

## Genes e desenvolvimento: Introdução e técnicas

# 2

O que gostaríamos de saber é se a estrutura é determinada diretamente pela informação codificada no DNA, gravada no ovo... na extensão em que estrutura pode ser expressa por informação. JONATHAN BARD (1990)

Os segredos que me enlaçam e cativam são em geral segredos da hereditariedade: como uma semente de pêra vira uma pereira em vez de um urso polar. CYNTHIA OZICK (1989)

“ENTRE OS CARACTERES que fornecem os dados para a teoria, e os genes postulados, aos quais os caracteres se referem, está todo o campo do desenvolvimento embrionário”. Aqui Thomas Hunt Morgan (1926) estava verificando que o único caminho de genótipo para fenótipo, passava através de processos desenvolvimentais. No começo do século vinte, embriologia e genética não eram consideradas ciências separadas. Divergiram na década de 1920, quando Morgan redefiniu a genética como a ciência que estuda a *transmissão* dos traços em oposição à embriologia, a ciência que estuda a *expressão* desses traços. Durante a última década, porém, as técnicas da biologia molecular realizaram uma reaproximação entre embriologia e genética. Na realidade, os dois campos se ligaram novamente a tal ponto que se torna necessário uma discussão prévia da genética molecular neste texto. Questões do desenvolvimento animal que não poderiam ser consideradas há uma década, estão sendo agora resolvidas por um conjunto de técnicas envolvendo síntese de ácidos nucléico e hibridização. Este capítulo procura situar essas novas técnicas dentro do contexto do diálogo, ora em curso, entre genética e embriologia.

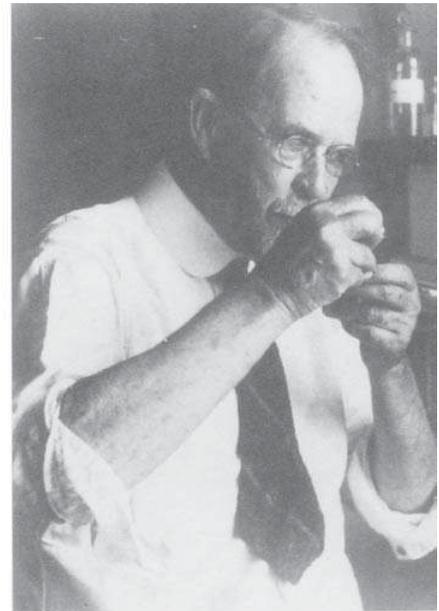
### As origens embriológicas da teoria dos genes

#### **Núcleo ou Citoplasma: Qual Controla a Hereditariedade?**

Mendel chamou-os *Formbildelementen*, elementos construtores de formas; nós os chamamos de genes. Porém, é na terminologia de Mendel que vemos como no século dezenove os conceitos de herança e desenvolvimento estavam intimamente entrelaçados. Entretanto, as observações de Mendel não indicaram onde na célula ficavam esses elementos hereditários, nem como eram levados a se expressarem. A teoria dos genes, que viria a ser a pedra angular da genética moderna, teve origem em uma controvérsia no campo da embriologia. Em fins século XIX, um grupo de cientistas começou a estudar, por seu valor intrínseco, como ovos fertilizados davam origem a organismos adultos. Dois jovens embriologistas americanos, Edmund Beecher Wilson e Thomas Hunt Morgan (Figura 2.1), tornaram-se parte desse grupo de “embriologistas fisiológicos”, cada um tomando-se partidário na controvérsia sobre qual dos dois compartimentos do ovo fertilizado - o núcleo ou o citoplasma - controla a herança.



(A)



(B)

**Figura 2.1**

(A) E. B. Wilson (1856-1939; mostrado aqui em aproximadamente 1899), um embriologista cujo trabalho, na fase precoce da embriologia e da determinação sexual, muito avançou as hipóteses cromossômicas do desenvolvimento. (Wilson era também reconhecido como um dos melhores violoncelistas amadores do país.) (B) Thomas Hunt Morgan (1866-1945), que desenvolveu a teoria dos genes a partir da embriologia. Essa fotografia - tomada em 1915, quando os elementos básicos da teoria dos genes estavam se encontrando - mostra Morgan usando uma lente manual para identificar moscas. (A) cortesia de W. N. Timmins; (B) cortesia de G. Allen.)

Quando Morgan e Wilson entraram nesse debate, a disputa já estava bem ativa. Uma escola associada a Oskar Hertwig, Wilhelm Roux e Theodor Boveri, propunha que os cromossomos do *núcleo* continham os elementos construtores de formas. Esse grupo era desafiado por Eduard Pflüger, T. L. W. Bischoff, Wilhelm His e seus colegas, que acreditavam que estruturas pré-formadas não poderiam causar tão enormes mudanças durante o desenvolvimento; ao contrário, eles acreditavam que os padrões herdados de desenvolvimento eram causados pela criação de novas moléculas do gameta interativo, *citoplasmas*. Morgan aliou-se a esse último grupo e obteve dados que interpretou com sendo consistentes com o modelo citoplasmático da herança. Em seu experimento mais crucial, ele removeu citoplasma do recém-fertilizado ovo ctenóforo (geléia de crista). Em 1897 Morgan relatou:

*Aqui, embora todo o núcleo de segmentação esteja presente, devido à perda de parte do citoplasma, produz-se embriões com defeito... Parece não haver escape da conclusão que no citoplasma, e não no núcleo, está o poder de diferenciação dos estágios precoces do desenvolvimento.*

Wilson, nesse ínterim, tornou-se o maior proponente do ponto de vista de que os elementos formadores se encontravam nos cromossomos nucleares. Defendeu vigorosamente essa idéia em seu livro *A Célula no Desenvolvimento e na Herança* (1896), salientando a necessidade da presença do núcleo para regeneração dos protozoários (veja capítulo 1):

*Esse fato presume que o núcleo é, se não o local da formação de energia, ao menos, o fator controlador dessa energia e, por isso, o fator controlador da herança. Essa conjectura transforma-se em certeza quando nos voltamos para os fatos da maturação (meiose), fertilização e divisão celular. Todos convergem em direção da conclusão de que a cromatina é o elemento essencial para o desenvolvimento.*

Wilson (1895) não se esquivou das conseqüências dessa conclusão\*

*Agora, a cromatina é sabida ser intimamente semelhante, se não idêntica, à substância conhecida como nucleína...que a análise demonstra ser um composto químico toleravelmente bem definido, composto de ácido nucléico (um complexo ácido orgânico rico em fósforo) e albumina. E assim, chegamos à notável conclusão que a herança pode, talvez, ser efetuada pela transmissão física de um dado composto químico do progenitor para a descendência.*

Wilson pensou que o material formador de órgãos que Morgan havia removido do citoplasma de ovos de ctenóforo, já havia sido para ali secretado pelos cromossomos nucleares (Wilson, 1894, 1904). Para Wilson (1905) “Os materiais citoplasmáticos parecem ser apenas o meio imediato ou a causa eficiente da diferenciação, e ainda procuramos sua determinação primária nas causas que residem mais profundamente.”

Parte do maior apoio para a hipótese cromossômica da herança estava vindo dos estudos embriológicos de Theodor Boveri (Figura 2.2 A), um pesquisador na Estação Biológica de Nápoles. Boveri fertilizou óvulos de ouriço-do-mar com altas concentrações de seu espermatozóide e obteve ovos que haviam sido fertilizados por dois espermatozóides. Na primeira clivagem, esses ovos formaram quatro pólos mitóticos e dividiram o ovo em quatro, em vez de duas células (veja capítulo 4). Boveri então separou os blastômeros e demonstrou que cada célula se desenvolvia anormalmente e de maneiras diferentes por ter cada célula diferentes tipos de cromossomos. Assim, Boveri declarou que cada cromossomo tinha uma natureza individual e o controle de diferentes processos vitais.

### O Cromossomo X como uma Ponte Entre Genes e Desenvolvimento

Em adição à evidência de Boveri, E. B. Wilson (1905) e Nettie Stevens (1905a,b) demonstraram uma correlação crítica entre cromossomos nucleares e o desenvolvimento organizacional. Stevens (Figura 2.2B), uma ex-estudante de Morgan, mostrou que em 92 espécies de insetos (e um cordato primitivo), as fêmeas tinham dois cromossomos sexo-específicos em cada núcleo (XX), enquanto machos tinham somente um cromossomo X (XY ou XO). Parecia que uma estrutura nuclear, o cromossomo X, estava controlando o desenvolvimento sexual\*\*. Morgan discordou da interpretação de que

\*Note-se que Wilson está escrevendo sobre unidades construtoras de forma na cromatina em 1896 – antes da redescoberta dos trabalhos de Mendel ou do estabelecimento da teoria dos genes. Para uma análise mais detalhada das interações entre Morgan e Wilson que levaram à teoria dos genes, veja Gilbert (1978, 1987) e Allen (1986).

\*\* Wilson era um dos amigos mais íntimos de Morgan, que considerava Stevens sua melhor estudante de pós-graduação. Ambos estavam contra Morgan nessa questão. Mesmo assim, Morgan apoiou inteiramente o pedido de Stevens para fundos de pesquisa, confirmando suas qualidades como as melhores possíveis. Wilson escreveu uma elogiosa carta de recomendação, apesar de saber que ela seria uma rival na pesquisa (veja Brush, 1978).



(A)



(B)

**Figura 2.2**

O caráter singular do cromossomo foi mostrado por Boveri e Stevens. (A) Theodor Boveri (1862-1915) cujo trabalho Wilson (1918) comentou: “conseguiu a verdadeira fusão de citologia, embriologia e genética – um feito biológico que... não fica atrás de qualquer outro de nosso tempo.” Fotografia tirada em 1908, quando os estudos cromossômicos e embriológicos de Boveri estavam no seu apogeu. (B) Nettie M. Stevens (1861-1912), que treinou tanto com Boveri como com Morgan, vista aqui em 1904 quando era estudante de pós-doutorado, realizando a pesquisa que correlacionou o número de cromossomos X com o desenvolvimento sexual. [(A) cortesia de Baltzer, 1967; (B) cortesia do Instituto Carnegie de Washington.]

os cromossomos determinavam o sexo. Ao contrário, ele considerou o conjunto de cromossomos como uma característica sexual secundária, controlada por alguma substância citoplasmática determinadora do sexo.

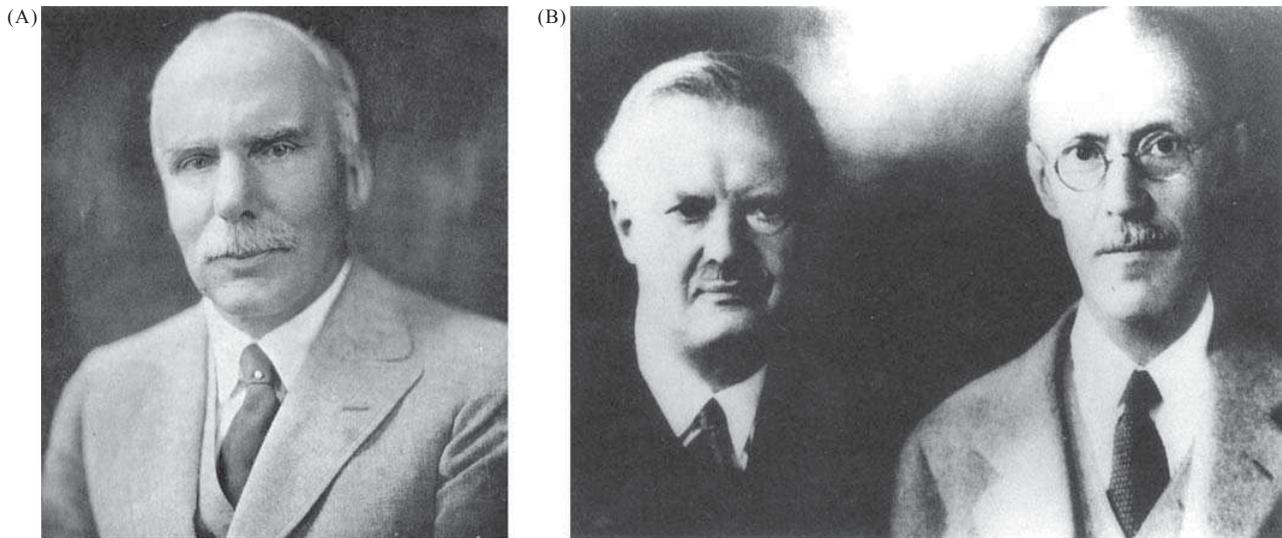
A “conversão” de Morgan para a hipótese cromossômica ocorreu depois de obter dados contrários às suas teorias (veja Allen, 1978; Gilbert, 1978; Lederman, 1989). Enquanto criava *Drosophila* para uma série de experimentos sobre evolução, Morgan começou a obter várias mutações correlacionadas com o sexo. (Como ele logo iria mostrar, mutações ligadas ao X apareciam antes de mutações em outros cromossomos, porque defeitos no cromossomo X não são mascarados pelo cromossomo homólogo no macho.) Em 1910, Morgan mostrou que os traços para ambos sexos e cor branca dos olhos estão correlacionados de alguma maneira com a presença de um dado cromossomo X; entretanto, evitou considerá-los ligados fisicamente. Porém, em 1911 mostrou que fatores reguladores da cor dos olhos, cor do corpo, forma das asas e sexo segregavam-se juntos com o cromossomo X, o que o levou a começar a visualizar os genes como fisicamente ligados um ao outro no cromossomo. O embriologista Morgan tinha demonstrado que cromossomos nucleares eram responsáveis pelo desenvolvimento de caracteres herdados. [[gene1.html](#)]

### A cisão entre a embriologia e a genética

A evidência de Morgan proporcionou uma base material para o conceito do gene. A genética havia sido, em geral, uma ciência empírica sobre procriação de animais e plantas; Morgan deu-lhe um fundamento científico. Movida pelo desejo de progredir no conhecimento da reprodução de animais e plantas (e seres humanos), e na capacidade dos geneticistas de obter rapidamente resultados concretos e matematicamente verificáveis, a genética logo se tornou a ciência biológica predominante nos Estados Unidos (veja Allen, 1986; Sapp, 1987; Paul e Kimmelman, 1988). Na década de 1930, tornou-se disciplina autônoma, desenvolvendo seu vocabulário próprio, revistas, sociedades, organismos favorecidos, professores e regras de evidência. Hostilidade entre embriologia e genética também emergiu. Os geneticistas acreditavam que os embriologistas eram antiquados e que o desenvolvimento viria a ser inteiramente explicado como o resultado da expressão gênica. Conforme proclamado por Richard Goldschmidt (1938), “O desenvolvimento, obviamente, é a produção ordenada de um padrão e assim, em última análise, os genes controlam o padrão”. Se os embriologistas não olharem para a embriogênese em termos da atividade dos genes, os geneticistas o farão.

Reciprocamente, os embriologistas consideraram os geneticistas como irrelevantes e mal-informados. Embriologistas como Frank Lillie (1927), Ross Granville Harrison (1937), Hans Spemann (1938) e Ernest E. Just (1939) (Figura 2.3), argumentaram que não poderia haver uma teoria genética do desenvolvimento até que ao menos três principais desafios fossem resolvidos:

1. Os geneticistas teriam que explicar como cromossomos – que eram considerados *idênticos* em cada célula do organismo – direcionam tipos *diferentes* e *variáveis* de citoplasmas celulares.
2. Quase todos genes conhecidos na época afetavam a modelagem das etapas finais (cor dos olhos, forma das cerdas, vascularização alar). Os geneticistas teriam que produzir evidência que os genes controlam os estágios precoces da embriogênese. Conforme enunciado por Just (citado por Harrison, 1937), os embriologistas estavam interessados em saber como uma mosca forma o seu dorso e não no número de cerdas no seu dorso.
3. Os geneticistas teriam que explicar fenômenos como a determinação do sexo em certos invertebrados (e vertebrados, como répteis), nos quais o ambiente determina o fenótipo sexual.

**Figura 2.3**

Embriologistas tentaram impedir a genética de “conquistar” seu território na década de 1930. (A) Frank Lillie encabeçou o Laboratório de Biologia Marinha em Woods Hole e foi um líder na pesquisa sobre fertilização e endocrinologia reprodutiva. (B) Hans Spemann (à esquerda) e Ross Harrison (à direita) aperfeiçoaram operações de transplante para descobrir quando eram determinados os eixos do corpo e dos membros. Argumentaram que os geneticistas não possuíam um mecanismo para explicar como os mesmos genes nucleares podiam criar tipos celulares diferentes durante o desenvolvimento. (C) Ernest E. Just fez descobertas cruciais sobre fertilização. Rejeitou a genética e enfatizou o papel da membrana celular na determinação dos destinos das células. (A cortesia de V. Hamburger; B cortesia de T. Horder; C cortesia do Laboratório de Biologia Marinha, Woods Hole.)

O debate tornou-se deveras veemente. Numa retórica, refletindo as ansiedades políticas do fim da década de 1930, Harrison (1937) alertou:

*Agora que a necessidade de relacionar os dados da genética com a embriologia está sendo usualmente reconhecida e a sede de conhecimento dos geneticistas começa a impeli-los em nossa direção, não pareceria impróprio apontar para um perigo dessa ameaçada invasão. O prestígio do sucesso desfrutado pela teoria dos genes poderia facilmente tornar-se um obstáculo para a compreensão do desenvolvimento, por dirigir nossa atenção exclusivamente para o genoma, enquanto movimentos celulares, diferenciação e todos os processos desenvolvimentais são de fato realizados pelo citoplasma. Já temos teorias que referem os processos do desenvolvimento à ação dos genes e consideram toda performance como nada mais que a consecução dos potenciais dos genes. Tais teorias são totais e demasiadamente unilaterais.*

Até que os geneticistas puderam demonstrar a existência de variantes herdadas durante a fase precoce do desenvolvimento e até que os geneticistas tiveram uma bem-documentada teoria sobre como os mesmos cromossomos podiam produzir diferentes tipos de células, os embriologistas em geral não sentiram a necessidade de basear sua embriologia na ação dos genes. [\[gene2.html\]](#)

### Primeiras tentativas da genética do desenvolvimento

Porém, alguns cientistas acharam que nem a embriologia nem a genética estavam completas uma sem a outra. Várias tentativas foram feitas para sintetizar as duas disciplinas, mas sua primeira integração bem-sucedida veio no fim da década de

1930, por parte de dois embriologistas, Salome Gluecksohn-Schoenheimer (agora S. Gluecksohn Waelsch) e Conrad Hal Waddington. Ambos haviam sido treinados em embriologia na Europa e tinham aprendido genética nos Estados Unidos com estudantes de Morgan. Gluecksohn-Schoenheimer e Waddington, tentaram achar mutações que afetassem o desenvolvimento precoce e processos afetados por esses genes. Gluecksohn-Schoenheimer (1938, 1940) mostrou que mutações nos genes de *Brachyury* do camundongo, causavam desenvolvimento aberrante da porção posterior do embrião, e atribuiu os efeitos desses genes mutantes a defeitos no mesoderma axial que normalmente teriam ajudado a induzir o eixo dorsal.\* Além disso, Gluecksohn-Schoenheimer (1938) considerou que no trabalho com camundongos não era possível fazer o que os embriologistas experimentais deveriam estar fazendo - alterando a estrutura durante seu desenvolvimento e observando quais eram as consequências dessa operação. Em vez disso, um novo tipo de cientista era necessário, o **geneticista do desenvolvimento**:

*Enquanto o embriologista experimental desenvolve um dado experimento e em seguida estuda seus resultados, o geneticista do desenvolvimento tem que estudar primeiro o desenrolar do desenvolvimento (isto é, os resultados da perturbação do desenvolvimento) para depois, às vezes, chegar a conclusões sobre a natureza do “experimento” realizado pelo gene.*

Ao mesmo tempo, Waddington (1939) isolava diversos genes que causavam malformações alares na mosca das frutas, *Drosophila*. Também analisava como esses genes podiam afetar os primórdios que dão origem a essas estruturas. A asa da *Drosophila*, conforme proclamou corretamente, “parecia favorável para pesquisas sobre a ação desenvolvimental dos genes”. Assim, uma das principais objeções ao modelo genético do desenvolvimento levantadas pelos embriologistas - que os genes atuam somente sobre a modelagem final do embrião e não sobre seus principais esquemas de construção - foi contrariada. [\[gene3.html\]](#)

### Evidência para a equivalência genômica

Ainda permanecia uma outra grande objeção para uma embriologia baseada na genética: Como poderiam genes nucleares dirigir o desenvolvimento se os genes eram os mesmos em cada tipo celular? Essa equivalência genômica não estava provada mas era assumida (porque cada célula é o descendente mitótico do ovo fertilizado) e um dos primeiros problemas da genética do desenvolvimento era o de determinar se cada célula de um organismo tinha o mesmo genoma que outra.

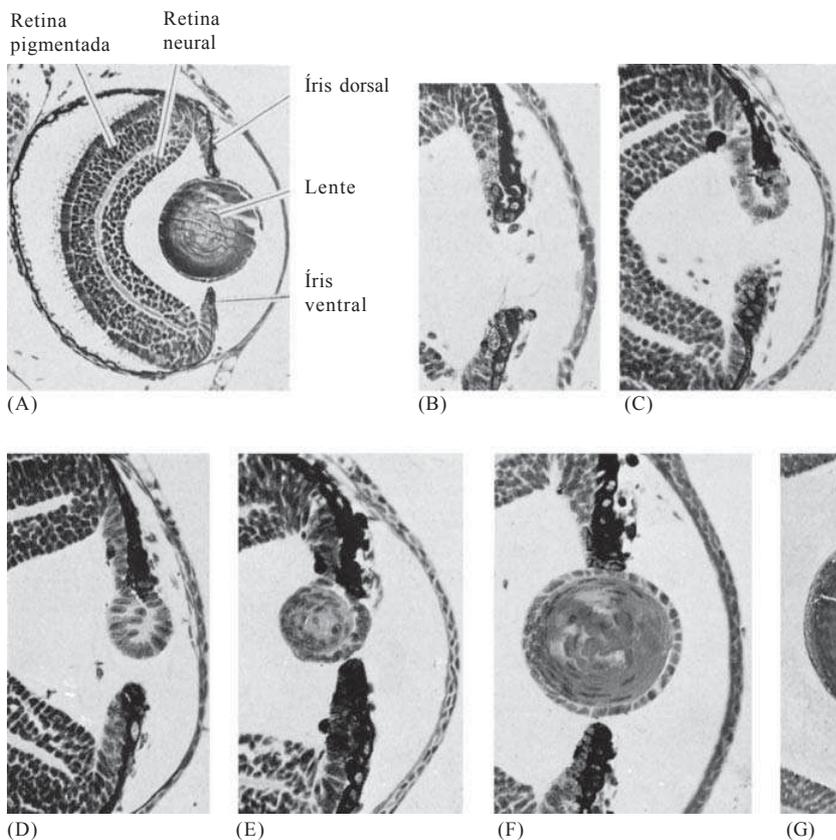
### **Metaplasia**

A primeira evidência para equivalência genômica veio após a 2ª Guerra Mundial, por parte de embriologistas que estavam estudando a regeneração de tecidos excisados. O estudo da regeneração do olho da salamandra demonstrou que mesmo células adultas *diferenciadas* podem reter o seu potencial de produzir outros tipos celulares. Portanto, os genes para os produtos desses outros tipos de células devem ainda estar presentes, embora normalmente não expressos. Na salamandra, a remoção da retina

\*As observações de Gluecksohn-Schoenheimer levaram 60 anos para ser confirmadas através da hibridização do DNA. No entanto, quando o gene do T-locus foi clonado e sua expressão detectada pela técnica da hibridização in situ (discutida mais adiante neste capítulo), Wilkinson e colaboradores (1990) acharam que “a expressão do gene T tem um papel direto nos eventos precoces da formação do mesoderma e na morfogênese da notocorda”. Embora uma história completa do desenvolvimento precoce da genética do desenvolvimento ainda permaneça por ser escrita, mais informações sobre suas turbulentas origens podem ser encontradas em Oppenheimer, 1981; Sander, 1986; Gilbert, 1988, 1991, 1996; Burian et al., 1991; Harwood, 1993; Keller, 1995; e Morange, 1996.

neural promove sua regeneração a partir da retina pigmentada, e uma nova lente pode ser formada a partir das células da íris dorsal. A regeneração do tecido lenticular da íris (a assim chamada regeneração Wolffiana a partir da pessoa que primeiro a observou em 1894) foi intensamente estudada. Yamada e seus colegas (Yamada, 1966, Dumont e Yamada, 1972) acharam que após a remoção de uma lente, uma série de acontecimentos leva à produção de uma nova lente a partir da íris (Figura 2.4). Os núcleos do lado dorsal da íris começam a sintetizar quantidades enormes de ribossomos, seu DNA se replica, e divisões mitóticas se sucedem. As células da íris pigmentada começam, em seguida, a se desdiferenciar expelindo seus melanossomos (os grânulos pigmentados que dão ao olho a sua cor; esses melanossomos são ingeridos por macrófagos que entram no local da ferida). A íris dorsal continua a se dividir, formando um globo de tecido desdiferenciado na região da lente removida. Essas células começam então a sintetizar os produtos diferenciados de células *lenticulares*, as proteínas do cristalino. Essas proteínas são fabricadas na mesma ordem que no desenvolvimento normal da lente. Uma vez formada uma nova lente, as células do lado dorsal da íris cessam sua atividade mitótica.

Esses eventos não são a via normal pela qual a lente dos vertebrados é formada. Como será visto em detalhe mais tarde, a lente normalmente se desenvolve a partir de uma camada de células epiteliais da cabeça, induzida pelas células retiniais precursoras subjacentes. A formação da lente por células diferenciadas da íris representa **metaplasia** (ou **transdiferenciação**), a transformação de um tipo celular diferenciado em outro (Okada, 1991). A íris da salamandra, portanto, não havia perdido gene algum daqueles usados na diferenciação das células da lente.



**Figura 2.4**

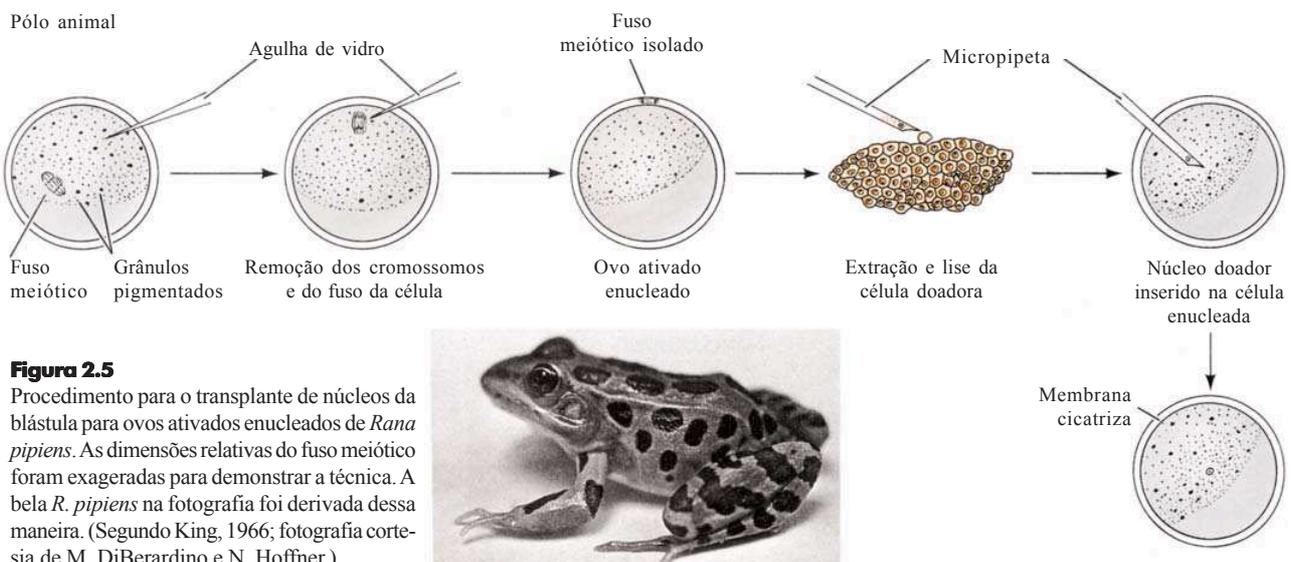
Regeneração Wolffiana da lente da salamandra a partir da margem dorsal da íris. (A) Olho normal, não-operado no estágio larval da salamandra *Notophthalmus viridiscens*. (B-G) Regeneração da lente, vista respectivamente nos dias 5, 7, 9, 16, 18 e 30. A nova lente estará completa no dia 30. (de Reyer, 1954, cortesia de R. W. Reyer.)

### Clonagem de Anfíbios: A Restrição da Potência Nuclear

O teste definitivo sobre se, ou não, o núcleo de uma célula diferenciada sofreu qualquer restrição funcional irreversível, seria o de conseguir que esse núcleo gerasse todo outro tipo de célula diferenciada no organismo. Se cada núcleo fosse idêntico ao núcleo do zigoto, o núcleo de cada célula deveria ser capaz de direcionar todo o desenvolvimento do organismo, quando transplantado para um ovo ativado enucleado. Porém, antes que tal experimento pudesse ser feito, três técnicas tiveram que ser aperfeiçoadas: (1) um método para enuclear ovos do hospedeiro sem destruí-los; (2) um método para isolar núcleos doadores intactos; (3) um método para transferir tais núcleos para dentro do ovo sem danificar o núcleo ou o oócito.

Essas técnicas foram desenvolvidas na década de 1950, em primeiro lugar por Robert Briggs e Thomas King que combinaram a enucleação com a ativação do ovo. Quando um oócito de rã-leopardo (*Rana pipiens*) é perfurado com uma agulha limpa de vidro, o ovo sofre todas as mudanças citológicas e bioquímicas associadas à fertilização. Ocorre rearranjo citoplasmático interno e a finalização da meiose perto do pólo animal da célula. Esse fuso meiótico pode ser facilmente localizado quando empurra os grânulos pigmentados do pólo animal; a punção do oócito nesse local induz o fuso e seus cromossomos a fluir para fora do ovo (Figura 2.5). O ovo hospedeiro é agora considerado estar ativado (as reações de fertilização necessárias para iniciar o desenvolvimento foram completadas) e enucleado. A passagem de um núcleo para o ovo é conseguida pela ruptura de uma célula doadora e transferência do núcleo liberado para o oócito por meio de uma micropipeta. Algum citoplasma acompanha o núcleo para seu novo lar, mas a razão do citoplasma doador para o receptor é somente de  $1:10^5$ , e o citoplasma do doador não parece afetar o resultado dos experimentos. Em 1952, Briggs e King demonstraram que núcleos da célula da blástula podiam direcionar o desenvolvimento de girinos completos quando transferidos para o citoplasma do oócito.

O que acontece quando núcleos de estágios mais avançados são transferidos para oócitos ativados e enucleados? Os resultados de King e Briggs (1956) estão delineados na Figura 2.6. Enquanto a maioria dos núcleos da blástula podiam produzir girinos completos, houve um dramático decréscimo da capacidade dos núcleos derivados de estágios mais tardios direcionar o desenvolvimento direto até o estágio de



**Figura 2.5**

Procedimento para o transplante de núcleos da blástula para ovos ativados enucleados de *Rana pipiens*. As dimensões relativas do fuso meiótico foram exageradas para demonstrar a técnica. A bela *R. pipiens* na fotografia foi derivada dessa maneira. (Segundo King, 1966; fotografia cortesia de M. DiBerardino e N. Hoffner.)

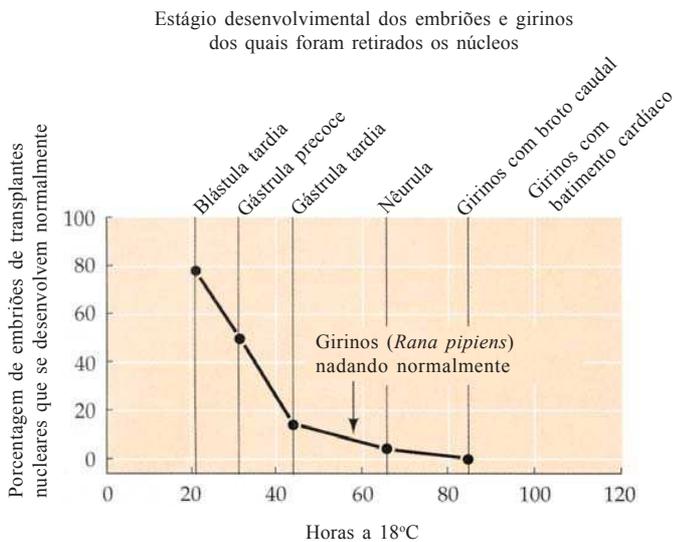
**Figura 2.6**

Gráfico de transplantes nucleares bem sucedidos, em função da idade do desenvolvimento nuclear. A abscissa representa o estágio no qual o núcleo doador (de *R. pipiens*) foi isolado e inserido no oócito ativado e enucleado. A ordenada mostra a porcentagem desses transplantes capazes de produzir blástulas que podiam em seguida direcionar o desenvolvimento para o estágio do girino nadador (Segundo McKinnell, 1978.)

girino. Quando núcleos de *células somáticas* de girinos no estágio de broto caudal foram usados como doadores, não ocorreu desenvolvimento normal. Porém, núcleos de *células germinativas* de girinos do estágio de broto caudal (que irão finalmente dar origem a um organismo completo após a fertilização), foram capazes de direcionar desenvolvimento completo em 40 por cento das blástulas que se desenvolveram (Smith, 1956). Assim, células somáticas parecem perder sua capacidade de direcionar desenvolvimento completo à medida que se tornam definidas e diferenciadas, e a progressiva restrição da potência nuclear durante o desenvolvimento parece ser uma regra geral. Porém, é possível que alguns núcleos celulares diferenciados sejam diferentes de outros.

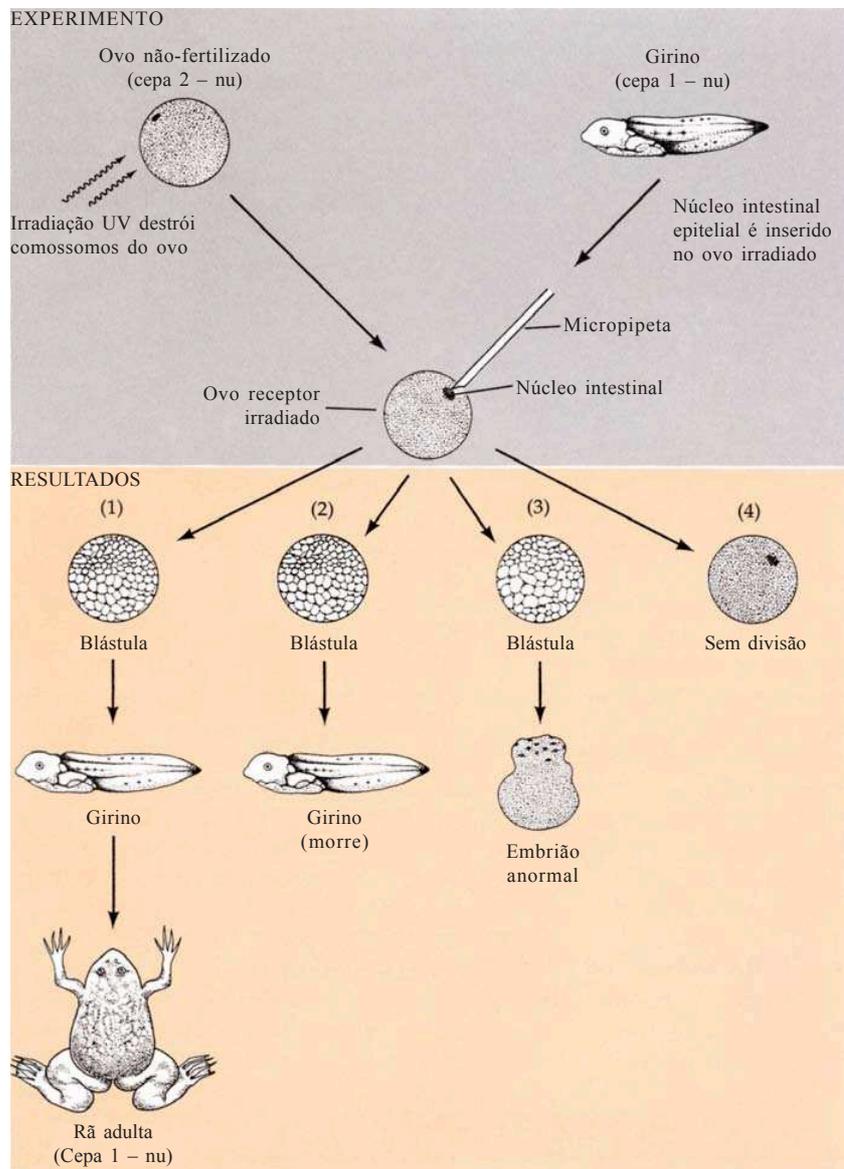
### **Clonagem de Anfíbios: A Pluripotência de Células Somáticas**

John Gurdon e seus colegas, usando métodos ligeiramente diferentes de transplante nuclear na rã *Xenopus*, obtiveram resultados sugerindo que os núcleos de algumas células diferenciadas podem permanecer totipotentes. Gurdon também achou uma progressiva perda de potência no decorrer do desenvolvimento, embora células de *Xenopus* tenham retido suas potências por um período de desenvolvimento mais longo (Prancha 1). As exceções a essa regra mostraram ser muito interessantes. Gurdon havia transferido núcleos do endoderma intestinal de girinos *Xenopus* que se alimentavam, para ovos ativados enucleados. Esses núcleos doadores continham um marcador genético (um nucléolo por célula, em lugar dos dois usuais), que os distinguia dos núcleos do hospedeiro. Entre 276 núcleos transferidos, somente 10 (1,4 por cento) promoveram o desenvolvimento até o estágio do girino que se alimentava. Transplantes seriados (que requeriam colocar um núcleo intestinal em um ovo e quando o ovo tinha se transformado em blástula, transferia-se o núcleo da blástula para vários outros ovos), aumentavam o rendimento para 7 por cento (Gurdon, 1962). Em alguns casos, núcleos das células intestinais dos girinos foram capazes de gerar todas as linhagens de células – neurônios, células do sangue, nervos e assim por diante – de um girino vivente. Além disso, sete desses girinos (de dois núcleos originais) se metamorfosearam em rãs adultas férteis (Gurdon e Uehlinger, 1966); esses núcleos eram totipotentes (Figura 2.7).

King e seus colegas criticaram esses experimentos assinalando que: (1) não haviam sido tomadas suficientes precauções para ter certeza que células germinativas primordiais, que podem migrar até o intestino, não foram usadas como fontes de núcleos, e (2) as células intestinais de um girino tão jovem poderiam não se qualificarem

**Figura 2.7**

Procedimento empregado para obter rãs maduras de núcleos intestinais de girinos de *Xenopus*. O ovo de tipo selvagem (2 nucléolos por núcleo; 2-nu) é irradiado para destruir os cromossomos maternos, e um núcleo intestinal de um girino marcado (1-nu) é inserido. Em alguns casos não ocorre divisão; em alguns casos o desenvolvimento do embrião é sustado; porém, em outros casos, uma rã inteiramente nova é formada tendo um genótipo 1-nu. (Segundo Gurdon, 1968, 1977.)



como um tipo de célula verdadeiramente diferenciada porque células de girinos que se alimentam ainda contêm plaquetas de gema (DiBerardino e King, 1967; McKinnell, 1978; Briggs, 1979). Para responder a essas críticas, Gurdon e seus colegas cultivaram células epiteliais da membrana natatória de rãs adultas. Essas células mostraram estar diferenciadas; cada uma continha queratina, a proteína característica de células adultas da pele. Quando núcleos dessas células foram transferidos para oócitos ativados e enucleados de *Xenopus*, nenhum dos transferidos de primeira geração progrediu além da formação do tubo neural, pouco após a gastrulação. Por transplantes seriados, porém, numerosos girinos foram gerados (Gurdon et al., 1975). Embora esses girinos tivessem morrido antes de atingir o estado alimentar, um único núcleo celular diferenciado ainda retinha potências incríveis. Um único núcleo derivado de uma hemácia de uma rã adulta (que nem se replica e nem sintetiza RNA) pode sofrer mais de 100 divisões após ser transplantado para um oócito ativado e, ainda, reter a habilidade

de gerar girinos natatórios (Orr et al., 1986; DiBerardino, 1989). Embora DiBerardino (1987) tenha observado que “até o presente, núcleo algum de uma célula documentadamente especializada, nem de uma célula adulta tenha mostrado ser totipotente”, tal núcleo pode no entanto instruir a formação de todos os órgãos do girino natatório.

Algumas das diferenças entre os resultados dos laboratórios de Briggs e de Gurdon, podem envolver diferenças na fisiologia do desenvolvimento das rãs *Rana* e *Xenopus*. Quando se transfere um núcleo de uma célula diferenciada para o citoplasma do oócito, se está pedindo ao núcleo para reverter para condições fisiológicas às quais ele não está acostumado. Os núcleos da clivagem das rãs dividem-se rapidamente, enquanto alguns núcleos de células diferenciadas dividem-se raramente, se tanto. Falhas em replicar DNA rapidamente podem levar a quebras cromossômicas: tais anormalidades foram vistas em muitas células de girinos clonados. Sally Hennen (1970) mostrou que o sucesso desenvolvimental de núcleos doadores pode ser ampliado tratando-se esses núcleos com espermina e resfriando os ovos para dar tempo ao núcleo de se adaptar ao citoplasma do ovo. Acredita-se que a espermina remova histonas da cromatina podendo “re-acertar” a atividade dos núcleos. Quando núcleos do endoderma de girinos de *Rana pipiens*, no estágio de broto caudal, foram tratados dessa maneira, 62 por cento daqueles núcleos que iniciaram desenvolvimento normal, prosseguiram até a geração de girinos normais. Em animais controle, nenhum dos núcleos conseguiu gerar tais girinos. Assim, os genes para o desenvolvimento do girino completo não pareceram ter sido perdidos pelas células do endoderma.

Podemos olhar para esses experimentos de clonagem de anfíbios de duas maneiras. Primeiro, reconhecer uma restrição geral de potência concomitante ao desenvolvimento. Segundo, facilmente ver que o genoma da célula diferenciada é notavelmente potente em sua habilidade de produzir todos os tipos celulares do girino anfíbio. Em outras palavras, mesmo existindo um debate sobre a *totipotência* de tais núcleos, existe pouca dúvida de que eles são extremamente *pluripotentes*. Certamente, muitos genes não usados na pele ou em células sanguíneas, podem ser reativados para produzir os nervos, o estômago, ou o coração de um girino natatório. Assim, cada núcleo no corpo contém a maioria (se não todos) dos mesmos genes.

## Informações adicionais & Especulações

### Clonando Mamíferos por Prazer e Lucro

**C**LONAR SERES HUMANOS a partir de células previamente diferenciadas parece ser o objetivo de editores de jornais e novelistas. Deve ter ficado óbvio da discussão precedente que clonar um indivíduo totalmente desenvolvido, a partir de células diferenciadas, é uma formidável tarefa. Mesmo em anfíbios, os núcleos das células diferenciadas não foram capazes de gerar animais adultos quando colocados em células ativadas e enucleadas.

Além disso, mesmo se rãs adultas pu-

dessem ser geradas de núcleos diferenciados, essa habilidade não poderia ser extrapolada para células humanas. Além das dificuldades éticas e técnicas do trabalho com o organismo humano, o citoplasma do oócito humano pode não responder a sinais emitidos por um núcleo de uma célula em estágio avançado. Transplante nuclear foi conseguido em camundongos, pela remoção de pronúcleos (haplóides) de espermatozóide e óvulo de um zigoto, e substituição por pronúcleos de outro (Figura 2.8; McGrath e Solter,

1983). Esses zigotos reconstruídos começam a se dividir e são então implantados no útero. Os camundongos resultantes exibem o fenótipo do núcleo doador. Enquanto mais de 90 por cento dos zigotos enucleados do camundongo, recebendo pronúcleos de outros zigotos, se desenvolvem até o blastócito (blástula), nem um único embrião (de 81), desenvolveu-se até esse estágio quando núcleos de embriões de 4 células foram transferidos para zigotos enucleados (McGrath e Solter, 1984). Similarmente, núcleos de embriões de 8 células