

Parte 4

Conceito do Gene



8

Uso de Organismos-Modelo na Genética

Francisco G. Nóbrega e Mário H. Barros

Neste capítulo será possível se familiarizar com procedimentos básicos da genética experimental que tiveram grande sucesso por serem desenvolvidos em organismos particularmente apropriados para as manipulações de laboratório: os denominados *sistemas* ou *organismos-modelo*. Tradicionalmente, o progresso da ciência dependeu muito do desenvolvimento de novas ferramentas para explorar a natureza. Sem o microscópio, por exemplo, a teoria celular jamais poderia ter sido formulada. Os sistemas apresentados aqui são “ferramentas” vivas de laboratório, com as quais os investigadores podem, com facilidades de manipulação e baixo custo, avançar na investigação da vida, esclarecendo a função gênica.

Introdução

O nascimento da genética com os estudos de Mendel (cerca de 1860) dependeu de uma análise quantitativa cuidadosa do resultado de cruzamentos entre variedades distintas de ervilha com características comprovadamente estáveis geração após geração. Essa avaliação quantitativa inaugurou a biologia como ciência não apenas descritiva, mas definindo uma nova era de uma ciência particularmente complexa, que surgiu após o nascimento de ciências mais básicas como a matemática (cerca de 600 a.C), a física (cerca de 1600 d.C) e a química (cerca de 1770 d.C). Para que um estudo biológico tenha sucesso, ou mesmo para que qualquer investigação resulte em descobertas, um dos requisitos importantes é escolher o organismo experimental apropriado para o que se deseja investigar.

Para se estudar a correlação entre as abstratas unidades da hereditariedade, os genes, e as características visíveis, ou detectáveis, que compõem o fenótipo, o geneticista necessita de variação no organismo em estudo. Mendel usou ervilhas de porte alto ou baixo, com sementes lisas ou rugosas, com flores púrpura ou brancas etc. – ao todo, 7 pares de fenótipos facilmente identificáveis. No entanto, ervilhas demoram bastante para crescer e se reproduzir, apesar de terem um ciclo de vida bem mais curto do que cães ou elefantes. Assim, novos modelos foram sendo incorporados no estudo da herança genética, como a mosca das frutas *Drosophila*, o fungo *Neurospora*, vírus de bactérias e as bactérias, para citar apenas alguns sistemas modelos que sucederam as ervilhas de Mendel com grande sucesso e alguns dos investigadores que trabalharam com esses organismos.¹⁻³ Neste capítulo serão apresentados exemplos dos principais organismos-modelo usados em pesquisas genéticas.

Bactérias e vírus

Genética de bactérias | O começo

Os geneticistas dos anos 1940 desejavam avançar rapidamente na definição do mecanismo molecular responsável pela informação genética e de como ele seria capaz de modular o metabolismo celular. Alguns escolheram a bactéria *Escherichia coli*,

capaz de se dividir em aproximadamente 20 min em meio rico. Também notaram que a *E. coli* obtida da natureza (fezes animais), também chamada de “selvagem”, era capaz de crescer em meios bem simples ou “pobres”, como: água, sais (fornecendo nitrogênio, sódio, potássio, magnésio, fosfato, enxofre, e outros elementos essenciais) e uma fonte de carbono, como a glicose. Portanto, esse micróbio é capaz de sintetizar, a partir de substâncias simples, todas as dezenas de milhares de substâncias simples ou complexas necessárias para que uma célula funcione e se reproduza! Para se ter uma ideia mais objetiva e prática da ciência, será analisado como certos experimentos foram feitos com bactérias.

Como isolar, de uma amostra coletada na natureza, uma espécie única de bactéria? E como isolar, de uma espécie única, bactérias mutantes? Isso não foi feito com uma pinça microscópica, mas espalhando-se uma suspensão bem diluída sobre meio de cultura semissólido, semelhante à superfície de uma tigelada de gelatina. No laboratório, esse meio “sólido”, esterilizado a 120°C, é despejado em placas de Petri e gelifica após seu resfriamento, pois contém um polissacarídeo chamado ágar. Como a solução espalhada é diluída, as poucas bactérias presentes ficam separadas sobre a superfície do meio semissólido. Cada bactéria divide-se sucessivamente a cada 20 min ou mais, dependendo da capacidade nutricional do meio e de suas características. Mantidas à temperatura ideal (37°C), após 24 h já se pode ver, a olho nu, uma pequena colônia de cor variável onde havia apenas uma célula. Essa colônia é um “clone”, pois todas as células amontoadas são descendentes da célula original. Na verdade, é possível que uma ou mais células entre os milhões existentes na colônia tenham sofrido uma mutação espontânea. A partir de um desses clones, o pesquisador multiplica as células em meio líquido rico. Para buscar variantes ou mutantes espontâneos, em seguida espalha-se uma suspensão diluída sobre muitas placas de Petri com meio rico (Figura 8.1). Muitas colônias crescem, milhares separadas sobre as placas; algumas devem carregar mutações. E, para se estudar a genética das bactérias, são necessários os mutantes. Um modo de encontrá-los rapidamente é usando a técnica conhecida como *plaqueamento de*

réplica. Nessa técnica, a superfície de cada placa é pressionada suavemente sobre um veludo estéril que retém uma amostra de cada colônia, na disposição original. Essa impressão ou “carimbo” da placa é agora pressionada sobre várias placas, cada uma contendo um meio diferente, que possibilite identificar um tipo de mutante específico (Figura 8.1). No início dos estudos genéticos com *E. coli* e também com fungos como a levedura, os mutantes procurados costumavam ser deficientes nutricionais. Na placa original (Figura 8.1) eles serão coletados com um palito ou alça metálica estéril, testados novamente quanto à capacidade de crescer em meio mínimo suplementado e armazenados para estudos futuros. Esses têm, portanto, uma marca genética: são mutantes auxotróficos (como aminoácidos ou vitaminas, para crescerem como o aminoácido triptofano, ou uma vitamina). Dessa maneira, pesquisadores estabeleceram coleções de bactérias contendo uma, duas ou mais marcas genéticas, que se mostraram de enorme utilidade nos estudos subsequentes.

Interessava também aos geneticistas aumentar a taxa natural de mutações para acelerar os estudos. Muller¹, em 1927, mostrou como a exposição aos raios X aumentava espetacularmente o aparecimento de mutantes na mosca das frutas (*Drosophila*). Também se demonstrou que a luz ultravioleta induzia mutações abundantes em bactérias, assim como agentes químicos como o etilmetanosulfonato (EMS).

Uma das questões da época era se bactérias podiam também trocar material genético entre si, ou seja, ter uma forma de sexualidade. Usando uma coleção de mutantes auxotróficos duplos ou triplos, que exigiam diferentes aminoácidos ou vitaminas para crescer em meio mínimo, Lederberg e Tatum³ misturaram, dois a dois, muitos mutantes diferentes (ver boxe a seguir).

O casal de cientistas Joshua e Esther Lederberg fez importantes descobertas em genética de bactérias. Eles inventaram o método de plaqueamento em réplica usando veludo estéril e identificaram o fator F de fertilidade em *Escherichia coli*. Joshua descobriu a conjugação em bactéria, isolou muitos mutantes, iniciou o mapeamento dos genes de *E. coli* e recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1958, juntamente com E.L. Tatum e G. Beadle. Esther descobriu o fago lambda e sua capacidade de se inserir no genoma bacteriano, ficando latente (lisogenia), e a transferência de genes entre bactérias mediadas por fagos (transdução). Joshua interessou-se pela busca de vida na exploração do espaço, foi presidente da Universidade Rockefeller e assessor científico do governo dos EUA.

Deixados em contato por algum tempo em meio rico, eram depois plaqueados em meio mínimo. Em geral nada crescia, como seria esperado se as bactérias não trocassem material genético. Lederberg persistiu e certos cruzamentos produziram clones capazes de crescer em meio mínimo. Nesses casos, o par de bactérias envolvidas conseguiu trocar material genético. Estudos subsequentes revelaram o mecanismo completo do processo: uma das bactérias do par dispunha de genes que a tornava capaz de doar DNA para uma *E. coli* “receptora”. Os genes responsáveis pela capacidade de acasalamento estavam em um elemento extracromossômico (um plasmídeo, designado F, de fertilidade). O contato de uma célula F⁺ com uma F⁻ resultava na transformação da F⁻ em F⁺. Mais raramente, o plasmídeo F podia se recombinar com o cromossomo único e circular da *E. coli* (Figura 8.2). Essa célula tinha uma propriedade nova: quando acasalava com uma F⁻, iniciava a transferência de uma cópia do cromossomo da célula a partir do local no qual aconteceu a inserção do elemento. Esse tipo de célula, com o fator F integrado (Figura 8.2), foi batizada de Hfr por exibir alta frequência de recombinação genética com outras

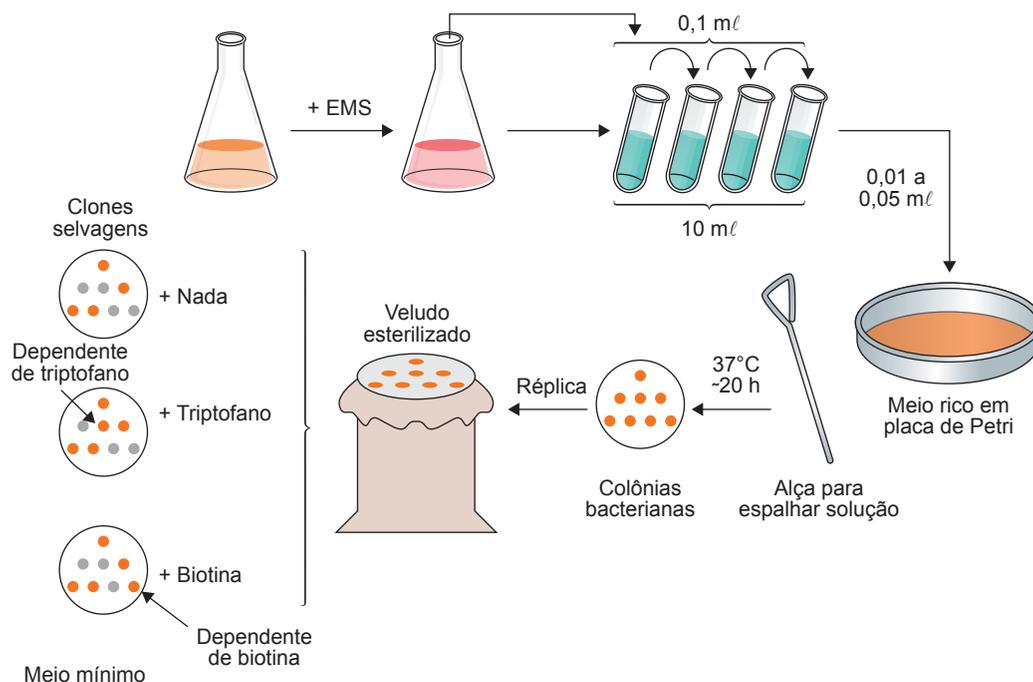


Figura 8.1 Para aumentar o número de mutantes em cultura, a bactéria *Escherichia coli* é tratada por algum tempo com etilmetanosulfonato, que induz à troca de bases no genoma. Diluições seriadas de 1 para 100 são feitas para espalhar em meio rico “sólido” em placa de Petri com uma alça de vidro esterilizada por flambagem (após imersão em álcool). Dezenas a centenas de clones devem aparecer após a incubação pela noite (37°C). No esquema, são representadas apenas 8 colônias “copiadas” por contato sobre um cilindro coberto com veludo esterilizado. Essa matriz servirá para transferir os clones para testes em placas de Petri em: (1) meio mínimo, (2) meio mínimo mais triptofano e (3) meio mínimo mais biotina. Na simulação, 4 clones crescem em meio mínimo – portanto, sem ter pedido a capacidade biossintética nutricional – e 4 não crescem em meio mínimo. Um deles cresce na placa suplementada com triptofano, e outro na suplementada com biotina.

células (*high frequency of recombination*). Essas descobertas levaram à conclusão de que a presença de células Hfr explica os resultados de Lederberg quando descobriu sexualidade em bactérias. Essas coleções de mutantes e o isolamento de células Hfr diferentes, isto é, com o plasmídeo F integrado em locais diferentes do cromossomo bacteriano, tornaram possíveis grandes progressos. Ao se promover o cruzamento de uma *E. coli* Hfr geneticamente caracterizada (Hfr H), selvagem para a síntese de treonina e leucina e também sensível a um antibiótico (estreptomicina), com uma *E. coli* com marcas diferentes que seja treonina⁻ e leucina⁻ algo muito interessante acontece (Figura 8.2). Inicialmente, isolam-se clones em placas de Petri com meio rico, contendo o antibiótico estreptomicina. As células doadoras são eliminadas. Réplica em meio mínimo com diferentes suplementos nutricionais torna possível identificar recombinantes que recuperaram a capacidade de crescer sem treonina ou/ e leucina. No entanto, esses clones aparecem em tempos diferentes de acasalamento. Sabe-se que as bactérias em processo de conjugação (o nome dado ao processo sexual bacteriano) estão ligadas por uma ponte fina pela qual a molécula de DNA é transferida a partir do local de inserção do fator F. Para acompanhar a transferência ao longo do tempo, o pesquisador recolhe amostras da mistura de conjugação e as agita fortemente para separar as conjugantes e interromper o acasalamento. A mistura então é analisada, como explicado anteriormente. O resultado mostra que a capacidade de crescer em treonina aparece antes da capacidade de crescer em leucina. Condições padronizadas de acasalamento foram definidas e os mutantes existentes foram sendo mapeados por esse processo. Com o domínio dessa técnica, foi possível descobrir que o cromossomo de *E. coli* é circular, criando um mapa que localiza os genes em unidades de tempo. O cromossomo todo mede cerca de 100 min, pois a velocidade de transferência do DNA durante a conjugação é de aproximadamente 45.000 bases/min. Os loci *thrA* e *leuA* distam 1,8 min entre si. O cromossomo da *E. coli* K12 foi completamente sequenciado em 1997 e contém cerca de 4,6 milhões de pares de bases e 4.300 genes. Portanto, agora já são conhecidas a localização e estrutura exatas de cada gene dessa bactéria.

Genes podem ser introduzidos em bactérias por três processos naturais: transformação, quando DNA livre existente no meio entra na célula e recombina com o cromossomo; transdução, quando um segmento de DNA é levado para dentro da célula por um vírus; e conjugação, o fenômeno que acabou de ser detalhado. Modernamente, esses fenômenos naturais estão sendo usados pela engenharia genética para especificamente inativar qualquer gene de interesse e estudar sua função, em geral, usando as possibilidades de clonagem e manipulação de DNA proporcionados por elementos extracromossômicos (plasmídeos) construídos em laboratório, a partir da modificação de plasmídeos naturais. Genes de outros organismos também podem ser introduzidos na *E. coli* e expressos de maneira a produzir proteínas heterólogas em grande quantidade, para as muitas aplicações da biotecnologia na indústria e na saúde humana e animal.

Genética de vírus | O começo

Com bactérias, fungos e *Drosophila*, os geneticistas construíram os primeiros mapas genéticos, usando a frequência de recombinação entre genes para estimar a distância entre eles. A quantidade de recombinantes é tão maior quanto mais distantes estão no cromossomo. Definida a localização de genes, a

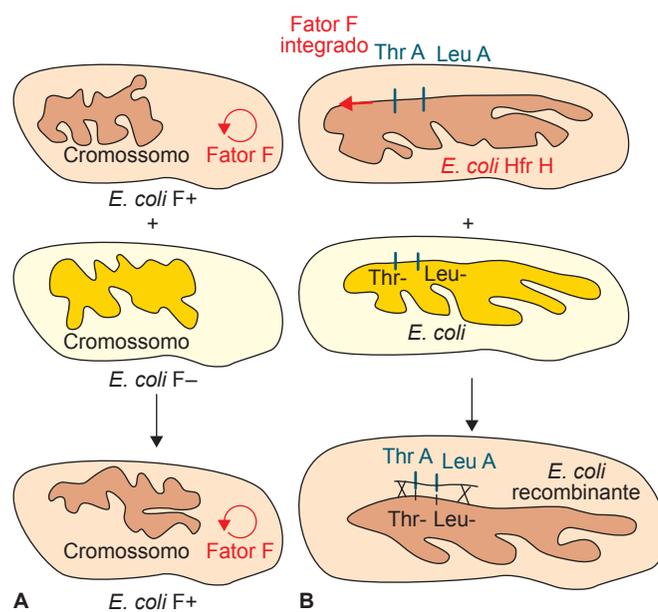


Figura 8.2 A. Resultado da conjugação de uma *Escherichia coli* F⁺ que carrega o plasmídeo de fertilidade com uma F⁻. Um pili serve de canal de ligação e transferência de uma cópia do fator F para a recipiente F⁻, que se tornará F⁺. **B.** A *E. coli* que conjugará tem o fator F de fertilidade integrado ao seu cromossomo próximo ao loci dos genes *Thr A* e *Leu A*, que fazem parte, respectivamente, da via de síntese da treonina e da leucina. Nesse caso, a conjugação leva uma cópia do fator para a bactéria receptora, arrastando a região vizinha do cromossomo contendo os genes *Thr A* e *Leu A*. Como a receptora tem esses genes inativos, será possível detectar se a recombinação entre os segmentos de DNA da doadora e da receptora recupera sua capacidade de sintetizar treonina e leucina.

pergunta seguinte passou a ser: qual é a estrutura interna de um gene? E, além disso, como estudar a estrutura fina de um gene? Novamente a resposta dependeria da escolha de um modelo experimental apropriado. Seymour Benzer⁴ enxergou nos vírus de bactéria (bacteriófagos ou fagos) o sistema ideal. A infecção de uma *E. coli* pelo bacteriófago T4 resulta na multiplicação do vírus no interior da bactéria que é lisada (estoura) e liberta centenas de novos vírus em poucos minutos. Esses vírus podem ser quantificados misturando-se uma suspensão de bactérias contendo uma pequena quantidade de ágar, com uma diluição da preparação de vírus e adicionando a mistura sobre uma placa de Petri contendo meio nutriente (Figura 8.3). O ágar aprisiona as bactérias, mas permite que os pequenos vírus se difundam. A quantidade de vírus deve ser bem menor do que a das bactérias, de maneira que se obtém um resultado semelhante ao plaqueamento para isolar clones de uma suspensão de bactérias. Os vírus liberados da primeira bactéria infectada se difundem no ágar e invadem as bactérias vizinhas (Figura 8.3). Enquanto isso, as bactérias não infectadas crescem, turvando a camada superficial de ágar, e o meio vai se esgotando.

No dia seguinte, o pesquisador encontrará, no interior da camada superficial de ágar, pequenas áreas circulares relativamente transparentes, chamadas placas de lise, que indicam o local onde havia um bacteriófago que destruiu as bactérias, eliminando a turvação típica. Uma placa de lise tem cerca de 10 milhões de partículas virais. Mutantes em uma região denominada rII do fago tornaram possível distinguir vírus mutantes de vírus normais simplesmente usando como bactéria indicadora a *E. coli* B, já que esses mutantes não formam placas

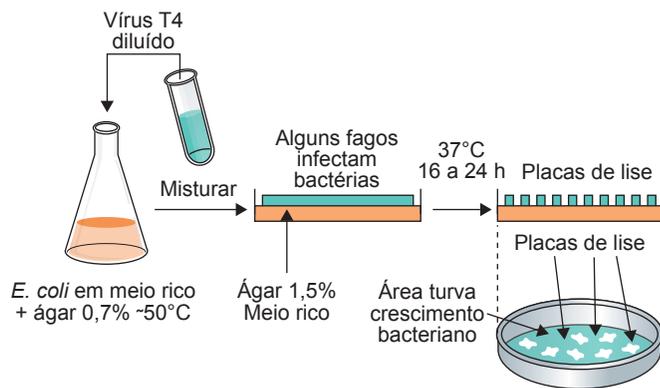


Figura 8.3 Contagem e isolamento de bacteriófagos. Uma cultura densa de bactérias sensíveis ao fago, em meio contendo pouco ágar, é inoculada com uma diluição do vírus e a mistura derramada sobre meio de cultura pronto para gelificar. As bactérias atacadas pelo vírus estão agora imobilizadas no ágar “mole” superficial, e sua progênie invade as bactérias vizinhas, que lisam formando um halo claro (placa de lise) que contrasta com as regiões turvas não infectadas.

com a *E. coli* K, promovendo identificação e análise genética. Uma enorme coleção de mutantes rII foi obtida das placas com aparência irregular, e tamanho maior que os mutantes rII normalmente exibem na *E. coli* B. Porém, mapear esses mutantes por recombinação exigiria analisar uma quantidade enorme de fagos filhos de infecções conjuntas da mesma *E. coli* com os dois fagos em teste. Assim, uma alternativa importante foi aplicada: os mutantes da coleção foram mapeados por cruzamento de cada mutante contra uma coleção de mutantes por deleção ou perda de segmentos maiores ou menores, que atravessavam a região rII. A Figura 8.4 mostra o princípio do mapeamento por cruzamento com mutantes de deleção. Cerca de 2.400 mutações foram mapeadas com esse sistema. A Figura 8.5 exemplifica o mapeamento de três mutações de ponto no gene rII. A distinção entre mutantes que afetam um único par de bases no DNA e uma mutação por perda de um segmento inteiro de DNA do bacteriófago se faz pela facilidade de reversão da mutação. Os mutantes “de ponto” reverterem com relativa facilidade, retornando ao fenótipo original. Aqueles com perda de um segmento (induzidos eficientemente por proflavina) não reverterem. Cruzamentos entre mutantes de ponto e por deleção tornaram possível verificar que a disposição tanto das mutações de ponto como das deleções pode ser representada sobre uma estrutura linear, algo fácil de se imaginar hoje, conhecendo-se a estrutura molecular do DNA, mas que não era evidente naquela época. Foi demonstrado que o gene tem estrutura interna e a sensibilidade do sistema é tal que possibilita detectar recombinação entre mutantes que diferem por troca de nucleotídeos entre bases vizinhas (Figura 8.5). Também se aplicou o teste de complementação com a coinfeção da bactéria com 2 mutantes, de maneira a determinar se as mutações estão em genes iguais ou diferentes. Nesse teste, a lise acontece imediatamente antes que haja tempo para produção de vírus normais por recombinação, caso as mutações estejam em genes distintos. Quando as mutações estão no mesmo gene, a lise só aparece tardiamente, pois depende do aparecimento do gene intacto gerado por recombinação entre os mutantes pertencentes à mesma unidade funcional (mesmo gene). A região analisada nesses estudos contém dois genes, A e B.

Experimentos também com a região rII do fago T4 possibilitaram que se soubesse, apenas usando genética, que o código

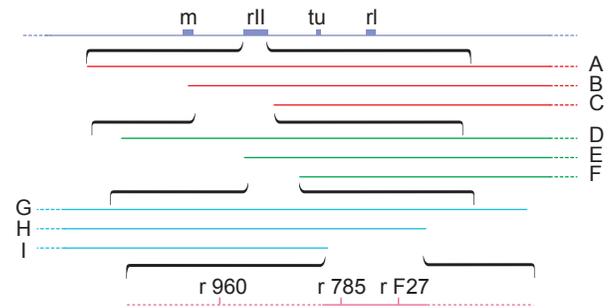


Figura 8.4 Esquema ilustrando o mapeamento de 3 mutantes de ponto na região rII: r960, r795 e rF27. Os mutantes são acasalados inicialmente com os mutantes por deleção **A**, **B** e **C** que delimitam regiões relativamente grandes no gene rII. Não há restauração do fenótipo selvagem nos cruzamentos com **A** e **B**, mas há com **C**. Portanto, os mutantes devem estar confinados ao segmento entre o extremo esquerdo de **B** e o início da deleção em **C**. Os cruzamentos são repetidos com os mutantes **D**, **E** e **F**, que delimitam sub-regiões do segmento anterior. Neste não há complementação por **D** ou **E**, mas geram selvagens com **F**. Está delimitada mais uma região menor na qual as mutações devem estar localizadas. Como os mutantes **G**, **H** e **I** cobrem sub-regiões do segmento anterior, os cruzamentos tornam possível definir uma região de aproximadamente 40 pares de bases, na qual estão localizadas as 3 mutações de ponto. O espaçamento entre elas pode ser definido medindo-se a frequência de selvagens oriundos de cruzamentos entre elas, duas a duas.

genético seria constituído por conjuntos de 3 bases, não sobrepostas, codificando para cada aminoácido. Esse trabalho foi realizado por Crick *et al.*⁵ A estratégia foi obter tipos especiais de mutantes que são preferencialmente induzidos com proflavina. Esse agente provoca a perda (deleção) ou o ganho (inserção) de um único nucleotídeo durante a replicação do DNA. Os pesquisadores obtiveram muitas mutações induzidas por proflavina em uma região pequena situada no início do gene B. Cada mutação única inativa o gene B. Cada mutante único foi, então, novamente tratado com proflavina, e os fagos que recuperaram a função haviam recebido uma nova mutação próxima à primeira. Verificou-se que toda mutação de adição ou perda, se associada a outra do mesmo tipo, resultava em proteína sem função (Figura 8.6). O resultado, para a proteína codificada, é uma alteração do quadro de leitura da mensagem, modificando completamente a sequência de aminoácidos a partir daquele ponto. A sugestão de que o código seria de trincas não sobrepostas veio do fato de que, se um mutante por perda sofresse mais duas mutações também de perda, próximas da primeira, o tipo selvagem era restabelecido (a fase de leitura voltava ao normal). Uma segunda mutação próxima do mesmo tipo da primeira (adição ou perda) não restabelecia a função do gene rII (Figura 8.6). Se a segunda mutação for de tipo diferente, há restauração da atividade do gene. Usando RNA mensageiros sintéticos ou RNA com 3 bases apenas (trincas) e um sistema de síntese proteica *in vitro*, Matthaei e Nirenberg⁶ e Khorana⁷ confirmaram que o código para cada aminoácido exige 3 bases, e identificaram todos os códigos genéticos correspondentes aos diferentes aminoácidos.

Neurospora crassa e Saccharomyces cerevisiae | As maiores contribuições do reino Fungi à genética

Louis Pasteur, por volta de 1860, descobriu a existência dos levedos, microrganismos necessários para o processo de

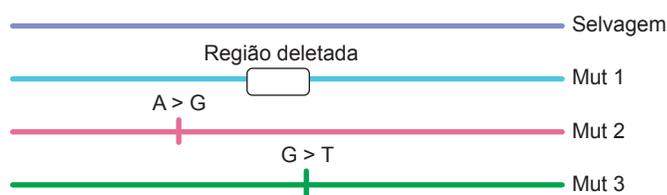


Figura 8.5 Mapeamento de mutações de ponto na região rII usando-se cruzamento com mutantes por deleção. Mut1 representa o genoma da fago T4 contendo uma região (assinalada) que foi perdida (deletada) por um evento mutacional, gerando um fago incapaz de crescer na cepa *Escherichia coli* K, mas que cresce na *E. coli* B. Mut2 é um mutante de ponto no mesmo fago na localização indicada. O genoma alinhado e esquemático do Mut3 exibe uma mutação de ponto de localização distinta de Mut2. Nenhum dos 3 mutantes cresce na *E. coli* K. O cruzamento entre dois fagos distintos se faz infectando com uma mistura de ambos uma *E. coli* B. Ao se multiplicar dentro de uma mesma célula, acontece recombinação entre os genomas. Os fagos resultantes são depois testados na *E. coli* K. O mapeamento se faz cruzando Mut1 e Mut2 (aparecem fagos que crescem em *E. coli* K, ou seja, houve reconstituição do genoma original). Cruzando Mut2 com Mut3 também aparecem fagos selvagens, porém, cruzando Mut1 com Mut3, não aparecem fagos capazes de crescer em *E. coli* K. Portanto, a mutação de ponto está localizada na região deletada.

fermentação da cerveja e do vinho. Ao estudá-los, estabeleceu o processo de fervura do vinho para eliminação de microrganismos contaminantes, que ficou conhecido posteriormente como processo de *pasteurização*. Mais tarde, movido inclusive pela rivalidade entre França e Alemanha, Pasteur dedicou-se ao estudo das leveduras com o claro objetivo de tornar a cerveja francesa melhor que a alemã. Esses trabalhos promoveram a identificação de microrganismos que muitos anos mais tarde tornaram-se modelos em estudos de genética.

Neurospora crassa e o nascimento da genética bioquímica

Neurospora crassa foi o protagonista no lançamento da era da genética bioquímica, com os trabalhos de Beadle e Tatum.⁸ Eles isolaram mutantes de *Neurospora* com deficiências bioquímicas específicas, que resultavam em auxotrofias, como

na síntese de arginina. Seus trabalhos foram facilitados pela possibilidade de cultivo em meio mínimo, no qual se podia adicionar, de modo independente, vitaminas ou aminoácidos, como a arginina (Figura 8.7).

Os pesquisadores isolaram mutantes que não cresciam sem esse aminoácido, e, por esses mutantes serem haploides, era possível cruzá-los entre si, verificando em seguida se os diploides formados tinham, ou não, restabelecido a capacidade de crescimento sem arginina. Em caso positivo, quando os diploides cresciam sem arginina, concluiu-se que os mutantes haploides tiveram suas deficiências enzimáticas complementadas, ou seja, os mutantes eram de grupos de complementação diferentes. Por outro lado, quando os diploides formados ainda eram incapazes de crescer sem arginina, a conclusão era de que se tratavam de mutantes do mesmo grupo de complementação, e as mesmas etapas enzimáticas estavam interrompidas nas linhagens haploides (Figura 8.8).

Cada uma das três classes de mutantes que Beadle e Tatum⁸ isolaram pelos testes de complementação caracterizava-se pelo acúmulo, ou não, de um composto específico em seu citoplasma. Assim, os mutantes da classe “A” acumulavam um precursor desconhecido, os mutantes da classe “B” acumulavam ornitina, e, os mutantes da classe “C”, citrulina. A adição de arginina ao meio de cultura havia promovido o crescimento das classes “A, B e C”; com citrulina sendo adicionada, cresciam “A e B”, e a adição de ornitina bastava somente para “B”. Por esse conjunto de resultados, chegou-se a uma via metabólica com precursor no início, e ornitina e citrulina sendo geradas na sequência para a síntese da arginina (Figura 8.9).

Pelo uso de *Neurospora* como modelo, surge aqui também uma nova maneira de se interpretar as variações fenotípicas derivadas da 2ª Lei de Mendel. Em um cruzamento entre cepas aaBB × AAbb, no qual o gene “A” é responsável pela síntese de ornitina e o gene “B” de citrulina, em F1 teria-se AaBb, ou seja, 100% de fenótipo selvagem (produz arginina). Enquanto isso, em F2 a proporção clássica 9:3:3:1 estaria alterada em 9, que sintetizam arginina para cada 7 que não sintetizam, ou seja, um caso de epistasia recessiva dupla. Na epistasia, a expressão fenotípica de um dado *locus* gênico pode ser alterada por outro *locus* gênico.

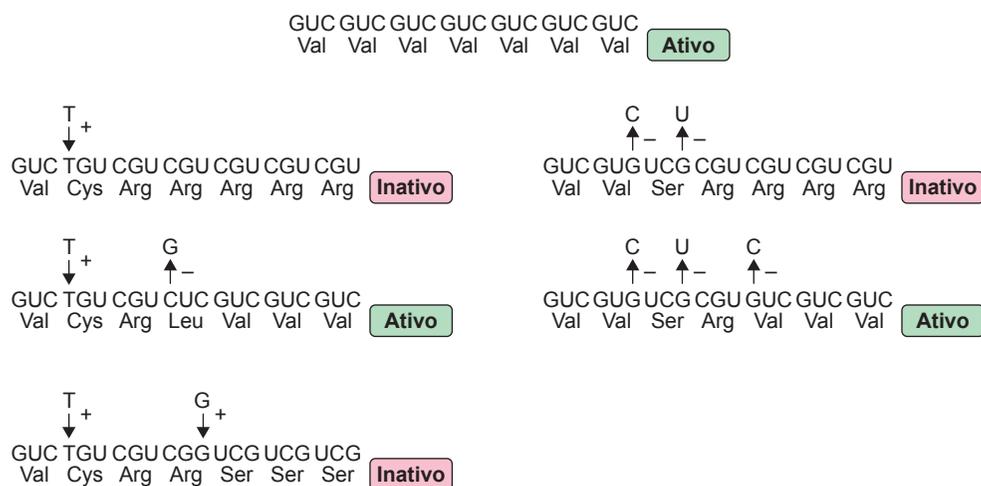


Figura 8.6 Esquema ilustrando mutações induzidas por proflavina, que resultam em inserção, ou perda, de uma base no DNA. Uma pequena região do fago T7 foi estudada e inserções ou deleções próximas comportam-se como indicado, coerente com a hipótese de um código genético formado por trinças não sobrepostas e lidas a partir de um ponto fixo.

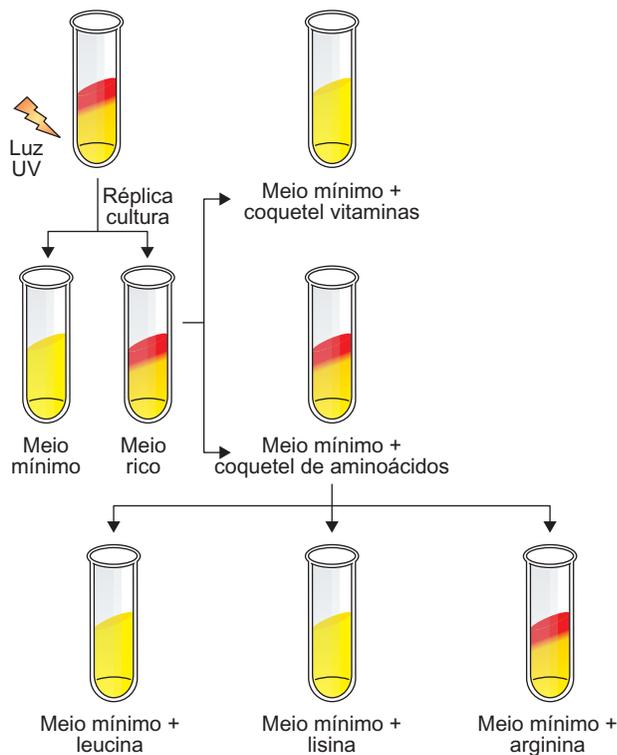


Figura 8.7 Esquema da mutagenese realizada por Beadle e Tatum. Cultura selvagem de *Neurospora crassa* é irradiada em meio rico com luz ultravioleta. Na sequência, colônias isoladas da mutagenese foram replicadas em diferentes meios de cultura, com diferentes suplementações, até a identificação de isolados que cresceram somente com a adição de arginina.

Neurospora crassa encaixou-se como modelo nos experimentos de Beadle e Tatum⁸ por diversas características favoráveis, tais como: ciclo de vida com alternância entre gerações – haploide e diploide; facilidade de cruzamentos; possibilidade de seleção usando diferentes meios de cultivo; ciclo de vida curto. Além disso, esses experimentos ajudaram a compreender as variações fenotípicas que colocavam em cheque a 2ª Lei de Mendel, e, por fim, responderam precisamente a uma proposição do médico inglês Sir Achibald Garrod, feita já em 1909. Garrod⁹ propôs a existência de erros inatos do metabolismo, que seriam derivados de deficiência enzimática específica. Assim, o indivíduo já nasceria com uma dada enzima não funcional que acarretaria algum problema metabólico. Beadle e Tatum⁸ foram os primeiros a mostrar com seus estudos em *Neurospora* que o defeito enzimático do metabolismo que estudavam era decorrente de uma alteração genética e, por essa contribuição, também receberam o Prêmio Nobel de medicina em 1958.

Saccharomyces cerevisiae | A levedura da cerveja é um dos principais modelos de funcionamento da célula eucariótica

Saccharomyces cerevisiae, assim como *N. crassa*, é um fungo da divisão dos ascomicetos; e embora sua importância econômica já houvesse sido percebida por Louis Pasteur, estudos iniciais envolvendo sua manipulação genética remontam à década de 1930. Diferentemente de *N. crassa*, *S. cerevisiae* não é um fungo filamentosos, mantém-se como organismo

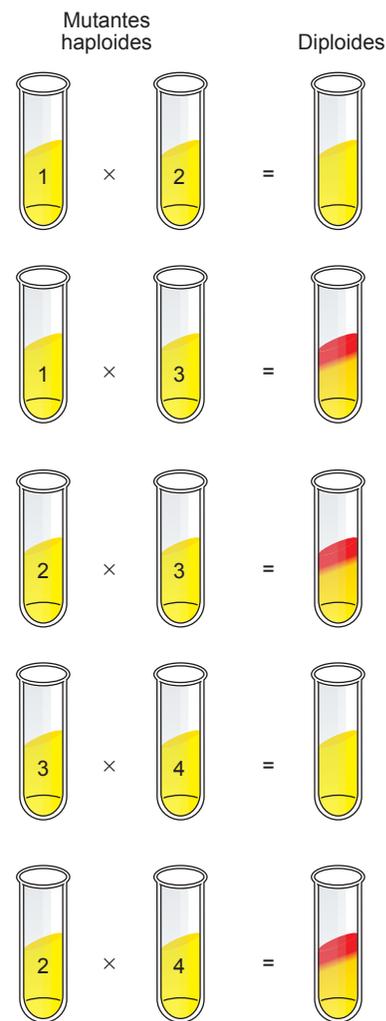


Figura 8.8 Teste de complementação dos mutantes de *Neurospora crassa* deficientes na síntese de arginina. O crescimento do diploide em meio seletivo (sem arginina, indicado pela cor vermelha) define se os respectivos mutantes haploides pertencem a grupos de complementação distintos, ou seja, apresentam mutações em genes diferentes. Já o não crescimento do diploide indica que as mutações presentes nos haploides representam alelos do mesmo gene. No exemplo, há dois grupos: (1,2) e (3,4).

unicelular, com suas leveduras dividindo-se por brotamento. As linhagens de laboratório podem se manter indefinidamente nos estados haploide e diploide, favorecendo o estudo de genes essenciais para a vida e as relações de dominância entre alelos. Seu DNA genômico apresenta poucos íntrons e sequências não codificantes, comparativamente a outros eucariotos. O *S. cerevisiae* pode ser manipulado geneticamente com tanta facilidade quanto *E. coli*, isto é, pode ser transformado com plasmídeos, seus genes interrompidos e marcados. Assim, pode-se dizer que *S. cerevisiae* é ainda mais simples que *N. crassa* e talvez, por conta dessa simplicidade, tenha prevalecido como principal modelo de funcionamento da célula eucariótica e muito conveniente para estudo da genética bioquímica – ou do dueto *gene-função*. Adicionalmente, como consegue gerar energia tanto por fermentação como por oxidação completa via mitocondrial, tornou-se organismo-modelo nos estudos da genética mitocondrial, com facilidade para análise tanto de genes do genoma da organela, como dos

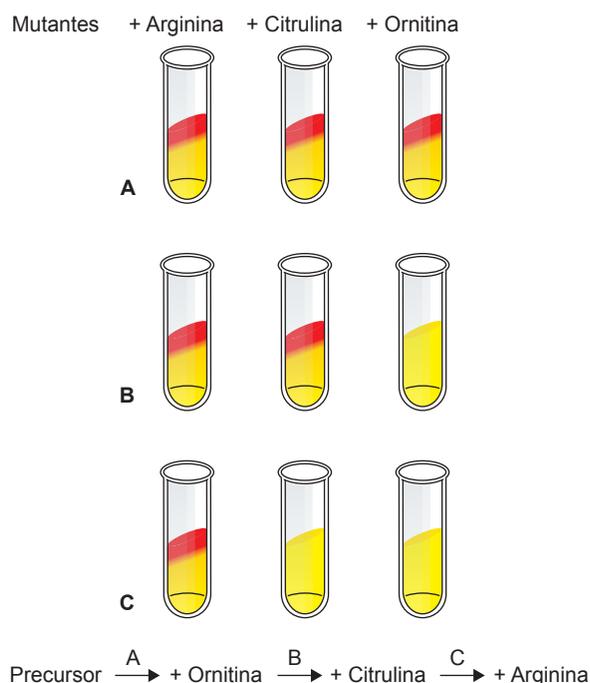


Figura 8.9 A adição diferencial de intermediários da via biossintética da arginina, como ornitina e citrulina, promoveu a identificação de qual etapa específica da via estava interrompida em cada uma das classes de mutantes de *Neurospora crassa* inicialmente isolados.

genes nucleares que afetam a função mitocondrial. Entretanto, há algumas diferenças importantes com as células de mamíferos, como no modo de divisão celular: *S. cerevisiae* divide-se por brotamento, sua célula não apresenta centríolos, e, como os fungos em geral, tem uma parede celular composta de polissacarídeos complexos associados a proteínas.

Suas células haploides podem existir de duas formas: o tipo sexual "a" e o tipo sexual "α". Na ocorrência de um encontro entre células do tipo sexual oposto, elas sentem o tipo oposto por feromônios e alteram sua morfologia, tornando-se mais alongadas, preparando-se para a fusão celular da qual segue a cariogamia. O diploide formado também é muito estável, mas pode sofrer meiose e gerar quatro novos haploides, dois tipo "a" e dois tipo "α", caso haja falta de nitrogênio no meio (Figura 8.10).

Inicialmente, a levedura *S. cerevisiae* foi usada na geração de imensas coleções de mutantes, com cada laboratório preocupado em elucidar diferentes aspectos do seu metabolismo. Esse esforço levou a grandes avanços no conhecimento sobre a regulação do ciclo celular, formação do citoesqueleto, metabolismo energético e homeostase de íons. Conhecimentos aplicáveis à maioria dos organismos eucariotos.

Essa forma tradicional da genética alia a geração de mutantes com o uso de bibliotecas genômicas de DNA (ver Capítulo 12) para identificação do gene causador do fenótipo mutante. Por exemplo, um dado mutante com fenótipo de deficiência respiratória é isolado. A deficiência respiratória em levedura pode ser detectada pela incapacidade de crescimento das células em meio contendo unicamente fontes de carbono não fermentáveis, como o etanol. Esse mutante é transformado com uma biblioteca genômica, buscando-se transformantes que tenham restabelecido a capacidade de crescimento em meio seletivo para a atividade respiratória. Identificado esse

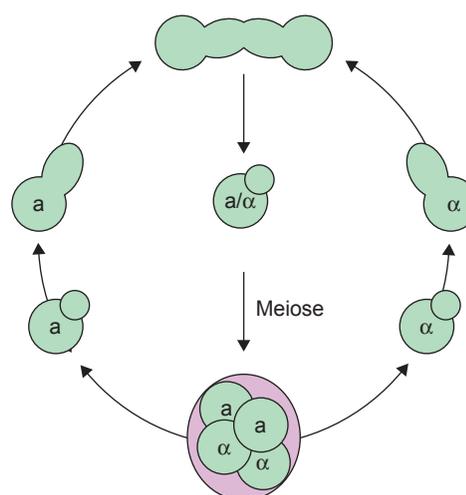


Figura 8.10 Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*, alternando fases haploide e diploide de crescimento. Leveduras haploides do tipo sexual "a" e "α" no mesmo meio de cultura podem se comunicar por feromônios e iniciar o ciclo sexual, que inclui a mudança de forma das células que captaram a presença dos feromônios até a fusão com as células de tipo sexual oposto, formando um diploide. O diploide em determinadas condições de cultivo, como falta de nitrogênio, sofre meiose, gerando quatro células filhas: duas do tipo sexual "a" e duas do tipo sexual "α".

transformante, faz-se o isolamento do plasmídeo para posterior sequenciamento e consequente identificação do gene responsável pela restauração do crescimento. Esse mesmo gene deve estar, portanto, inativo na linhagem mutante original.

Em 1996, *S. cerevisiae* tornou-se o primeiro eucarioto a ter o seu genoma totalmente elucidado, e, a partir desse ponto, inúmeros trabalhos procuraram descrever a função de todos seus genes, as interações entre seus produtos gênicos, como são regulados frente a diferentes situações de estresse, entre outros objetivos. Em 1998 já estava disponível toda a coleção de mutantes de levedura, isto é, consórcios de laboratórios internacionais inativaram cada um dos mais de 6.000 genes de *S. cerevisiae*. Conhecendo o genoma, a prática da chamada *genética reversa* tornou-se possível, passando a ser usada sistematicamente, pela primeira vez com um eucarioto, para elucidar a função dos genes.

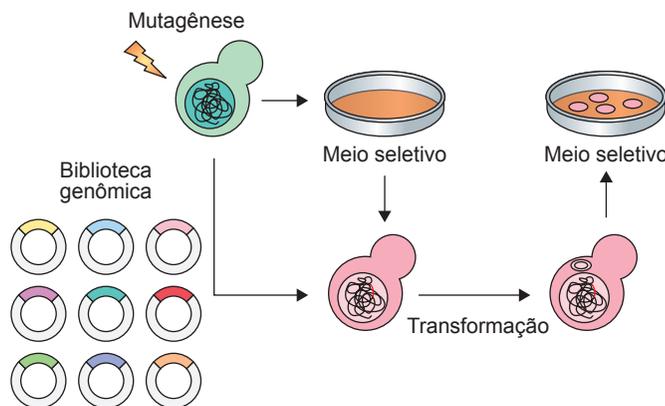
A genética clássica visa à identificação dos genótipos de variantes fenotípicas, prática aplicada por Sturtevant e Morgan² quando queriam obter a explicação para a cor do olho branco de *Drosophila*, e também por Beadle e Tatum⁸ quando estudavam o metabolismo enzimático de mutantes de *Neurospora* que precisavam de arginina.

Na genética reversa, busca-se a função de um gene a partir da sua inativação. Portanto, o genótipo é conhecido e o interesse está na busca pelo fenótipo, ou seja, é o contrário do que se faz na chamada genética clássica quando se inicia com um mutante ou variante (Tabela 8.1). Usando uma biblioteca de plasmídeos que expressem individualmente um a dois genes de levedura, e um gene marcador, se uma deficiência de um mutante é curada por um plasmídeo transformante (Figura 8.11), recuperando-se o plasmídeo e identificando-se o gene expresso neste, é possível estabelecer conexão entre o fenótipo mutado e o gene responsável pela função alterada.

Alguns fenótipos são facilmente detectáveis pelo uso de meios seletivos, como aqueles usados em *Neurospora* para identificação dos mutantes na síntese de arginina, o chamado

Tabela 8.1 Principais diferenças entre genética clássica e genética reversa.

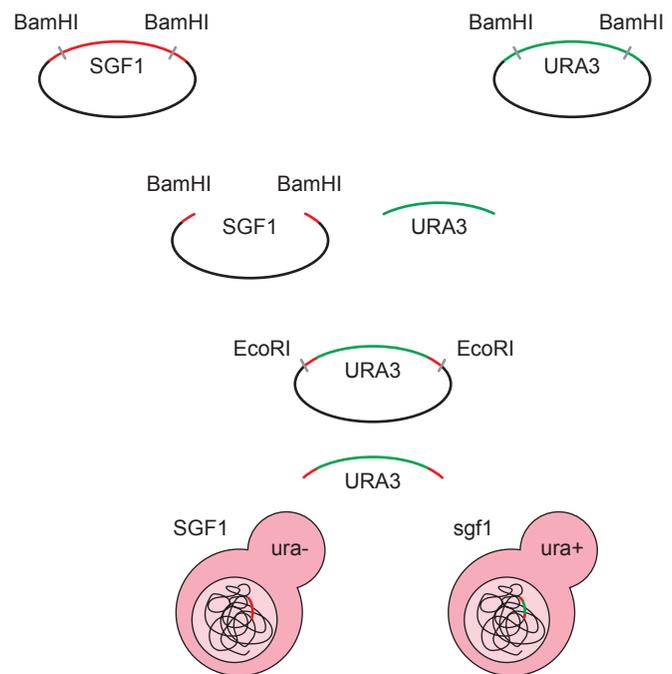
Genética clássica	Genética reversa
Fenótipo mutante ↓	Sequência DNA ↓
Alelo mutante	Alelo mutante
Sequência DNA	Fenótipo mutante

**Figura 8.11** Esquema para isolamento de mutantes incapazes de crescer em determinado meio de cultura seletivo. Leveduras mutadas tornaram-se incapazes de crescer no meio seletivo de interesse. Mutantes isolados podem, então, ser transformados com uma biblioteca genômica construída a partir da fragmentação do DNA de uma cepa “selvagem”. Eventualmente, um dos plasmídeos da biblioteca deve conter o gene inicialmente mutado na levedura de origem, possibilitando o seu crescimento no meio seletivo. Dessa maneira, determina-se que esse gene é necessário para o crescimento nesse meio.

meio mínimo. Esse meio pode ser usado para identificar mutantes para qualquer nutriente essencial. Há enorme facilidade também na identificação de mutantes com deficiência na respiração celular, bastando replicá-los para meio de cultura contendo fontes de carbono impossíveis de serem fermentadas, como o etanol. Resistência às mais variadas substâncias, a estresses ambientais (como choque osmótico), e a agentes oxidantes perfaz várias outras categorias de fenótipos a serem testados. Mesmo com toda essa possibilidade de testes, ainda existem centenas de genes de levedura cuja inativação não leva a qualquer fenótipo realmente informativo, dificultando sobremaneira sua caracterização funcional.

A construção de um alelo nulo de dado gene é bem simplificada em *S. cerevisiae* (Figura 8.12):

1. Eleja o seu gene favorito (*SGF1*) e, após copiá-lo com uma reação de polimerase em cadeia (PCR), coloque-o em um plasmídeo que possibilite sua clonagem.
2. Conhecendo seus locais de restrição, remova a porção central do gene (ou ele inteiro) e coloque no seu lugar um novo gene, chamado *gene repórter*, deixando nas extremidades uma extensão de DNA suficiente para que haja recombinação homóloga.
3. No plasmídeo recombinante, o gene repórter estará flanqueado pelas sequências que no cromossomo de levedura flanqueiam o *SGF1*.
4. Remova o inserto recombinante contendo o gene repórter ladeado por sequências flanqueadoras de *SGF1* com enzimas de restrição.

**Figura 8.12** Etapas envolvidas na construção de um alelo nulo para seu gene favorito (*SGF1*). O gene *SGF1* é clonado em um plasmídeo, e boa parte de sua sequência é removida por digestão com enzimas de restrição (*HindIII* e *PstI*). O gene *HIS3* está em fragmento de DNA ladeado pelos locais das mesmas enzimas de restrição, e pode se ligar ao plasmídeo que contém as sequências que flanqueavam o gene *SGF1*. *HIS3* servirá como o gene repórter da inativação de *SGF1*. Por meio da digestão com *EcoRI*, o fragmento contendo *HIS3* ladeado por sequências de *SGF1* é liberado e usado para transformar leveduras que necessitam de suplemento de histidina para crescer. Selecionam-se as leveduras transformadas pela capacidade de crescer sem suplemento de histidina. O gene *SGF1* foi inativado e, em seguida, se estudará qual função celular foi afetada por isso.

5. Promova a transformação de levedura. Com esse fragmento de DNA, a recombinação homóloga ocorrerá entre as sequências flanqueadoras de *SGF1* do inserto e do genoma.
6. As células com o gene modificado são identificadas pelo fenótipo conferido pelo gene repórter. Por exemplo: resistência a um inibidor do crescimento, ou capacidade recuperada de crescimento em linhagem com uma deficiência nutricional conhecida. Essas células correspondem, portanto, a mutantes nulos do gene *SGF1*. Caso o gene seja essencial, a célula morre, e o estudo desses genes exigirá estratégias especiais.

Essa estratégia básica de transformação da levedura com genes modificados também promove o estudo do efeito de mutações em regiões específicas do gene, por exemplo, substituindo um resíduo de aminoácido por outro. Usando iniciadores que carregam a mutação desejada (sintéticos) e a técnica de PCR, um gene alterado pode ser construído e depois colocado no interior da levedura que tenha esse gene “nocauteado”, como explicado anteriormente. Esse novo gene costuma ser carregado por um plasmídeo de cópia única ou multicópia para examinar sua competência funcional. Sua expressão pode estar sendo controlada pelo promotor normal do gene ou por um promotor regulável, como o do gene *PGK* (fosfoglicerato quinase), que é induzido por glicose, ou *GAL1*, induzido por galactose. *S. cerevisiae* também pode ser útil na investigação

da função de genes vindos de outros organismos por complementação heteróloga, o que tem promovido a ampliação do conhecimento sobre genes humanos.

Caenorhabditis elegans | O verme de 959 células somáticas

“You have made your way from worm to man, but much within you is still a worm” (“Você fez seu caminho de verme a homem, mas muito dentro de você ainda é um verme.”)

Assim falou Zarathustra, Friedrich Nietzsche.

Caenorhabditis elegans é considerado um ótimo modelo para o estudo da regulação e função gênica, tendo atraído a atenção de diversos pesquisadores que o elegeram como o organismo ideal para a análise do destino das células durante o processo de desenvolvimento. Algumas de suas características que contribuem para essa posição de destaque são:

- É um organismo multicelular que passa por um sistema de desenvolvimento que inclui embriogênese e morfogênese
- É de fácil manutenção e cultivo em laboratório
- Seu ciclo de vida é curto. Dois dias e meio, a 25°C, é o tempo necessário para que um indivíduo se desenvolva de zigoto à forma adulta. As gerações podem se suceder a cada 4 dias e um verme vive por 3 a 4 semanas
- Por ser transparente, com 1 mm de comprimento, seu crescimento é facilmente acompanhado, sendo possível traçar o padrão de desenvolvimento e localização de todas as suas células.

O *C. elegans* apresenta dois tipos sexuais, macho e hermafrodita. A autofertilização dos hermafroditas possibilita a geração de linhagens isogênicas, com indivíduos geneticamente idênticos. Apresenta 5 pares de cromossomos autossômicos; os machos têm um cromossomo sexual (X0), enquanto os hermafroditas têm um par do cromossomo sexual (XX).

No que tange à análise genética, o uso de *C. elegans* começou a ser difundido a partir do trabalho de Brenner¹⁰, publicado em 1974. Brenner estava interessado em entender o desenvolvimento neuronal e como sua complexidade seria determinada pelo programa genético. Assim, valendo-se da facilidade de realizar mutagenese em *C. elegans*, ele buscou mutantes com alterações de comportamento e desenvolvimento relacionados com o sistema nervoso. Na sequência, realizou inúmeros testes de complementação, cruzando machos selvagens com hermafroditas mutados a fim de determinar o número mínimo de genes que estariam relacionados com cada um dos fenótipos identificados.

Por exemplo, considere que Brenner identificou dois vermes com problemas de coordenação e os chamou de *mut1* e *mut2*. Após identificar que se tratava de mutações recessivas, não ligadas ao sexo, e criar hermafroditas e machos homocigotos para cada uma delas, o cruzamento apresentado na Figura 8.13 poderia ser realizado.

Se a progênie desse cruzamento resultar em indivíduos normais, pode-se estabelecer que *mut1* e *mut2* são mutações de genes distintos; e se, por outro lado, na progênie os indivíduos também apresentarem problemas de coordenação, as mutações estariam em um mesmo gene, com *mut1* e *mut2* sendo alelos desse gene. Em seu trabalho inicial, Brenner estudou cerca de 400 mutantes com problemas de coordenação de movimento que, após os testes de complementação, promoveram a identificação de 71 genes.

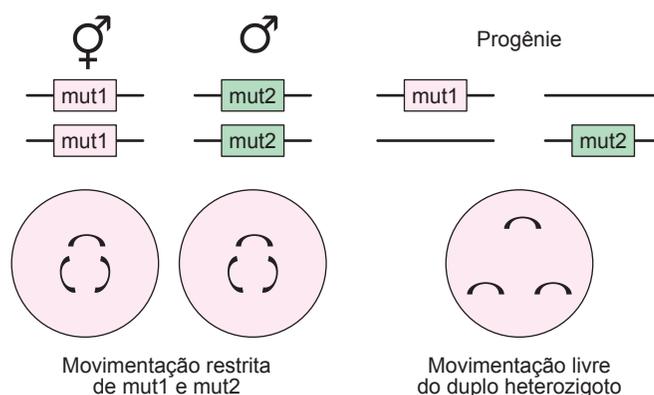


Figura 8.13 Teste de complementação realizado por Brenner entre vermes machos e hermafroditas, os quais manifestavam problemas de coordenação. Esses vermes apresentam locomoção do tipo circular contínua. Caso a progênie do cruzamento apresente indivíduos sem problemas de coordenação, *mut1* e *mut2* serão mutações de genes distintos.

Um indivíduo adulto apresenta 959 células somáticas, mas, no processo de desenvolvimento, 131 células morrem de modo programado, no processo conhecido como *apoptose*. Pode-se dizer que os estudos em *C. elegans* foram fundamentais para a compreensão do controle genético da apoptose. De fato, os primeiros genes antiapoptóticos, ou seja, aqueles que quando deixam de ser expressos desencadeiam o processo de apoptose, foram primeiramente identificados em *C. elegans*.

Como dito anteriormente, o destino e o desenvolvimento de cada célula do verme podem ser acompanhados. Foi possível identificar, por exemplo, as gerações de células envolvidas na formação do intestino (Figura 8.14). O tempo de cada estágio também é conhecido, por exemplo: 12 h são necessárias para a fertilização do ovo e a eclosão do primeiro estágio larval (L1).

Curiosamente, em 1995, Guo e Kemphues¹¹, ao estudarem a polaridade existente nas primeiras divisões celulares de *C. elegans*, isto é, a distribuição desigual de metabólitos citossólicos entre as células filhas, acabaram descobrindo uma ferramenta de inativação gênica que hoje é muito aplicada em diversos organismos: o RNA de interferência (iRNA). Em *C. elegans*, a técnica do iRNA pode ser facilmente empregada, pois é possível inativar um gene de interesse simplesmente fornecendo como alimento ao verme um plasmídeo contido em uma *E. coli* que expresse o RNA dupla fita de interesse. Esse procedimento é suficiente para a inativação do gene-alvo. Recentemente, pesquisadores da Embrapa, usando esse conhecimento, criaram um feijão transgênico que expressa um iRNA que impede a replicação do vírus do mosaico dourado, o qual causa enormes prejuízos às lavouras. O verme *C. elegans*, sendo um organismo multicelular, também se tornou excelente modelo para o estudo dos genes que afetam a longevidade.

Em 2002, os principais pesquisadores de *C. elegans* das últimas décadas, dentre eles, Sydney Brenner, foram agraciados com o Prêmio Nobel de Medicina. Brenner intitulou sua palestra de agradecimento como *Nature's gift to Science* e, de fato, a riqueza de mecanismos e processos do mundo vivo ensina e desafia os seres humanos continuamente. *C. elegans*, um verme do solo, de vida livre, é um dos exemplos mais puros da importância da ciência básica, pois se trata de um organismo aparentemente desinteressante para muitos, mas cujo estudo contribuiu de forma contundente no entendimento dos processos biológicos aqui destacados.

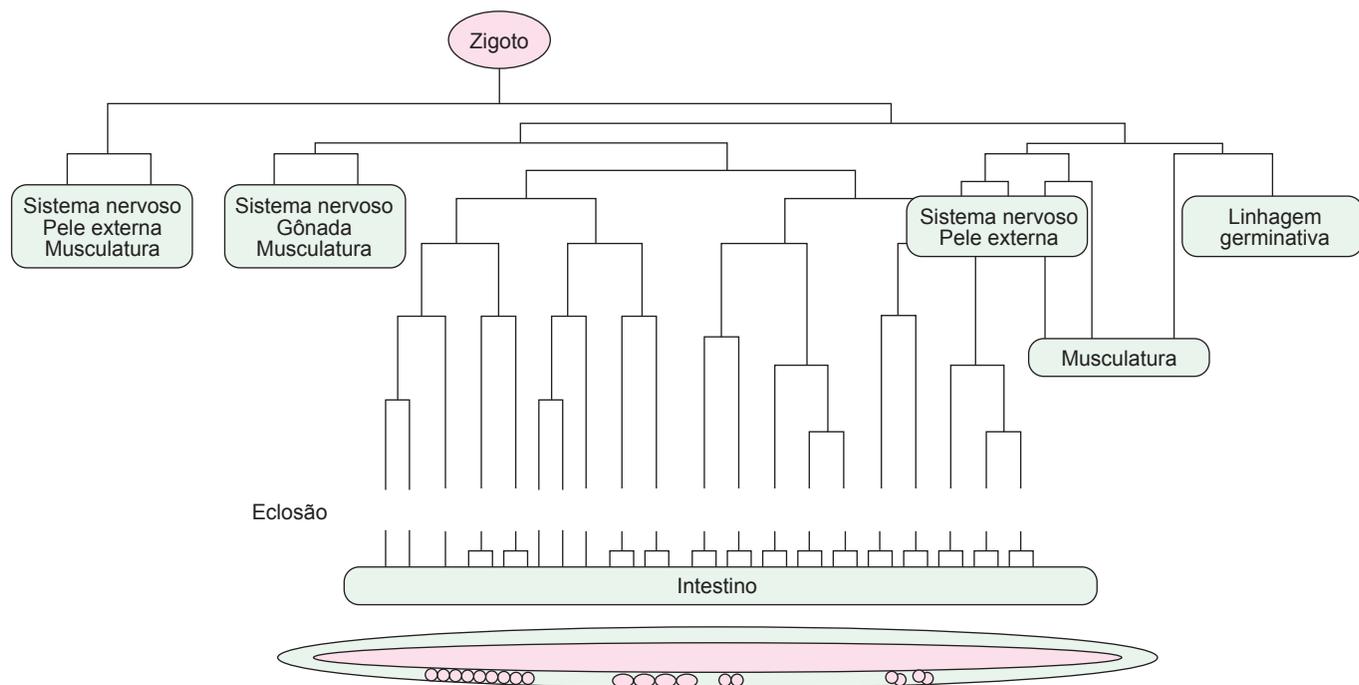


Figura 8.14 Dendrograma exemplificando a origem de cada uma das células que compõem o trato intestinal de um *Caenorhabditis elegans* adulto.

Arabidopsis thaliana | Modelo das plantas, a última a entrar no clube

Arabidopsis thaliana é o principal modelo no estudo da genética e controle do desenvolvimento dos vegetais superiores. Trata-se de uma pequena dicotiledônea da família da mostarda (*Brassicaceae*) que habita regiões diversas do globo – como áreas tropicais e o norte da Escandinávia – e apresenta folhas em roseta ao término de uma inflorescência, atingindo 30 cm de altura. Com os desdobramentos usuais da aplicação da genética no estudo da bioquímica celular, funções diversas como floração, germinação, nutrição, resposta a estresse hídrico, estresse salino, ação de fitopatógenos, entre outros, podem ser estudados em *A. thaliana* e aplicados às plantas de interesse agrícola e econômico. Algumas características levaram *A. thaliana* a ser o modelo genético das plantas.

Os diferentes níveis de poliploidização, assim como a grande quantidade de DNA encontrado nas angiospermas, são entraves para o estudo genético de muitas espécies vegetais. Por seu genoma pequeno, o uso de *A. thaliana* como modelo torna possível minimizar essas dificuldades.

Seu genoma apresenta 115 milhões de pares de bases, distribuídos em 5 pares de cromossomos, definindo um dos menores entre as angiospermas. Trata-se, portanto, de um genoma enxuto, sem grandes extensões de DNA não codificante, sendo 85% de sequências codificantes distribuídas em pouco mais de 25.000 genes. No ano 2000, tornou-se a 1ª planta a ter o seu genoma totalmente sequenciado.

O tempo entre a germinação e a geração de novas sementes é de 6 semanas, facilitando o acompanhamento da progênie em tempo razoável. O pequeno tamanho também facilita o cultivo em laboratório, demandando pouco espaço para as linhagens.

A mutagênese das sementes pode ser realizada por irradiação ou agentes químicos. Posteriormente, a caracterização fenotípica de alelos recessivos pode ser obtida por sua capacidade de autofertilização.

A transformação genética de células de *A. thaliana* é fácil de ser obtida por intermédio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, agente causador da galha que naturalmente transporta parte do seu material genético, via infecção plasmidial, para as células da planta hospedeira. A bactéria transfere para a planta vários genes que estão entre as extremidades direita e esquerda do T-DNA, pertencente ao plasmídeo Ti dessa bactéria. Os cientistas criaram vetores especializados que contêm genes repórteres, promotores e o gene que desejam transferir para a planta entre os elementos do T-DNA. Assim, podem introduzir em plantas os genes desejados e criar plantas transgênicas úteis (Figura 8.15).

Assim como em *S. cerevisiae*, estão disponíveis linhagens de *A. thaliana* com cada um dos seus genes inativados pelo método de inserção do T-DNA.

Apesar de todas essas vantagens, o uso de *A. thaliana* na pesquisa não foi tão óbvio, e somente nos anos 1980 começou a ser mais reconhecido pela comunidade científica, principalmente em decorrência dos trabalhos de Somerville e Ogren¹² com mutantes deficientes no metabolismo fotorrespiratório. Assim, pode-se dizer que *A. thaliana* é um ingressante recente no clube dos mais importantes organismos-modelo da genética e biologia molecular.

Camundongo | Modelo para mamíferos superiores

O camundongo tem grande semelhança genética com o homem, é fácil de manipular e criar em laboratório, sendo um excelente animal modelo para investigar a função de genes que, em geral, têm homólogos (genes de sequência bastante semelhante) funcionais de genes humanos. Muitos cientistas desenvolveram as técnicas para que o camundongo se tornasse o modelo animal de extraordinária importância conhecido atualmente. O boxe a seguir apresenta as descobertas de três cientistas cujo trabalho lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina de 2007.

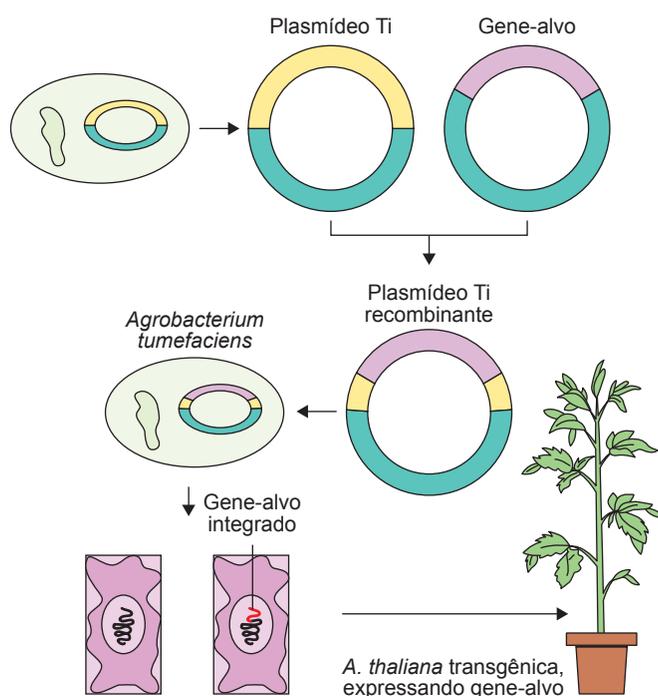


Figura 8.15 Uso do sistema de *Agrobacterium tumefaciens* para construção de uma planta transgênica. O plasmídeo T1 da bactéria *A. tumefaciens* é modificado para gerar um plasmídeo recombinante contendo a sequência de DNA de interesse. A bactéria contendo o vetor recombinante pode ser colocada em contato com células da planta-alvo, intermediando a transferência de DNA para a célula receptora. A seguir, selecionam-se aquelas que conseguiram integrar a sequência de interesse em seu genoma e o organismo adulto geneticamente modificado é obtido.

O método derivado do trabalho de Smithies, Capecchi e Evans¹³⁻¹⁵ contou com a colaboração de muitos outros estudiosos e possibilitou que hoje se inative especificamente um determinado gene no animal, de maneira a estudar o efeito de sua ausência na configuração heterozigota (um alelo nocauteado e outro ativo), ou homozigota (ambos alelos inativos). Os animais constituídos assim são acompanhados desde a fecundação, ao longo de seu desenvolvimento até a vida adulta, caso resistam. Existem camundongos com nocautes para mais de 1.000 genes específicos, de imensa importância para se compreenderem a ação gênica e as doenças genéticas.

Um dos mais promissores modelos desenvolvidos recentemente é o das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). As manipulações que promovem a geração de iPSC consistem em reprogramar células somáticas por meio de modificações genéticas diretas, ou, como demonstrado em 2009, simplesmente tratando as células com proteínas específicas. Estas induzem modificações epigenéticas geralmente ligadas ao bloqueio maior ou menor da expressão de genes ou fatores de transcrição fazendo com que, por exemplo, uma célula derivada de um tecido epitelial passe a funcionar como célula hepática, muscular ou neurônio. São úteis, por exemplo, para estudar aspectos das modificações bioquímicas e genéticas em neurônios derivados de pacientes com esclerose amiotrófica lateral (ALS) ou atrofia muscular espinal (SMA), evitando conflitos éticos presentes nos estudos com o ser humano. Os modelos celulares prometem, inclusive, substituir em grande parte os testes de fármacos e cosméticos em animais. São também promissores na busca da cura de certas doenças (como a anemia falciforme, ou degenerativas, como Parkinson e artroses) ou na recuperação de lesões derivadas de acidentes (paralisias derivadas de traumas).

Tudo começou com os estudos de Evans e Kaufman¹⁴ no início dos anos 1980, isolando células-tronco de blastocistos de camundongo. Mais tarde, demonstrou-se que elas podiam receber genes *in vitro* e esses genes poderiam ir para gametas,

o que possibilitava a modificação genética do camundongo. Capecchi¹³ aperfeiçoou a técnica de introdução dos genes por injeção direta, no entanto, os genes eram inseridos aleatoriamente no genoma. Smithies *et al.*¹⁵ trabalhavam para obter recombinação homóloga do gene inserido e, em 1985, obtiveram a correção *in vitro* de uma mutação em células-tronco por meio de um processo de complementação. Em 1988, Capecchi¹³ publicou seu método de seleção positiva/negativa incorporando os avanços anteriores e promovendo a obtenção de células-tronco embrionárias com modificação específica de um gene escolhido (Figura 8.16). Inicialmente, coletam-se células-tronco embrionárias (ES) pluripotentes da massa celular interna de um blastocisto doador. Essas células recebem o transgene (por eletroporação) com endereço certo, segundo o processo esquematizado na Figura 8.17. Após a seleção das ES modificadas, as células são injetadas em um blastocisto receptor que é implantado em uma fêmea, dando origem a uma prole quimérica (contendo células próprias e outras derivadas das ES transgênicas). Por cruzamentos, é possível selecionar animais do tipo transgênico puro quando células modificadas aparecem no tecido germinativo, originando heterozigotos que promovem, eventualmente, a geração de homozigotos por cruzamento. Dessa maneira, é possível analisar o fenótipo resultante da inativação de determinado gene do animal (Figura 8.17). Pode-se introduzir um gene qualquer no local desejado, ou simplesmente inserir um marcador seletivo no interior de um gene existente removendo-o total ou parcialmente, criando uma inativação (nocaute) para estudo do efeito da sua perda. O número de animais nocaute para estudo está em torno de 1.000. Portanto, muitos genes ainda aguardam estudo nesse importante modelo animal.

Usando essa metodologia e variantes, os genes do camundongo começaram a ser estudados com foco inicial nos equivalentes das doenças monogênicas humanas: síndrome de Lesch-Nyhan, fibrose cística, diferentes cardiomiopatias hereditárias, hipertensão essencial, aterosclerose, câncer, doenças endócrinas e inflamatórias etc. Esse modelo transformou a fisiologia e a medicina modernas, e ainda proporcionará muitos avanços. O impacto tem sido considerável: no Reino Unido, o aumento recente de experimentos com animais se deve à extensa utilização de camundongos transgênicos como modelos. Camundongos transgênicos e mutantes fizeram parte de cerca de 1,6 milhão de experimentos em 2009.

Células-tronco pluripotentes induzidas

Na década de 1960, Gurdon¹⁶ mostrou que o núcleo de uma célula da pele de um anfíbio, removido e transferido para um ovo desse animal cujo núcleo original havia sido removido, era reprogramado e o ovo se desenvolvia resultando em um animal normal. Fatores presentes no citoplasma do ovo conseguiam ativar genes dormentes no núcleo da célula da pele e este núcleo se tornava competente para dirigir o desenvolvimento completo. Muitos anos depois, em 1999, Takahashi e Yamanaka¹⁷ interessaram-se por esse tema e familiarizaram-se com os genes apontados como importantes para manter ES competentes e se transformarem em diferentes tecidos. Selecionaram 24 genes e os introduziram em células comuns usando vetores retrovirais. Em 2006, eles demonstraram (Figura 8.18) que podiam transformar células diferenciadas em pluripotentes e reduziram os 24 genes a um grupo de 4 genes particularmente eficientes para induzir a transformação (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, e *Klf4*). Em camundongos, essas células

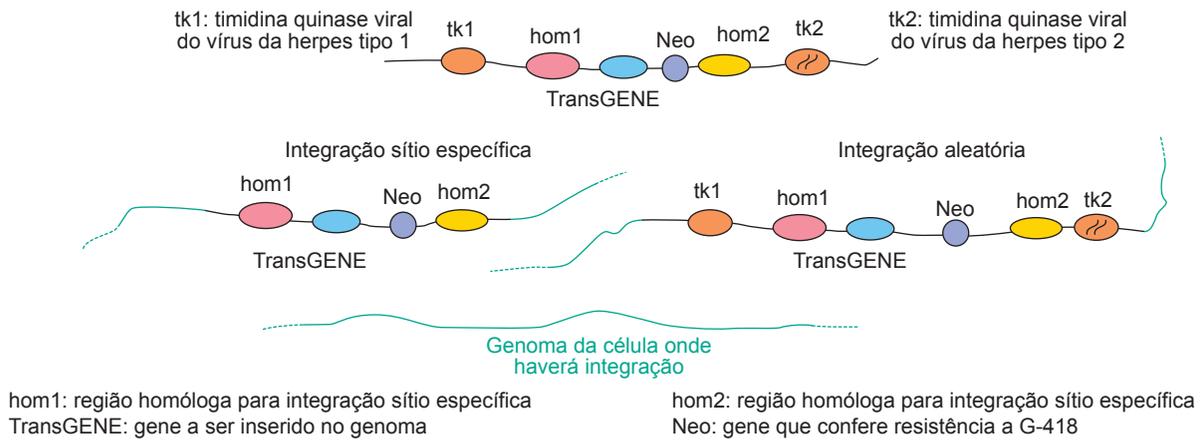


Figura 8.16 Esquema que ilustra a construção usada para obter transgênicos, ou inativação gênica em locais definidos do genoma do camundongo. O segmento de DNA tem nas extremidades o gene da timidina quinase (tk) 1 ou 2 obtido de um herpes-vírus. O produto desse gene torna as células sensíveis ao ganciclovir, que as mata. Para dentro dos genes tk estão inseridas duas regiões (hom1 e hom2), que são idênticas aos locais desejados de integração no genoma de um lado e do outro, o que acontece por recombinação homóloga. Entre as regiões de integração está o gene que se quer introduzir (transGENE), que pode ser uma versão mutada do gene original, um gene de outro organismo, um marcador seletivo que substitui grande parte, ou a totalidade, do gene original para gerar um nocaute gênico específico. Ao lado, tem-se o gene *Neo^r* que confere resistência à substância citotóxica G-418. Inserções fora do local correto costumam acontecer incluindo um ou ambos genes tk no DNA da célula. As inserções corretas excluem os genes tk. A seleção é feita adicionando-se à cultura de células transfectadas G-418 e ganciclovir, que mata as células que expressam a timidina quinase. Apenas as células ES que incorporaram a construção pela via da recombinação homóloga sobrevivem a esse tratamento. Testes com amplificação por PCR das junções da construção com o DNA genômico do animal são usados para confirmar a integração correta.

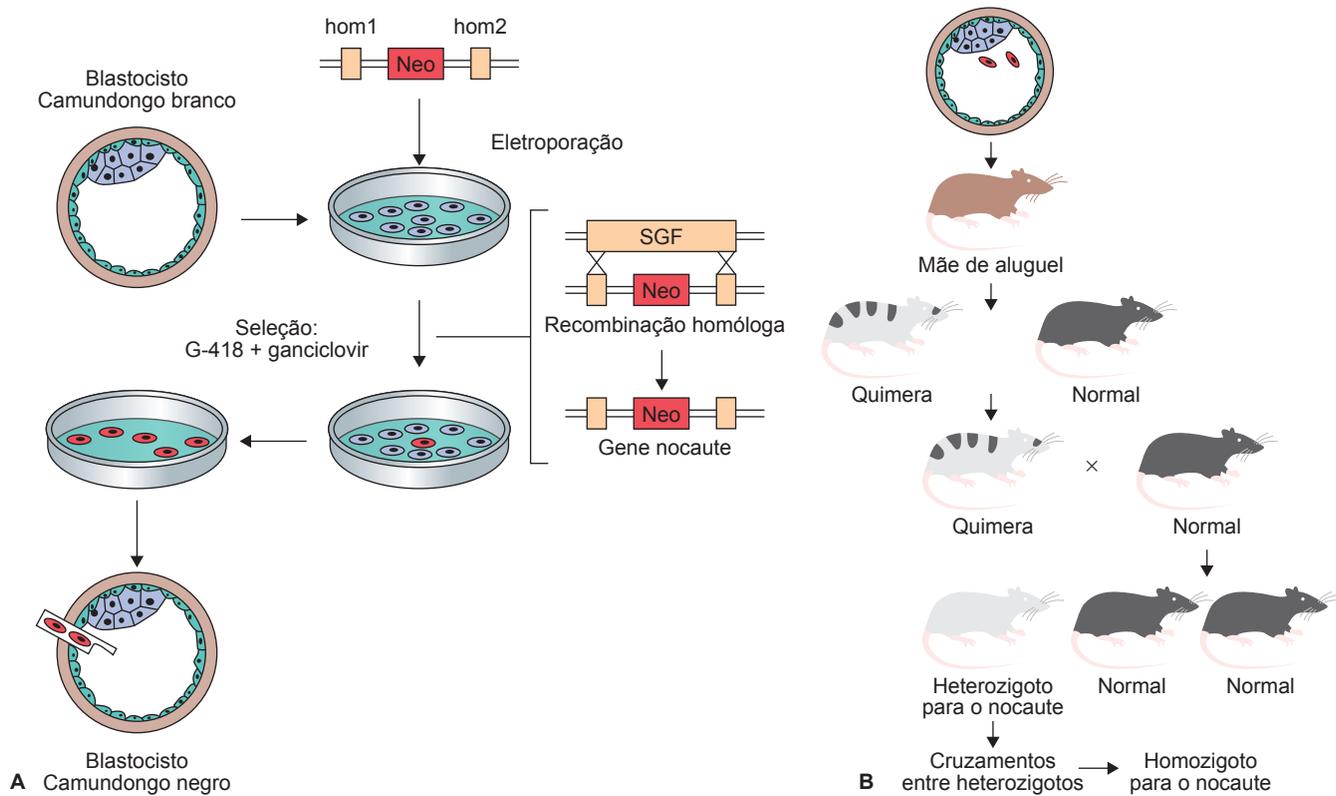


Figura 8.17 Uso da construção de Capecchi para gerar um camundongo nocaute. **A.** O DNA linearizado é introduzido nas células obtidas do blastocisto de um camundongo de pelagem branca. As células vão para o meio de cultura contendo ganciclovir e G-418. Aquelas que possivelmente incorporaram a construção sobrevivem e são depois testadas individualmente, para verificar se a integração aconteceu corretamente nas extremidades do segmento de DNA inserido. **B.** As células são, então, injetadas em blastocistos de camundongo de pelagem escura e vão para fêmeas de aluguel. As crias que contêm a modificação aparecem como quimeras evidenciadas pela pelagem malhada. Estas são cruzadas com animais normais de pelagem escura e buscam-se animais de pelagem completamente branca (prováveis heterozigotos), indicando que as células modificadas foram parar no tecido germinativo. O DNA desses animais é novamente testado para confirmar a construção, e são cruzados entre si a fim de gerar homozigotos para a modificação específica.

se mostraram capazes de produzir tecido neural, cartilagem, músculo, e células precursoras do epitélio intestinal. O uso de retrovírus no processo causa preocupação com a possível ativação de oncogenes e geração de tumores. Em 2009, Zhou *et al.*¹⁸ mostraram que, sem usar vetores que poderiam causar efeitos genéticos indesejáveis, era possível gerar células-tronco induzidas expondo as células aos produtos dos 4 genes anteriormente selecionados por Yamanaka, previamente fundidos com um pequeno peptídeo (uma poliarginina contendo 11 resíduos) no seu C-terminal (Figura 8.18). A poliarginina

faz com que a célula absorva a proteína recombinante, a qual pode agir, então, sobre o núcleo celular.

Conclusão e perspectivas

Novos modelos biológicos vão surgindo. O mais recente é o uso de iPSC para estudar problemas da biologia humana impossíveis de atacar diretamente, inclusive por restrições éticas. A lição útil deste capítulo é: procure sempre o sistema biológico mais apropriado e com mais possibilidades de manipulação laboratorial para investigar o tema que o interessa em genética.

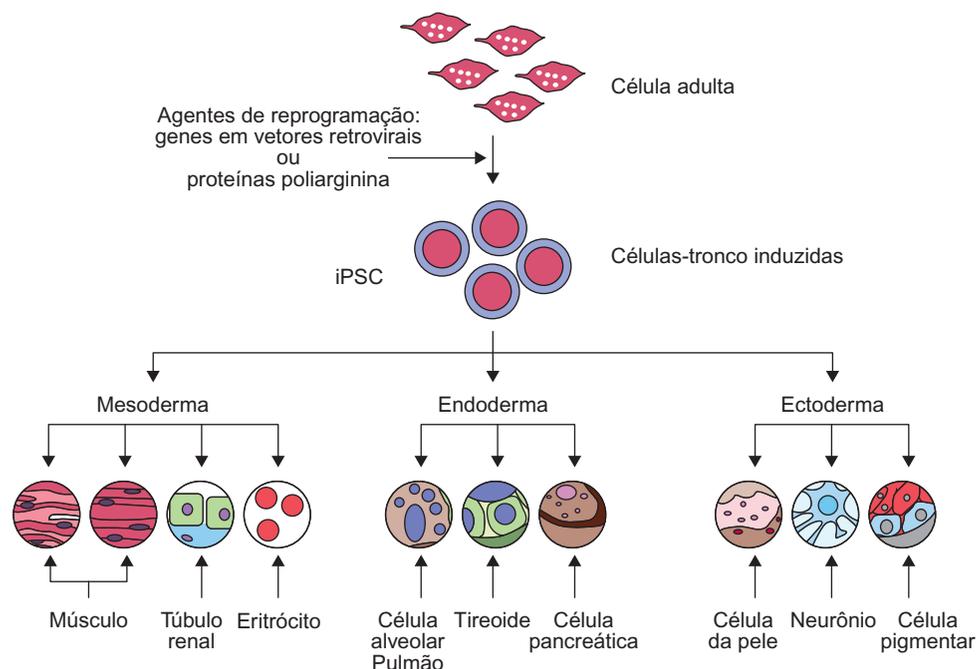


Figura 8.18 Geração de células-tronco pluripotentes a partir de células somáticas (iPSC ou células-tronco pluripotentes induzidas). As células somáticas são tratadas com agentes de reprogramação da expressão gênica nuclear: certos genes inseridos via vetores retrovirais, ou com as proteínas respectivas contendo uma “cauda” de poliarginina que promove sua importação para o interior da célula, atingindo o núcleo. As células-tronco induzidas são manipuladas em meios apropriados, podendo gerar células de tecidos diversos do mesoderma, endoderma ou ectoderma.

Referências bibliográficas

- Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. *Science*. 1927;66(1699):84-7.
- Sturtevant AH, Morgan TH. Reverse mutation of the bar gene correlated with crossing over. *Science*. 1923;57(1487):746-7.
- Lederberg J, Tatum EL. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol*. 1946;11:113-4.
- Benzer S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1955;41(6):344-54.
- Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*. 1961;192:1227-32.
- Mathaei H, Nirenberg MW. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon RNA prepared from ribosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1961;4:404-8.
- Khorana HG. Synthesis of nucleotides, nucleotide coenzymes and polynucleotides. *Fed Proc*. 1960;19:931-41.
- Beadle GW, Tatum EL. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1941;27:499-506.
- Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet*. 1902.2:1616-20.
- Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77:95-104.
- Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995;81(4):611-20.
- Somerville CR, Ogren WL. Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:2684-7.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244:1288-92.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985;317:230-4.
- Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962;10:622-40.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4:381-4.

