essas têm grande importância para a comunidade científica, uma vez que ajudam a compreender melhor uma condição humana rara chamada *situs inversus*, na qual as posições dos órgãos são invertidas.



O efeito materno

Ao observar o personagem Gary do desenho animado Bob Esponja, amplamente conhecido pelos alunos dos ensinos fundamental e médio, é possível notar que este animal icônico apresenta uma concha. Os mecanismos genéticos associados à formação desta estrutura dos caramujos estão relacionados ao que chamamos de *efeito materno*.

O efeito materno é uma curiosa situação em que o fenótipo de um organismo não é determinado pelo seu genótipo interagindo com o meio ambiente, mas pelo genótipo de sua mãe. Tal fenômeno ocorre em algumas características que são estabelecidas ao longo dos primeiros estágios de desenvolvimento do embrião porque, durante o período inicial de desenvolvimento, o genoma embrionário não está ativo. Dessa forma, a coordenação das atividades celulares, inclusive as primeiras divisões, é realizada pelos produtos gênicos (RNAs e proteínas) presentes no citoplasma do zigoto. Esses produtos gênicos foram essencialmente herdados do citoplasma do oócito (haploide) e fornecidos pelas células companheiras (diploides) durante a oogênese. Entretanto, a inativação do genoma do embrião é apenas temporária, ou seja, em um período posterior do desenvolvimento embrionário, esse genoma entra em atividade. O processo de mudança do controle genético, que ocorre em um momento pós-fertilização, denomina-se transição materno-zigótica, portanto, são os produtos gênicos codificados pelo genótipo diploide da mãe que determinam as características observadas no início do desenvolvimento embrionário da prole, antes que o genoma do embrião torne-se ativo. Em especial, um subconjunto dos fenótipos dessa fase é irreversível, mantendo-se até a vida adulta e exemplificando o efeito materno clássico. Assim, por conta do efeito materno, mesmo que a prole apresente um genótipo “embrionário letal” (*ee*), isto é, que cause a morte do indivíduo durante o desenvolvimento embrionário, a prole sobreviverá devido à presença do produto gênico “E” herdado da mãe “Ee”.

Na natureza, a concha de um caramujo, como o personagem Gary, tem a **quiralidade** definida por genes de efeito materno (Figura 1). Assim, o efeito materno determina o enrolamento **levógiro** ou **dextrógiro** da concha. Esse tipo de herança ocorre somente em indivíduos selvagens, mas não em **mutantes**. Recentemente, pesquisadores identificaram um gene que está intrinsecamente relacionado à quiralidade. A ilustração ajuda a acompanhar e a entender melhor tal efeito.

Técnica de CRISPR e o gene *Lsdia1*

O processo de quebra da simetria do corpo, isto é, o surgimento de diferenças entre os lados esquerdo e direito anteriormente idênticos (simétricos), durante as fases iniciais do desenvolvimento, estão associados, em algumas espécies, à determinação do posicionamento de determinados RNA mensageiros e proteínas no citoesqueleto do ovócito/embrião, com posterior efeito na **morfogênese** e na **posição relativa dos órgãos**.

Dessa forma, a fim de investigar quais são os mecanismos por trás desse processo, cientistas utilizaram como organismo modelo o caramujo *Lymnaea stagnalis*, devido a características particulares bastante interessantes que a espécie possui: os indivíduos são **hermafroditas** e **apresentam quiralidade no enrolamento de sua concha**.

Em 2016, Reiko Kuroda e demais pesquisadores identificaram o gene *Lsdia1* (discutido adiante), como candidato principal da quiralidade da concha em *Lymnaea stagnalis*. Posteriormente, em 2020, os autores realizaram ensaios funcionais com o gene utilizando a técnica de edição gênica CRISPR (saiba mais em <https://tinyurl.com/yxtjtzqf>), a fim de determinar se, de fato, *Lsdia1* estava envolvido na quiralidade da concha dessa espécie de caramujo.

Quiralidade - é um atributo geométrico usado para designar um objeto que não se sobrepõe à sua imagem no espelho; propriedade de assimetria.

Levógiro - orientado no sentido contrário ao dos ponteiros de um relógio, para a esquerda.

Dextrógiro - qualidade dos elementos curvos que se voltam para a direita.

Indivíduo mutante - organismo portador de uma determinada mutação genética.

Morfogênese - desenvolvimento da forma e estruturas características de uma dada espécie que tem início no embrião.

Hermafroditas - organismos capazes de produzir gametas masculinos e femininos.

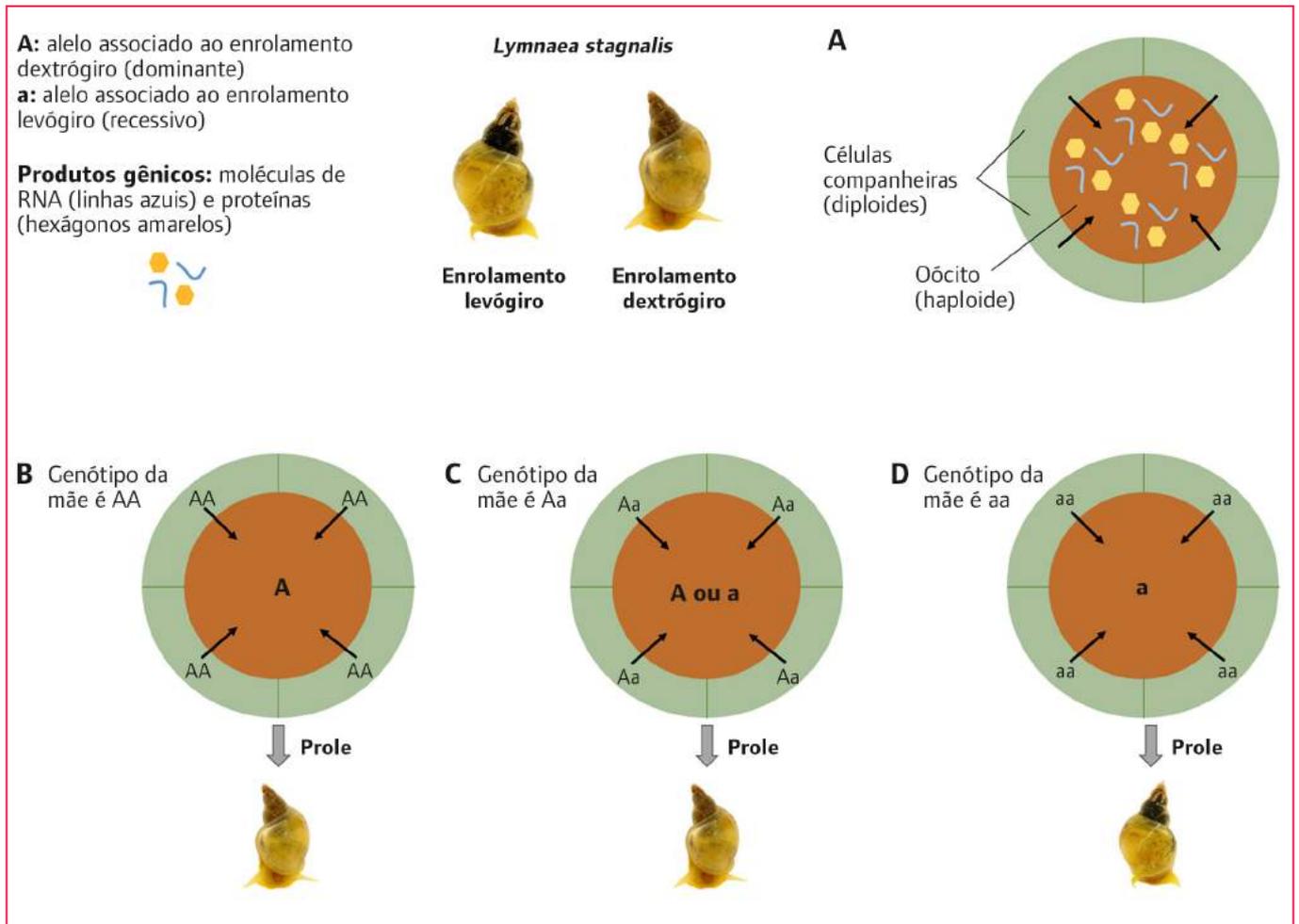


Figura 1.

Representação do efeito materno no caramujo *Lymnaea stagnalis*. O alelo "A" é dominante e codifica proteínas associadas ao enrolamento dextrógiro da concha do caramujo, enquanto o alelo "a" é recessivo e codifica proteínas associadas ao enrolamento levógiro. Os produtos gênicos fornecidos pelas células companheiras (diploides) ao oócito (haploide) são moléculas de RNA (linhas azuis) e proteínas (hexágonos amarelos). **A** - Ilustração do fornecimento de produtos gênicos das células companheiras ao oócito durante a oogênese. **B** - Exemplo de efeito materno no qual a concha da prole é dextrógira, visto que o oócito recebeu os produtos gênicos do alelo "A". **C** - Exemplo de efeito materno no qual a concha da prole é dextrógira, uma vez que o oócito recebeu produtos gênicos dos alelos "A" e "a"; no entanto, o alelo "A" (dextrógiro) é dominante. **D** - Exemplo de efeito materno no qual a concha da prole é levógira, afinal o oócito recebeu produtos gênicos do alelo "a". Imagem (fora de escala): Pantoni, R. usando elementos de Kuroda, R. et al. (2016), sobre licença CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nocautear - gerar mutações que inativem determinado gene de um organismo.

Para verificar tal envolvimento, os pesquisadores **nocautearam** o gene *Lsdia1* nos ovos de caramujos com concha dextrógira, a fim de criarem indivíduos mutantes nos quais o gene *Lsdia1* era não funcional. Assim, por meio de técnicas avançadas de edição gênica e cruzamentos controlados (autofertilização), os pesquisadores obtiveram indivíduos

que apresentavam mutações nos dois alelos (homozigoto mutante), os quais geravam proles com o desenvolvimento da concha em sentido contrário, do tipo levógiro (Figura 2). Tal efeito foi observado pelos pesquisadores em gerações seguintes, mostrando então que o gene *Lsdia1* está relacionado à quiralidade da concha nessa espécie.

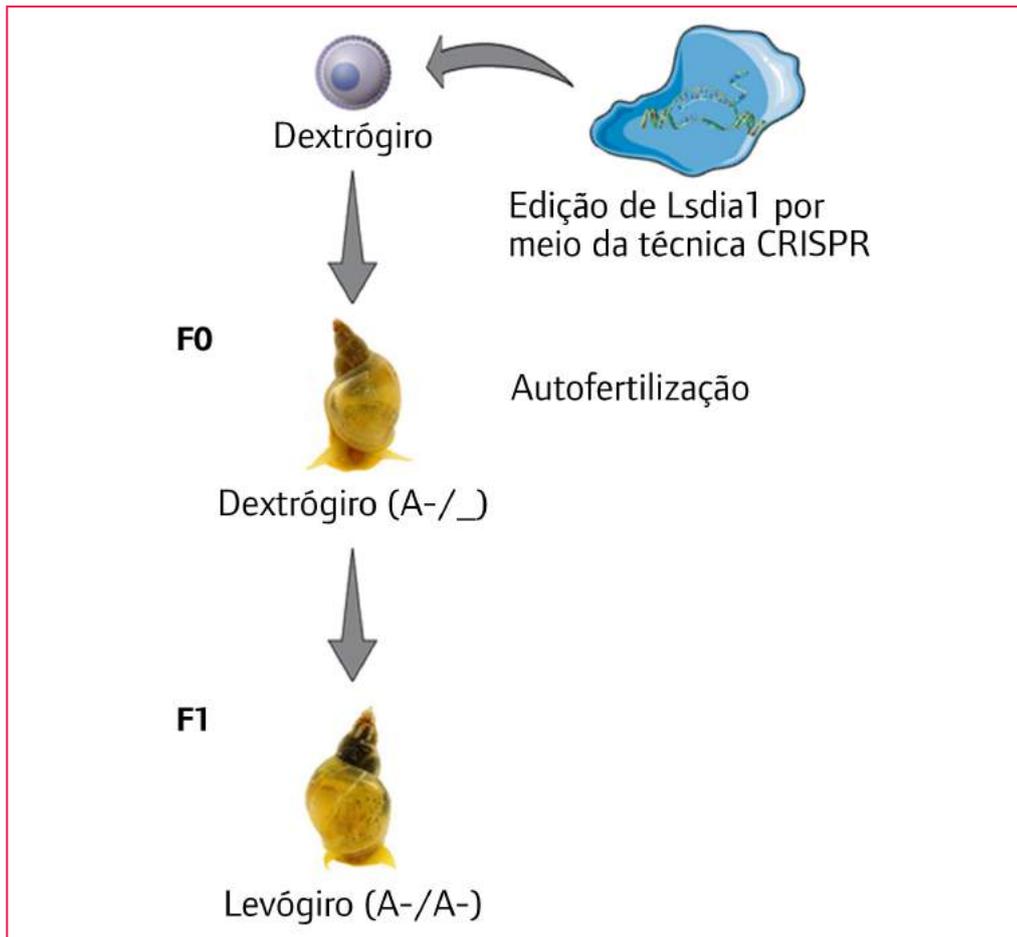


Figura 2. Obtenção de indivíduos com concha do tipo levógira (A-/A-) a partir de indivíduos com concha do tipo dextrógira (A-/_) editando o gene *Lsdia1* por meio da técnica CRISPR. Imagem (fora de escala): Moraes, V. N. usando elementos disponibilizados por Servier Medical Art (caramujo, setas, ovo, proteína e DNA <https://smart.servier.com/>).

Estrutura do gene *Lsdia1*

Em moluscos, o gene *Lsdia1* apresenta 25 éxons e 24 íntrons e seu RNAm é composto por 4933 nucleotídeos (nt). Destes, 3261 nt compreendem a região traduzida, gerando uma proteína por 1087 aminoácidos (aa); os demais 1672 nt constituem as regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs), frequentemente associadas com a tradução do RNAm e estabilidade do mesmo, respectiva, porém não exclusivamente (Figura 3). Esse gene é transcrito nas gônadas dos caramujos, e sua expressão foi identificada desde a **oviposição**, até a fase do desenvolvimento embrionário

denominada **gastrulação**, na qual seu nível de expressão diminui. Em humanos, como exemplo de gene **ortólogo**, temos o *DIA-PH1* que atua na regulação morfológica celular e na organização do citoesqueleto. Ainda considerando a nossa espécie, os estudos sobre *Lsdia1* podem ter implicações para uma melhor compreensão do *situs inversus*, uma condição bastante rara que afeta cerca de 0,01% da população humana e é caracterizada pela inversão das posições dos órgãos do indivíduo. Imagens radiográficas desta condição podem ser vistas e comparadas com a condição normal no artigo científico com o hiperlink a seguir <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219335/#!po=18.4211>

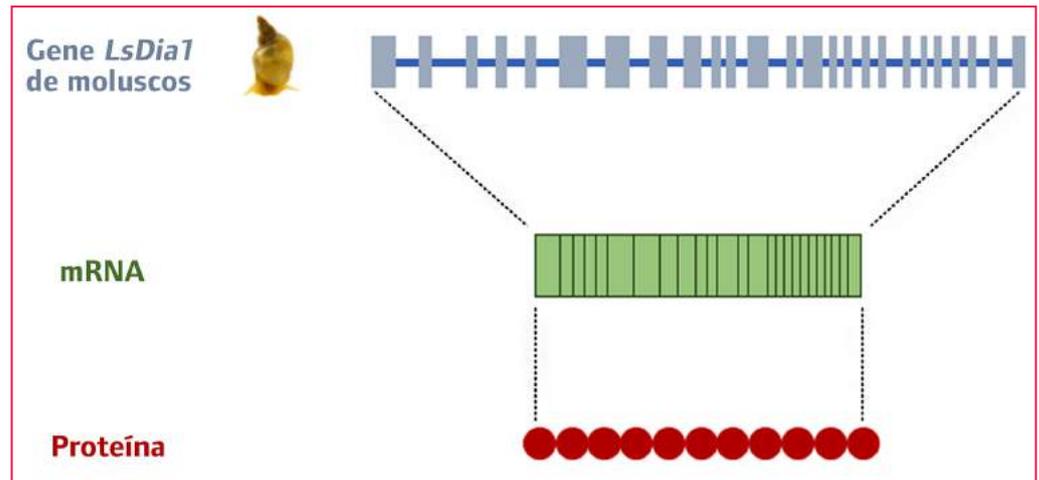
Gastrulação - etapa do desenvolvimento durante a qual o embrião no estágio de blástula dobra-se para o interior, produzindo uma estrutura embrionária tridimensional contendo três camadas.

Ortólogos - genes de espécies diferentes, mas que se originaram de um ancestral comum; geralmente apresentam as mesmas funções biológicas.

Oviposição - deposição de ovos por fêmeas de animais invertebrados.

Figura 3.

Representação do gene *Lsdia1*. O gene *Lsdia1* possui 25 éxons (retângulos em azul claro) e 24 íntrons (linhas horizontais contínuas entre os retângulos, em azul escuro). O transcrito (mRNA) possui 4933 nt e gera uma proteína de 1087 aa. Imagem (fora de escala): Ribeiro, Y.A. usando elementos disponibilizados por Servier Medical Art (caramujo, <https://smart.servier.com/>).



Mecanismo de ação de *Lsdia1*

Considerando o exemplo do caramujo *Lymnaea stagnalis*, o gene *Lsdia1* define o direcionamento das células, resultando no enrolamento típico (dextrógiro) da sua concha (Figura 1). Para entendermos como a definição deste enrolamento ocorre, precisamos compreender algumas etapas do desenvolvimento embrionário e a dinâmica do citoesqueleto.

Ovo - zigoto; formado pela união dos gametas feminino e masculino.

Polo vegetativo - região do ovo oposta ao polo animal e rica em vitelo.

do clivagem, durante o qual ocorrem divisões celulares do **ovo** (Figura 4), resultando nas primeiras células do organismo. O padrão de clivagem entre os organismos varia, sendo o caramujo *Lymnaea stagnalis* um representante do padrão clivagem holoblástica espiral (Figura 5).

Nesse padrão de clivagem, o ovo divide-se de forma diagonal, resultando em células menores e nucleadas, os blastômeros. Esse tipo de divisão permite que as células tenham considerável contato entre si e resultem em uma disposição em espiral. As clivagens iniciais formam blastômeros maiores, chamados de macrômeros, na região do **polo vegetativo**.

O desenvolvimento de um organismo multicelular inicia-se com um processo denomina-

Figura 4.

Representação da organização do ovo. O polo animal (região em laranja) caracterizado pela presença do núcleo e maior concentração de citoplasma; enquanto polo vegetal (região em verde) é caracterizado pela maior concentração de vitelo e se localiza abaixo do polo animal. Imagem (fora de escala): Ribeiro, Y.A.



Nas clivagens posteriores os macrômeros originam blastômeros menores, denominados micrômeros, na região do **polo animal** do ovo (vide Figuras 4 e 5). Em seguida, os micrômeros são direcionados para a direita ou para a esquerda do seu macrômero, resultando no espiral característico das conchas. Uma vez definida a direção, as células seguem se dividindo mantendo o padrão preestabelecido de enrolamento (Figura 5).

Durante as clivagens iniciais, a divisão celular entre caramujos com conchas dextrógiras e levógiras tem um aspecto espelhado: ocorre da mesma forma, porém, em sentidos diferentes. No entanto, nas etapas seguintes, o desenvolvimento torna-se consideravelmente diferente. Na terceira clivagem, em organismos com concha dextrógira, observa-se a rotação dos micrômeros no polo animal, e tal rotação resulta na deformação do macrôme-

Polo animal - região do ovo onde se encontra o núcleo da célula e que possui maior concentração de citoplasma.

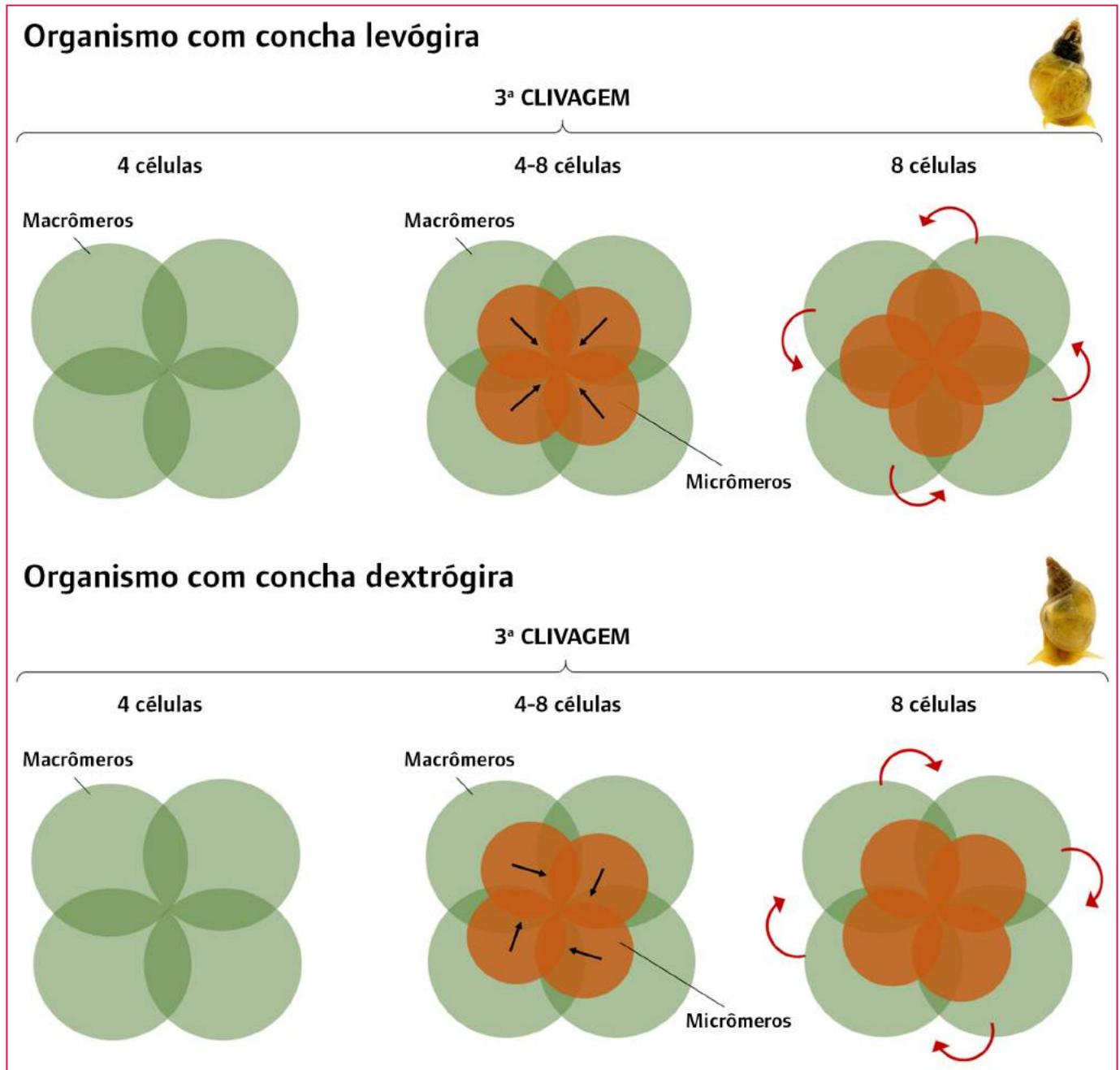


Figura 5. Representação da clivagem holoblástica espiral do ponto de vista do polo animal. Setas pretas indicam direção do fuso mitótico; setas vermelhas indicam direção de rotação das células; células verdes representam os macrômeros; células laranjas representam os micrômeros. Notar que ao longo da terceira clivagem o processo de divisão torna-se divergente, de modo que os fusos mitóticos são direcionados e, em seguida, os micrômeros seguem adquirindo rotação característica. Imagem (fora de escala): Ribeiro, Y.A., baseada em Abe, M. & Kuroda, R. (2020); caramujo de Kuroda, R. et al. (2016) com modificações, sobre licença CCBY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ro bem como na inclinação do fuso mitótico, o que não ocorre em organismos com concha levógira, sugerindo que a quiralidade é definida de acordo com as informações contidas em cada blastômero e explicando o porquê

dos micrômeros de embriões com concha levógira girarem apenas na terceira clivagem, após emergência não-quiral dos macrômeros (Figura 5). Esse mesmo processo pode ser visualizado *in vivo* na Figura 6.

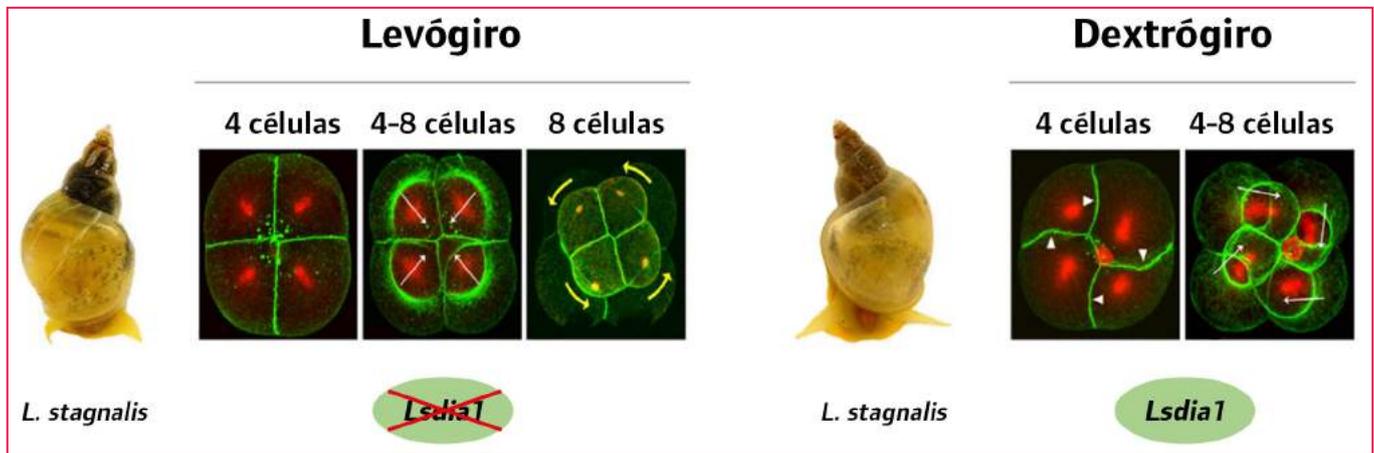


Figura 6.

Células de embriões de caramujo com concha tipo levógiro e caramujo com concha tipo dextrógiro durante terceira clivagem, do ponto de vista do polo animal. O caramujo com concha levógira, à esquerda, teve o gene *Lsdia1* mutado; enquanto o caramujo com concha dextrógira, à direita, apresentava o gene *Lsdia1* sem mutação. Os embriões foram corados para filamento de actina (verde) e β -tubulina (vermelho). As setas brancas indicam a rotação dos fusos mitóticos e as setas amarelas indicam a rotação dos blastômeros em direção ao estágio de 8 células do embrião com concha levógira de *L. stagnalis*. Imagem de Kuroda, R. et al. (2016) com modificações, sobre licença CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nucleação - é um processo de formação de agregados de subunidades proteicas que estabilizam uma extremidade e resulta no crescimento do filamento.

Polimerização - processo no qual monômeros se associam e dissociam em ambas as extremidades do filamento da actina.

Para compreendermos tal processo molecular, precisamos considerar a dinâmica do citoesqueleto. O citoesqueleto consiste em uma rede de proteínas que se estendem pelo citoplasma da célula. Essas proteínas atuam determinando a forma, o movimento e transporte de organelas e de outras estruturas celulares. A actina é a proteína em maior abundância no citoesqueleto e está envolvida na sua dinâmica, formando filamentos dispostos em rede que compreendem toda a célula.

Paralelamente, a proteína codificada pelo gene *Lsdia1* faz parte da família das forminas, que são caracterizadas por catalisarem a **nucleação** e a **polimerização** dos filamentos de actina, sinalizando a organização desta na célula. Assim, a ausência da proteína *Lsdia1* resulta em uma interferência em toda a dinâmica da actina e, conseqüentemente, do citoesqueleto. Ademais, a partir da terceira clivagem, outras conseqüências são evidenciadas além do sentido de rotação distintas entre os organismos, como a expressão assimétrica de genes (e.g. genes *nodal* e *pitx*). A expressão assimétrica também nos mostra que a presença da proteína *Lsdia1* rege o padrão de expressão de determinados genes da

célula ao longo do seu desenvolvimento embrionário.

A biologia molecular do mecanismo da quiralidade, bem como a dinâmica do citoesqueleto mediada pela actina, têm sido cada vez mais exploradas, e a relação destas com as forminas e as associações que são feitas estão sendo investigadas. A confirmação da importância e dependência do gene *Lsdia1* nesse processo é um passo importante para a elucidação do curioso fenômeno.

Para saber mais

ABE, M.; KURODA, R. The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development*, v.147, n.1, 2020. <https://dev.biologists.org/content/146/9/dev175976>

DE CARLI, G. J.; DE SOUZA, T. A. J.; PEREIRA, T. C. A revolucionária técnica de edição genética "CRISPR". *Genética na Escola*, 12(2), 114-123, 2017.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. *Biologia do desenvolvimento*. Artmed Editora, São Paulo, 2019.

KURODA, R., et al. Diaphanous gene mutation affects spiral cleavage and chirality in snails. *Scientific Reports*, v. 6, 34809, 2016.