

Prontos para usar

Nascem os primeiros camundongos transgênicos made in Brazil que servirão de modelo para estudo de doenças



Uma sala de pouco mais de 11 metros quadrados numa nova ala da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), cuja porta está sempre fechada a estranhos, abriga uma pequena fazanha da engenharia genética. Nesse acanhado compartimento, onde dois condicionadores de ar e um exaustor garantem a temperatura controlada entre 22 e 25 graus Celsius e as lâmpadas simulam a luz natural em 14 das 24 horas do dia, funciona um biotério com cobaias especiais.

Dentro de gaiolas de plástico dispostas nas prateleiras que ocupam as duas maiores paredes do ambiente, vive a primeira leva de camundongos geneticamente modificados no país. Os animais, mais de 30 exemplares – o primeiro nasceu em julho, mas o número pode variar de semana a semana, em razão de novos cruzamentos e eventuais baixas –, carregam alterações num gene, o *Fbn1*, responsável pela síntese da fibrilina 1, proteína fundamental para a formação do tecido conjuntivo.

Uma parcela dos roedores recebeu uma versão inativada do *Fbn1*, que simplesmente não produz fibrilina. Outra recebeu uma cópia do *Fbn1* que dá origem a uma forma degenerada dessa proteína. Em seres humanos, essa segunda mutação genética leva à síndrome de Marfan, doença hereditária rara que causa crescimento excessivo dos membros, deslocamento da retina e problemas cardiovasculares, limitando a expectativa de vida a 40 anos. As duas linhagens de camundongos transgênicos foram obtidas por meio da manipulação das células-tronco de embriões, a metodologia mais avançada hoje em dia disponível para essa finalidade.

Os roedores transgênicos *made in Brazil* representam, portanto, a independência nacional num campo importante: a produção de cobaias sob medida para o estudo de problemas de saúde de origem genética. “Com o domínio dessa técnica, vamos produzir nossos próprios modelos animais para o estudo de uma série de doenças que afetam o homem”, diz Lygia da Veiga Pereira, coordenadora do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Biociências da USP, que conduziu a manipulação nas células-tronco dos roedores. “Será mais prático e ainda vamos economizar dinheiro.”

O biotério com as cobaias fica na Medicina Veterinária porque não havia espaço físico no laboratório de Lygia para abrigá-lo. Além disso, pesquisadores da Veterinária, coordenados por José Antonio Visintin, estavam interessados em colaborar com o experimento do IB, montando um biotério para os camundongos, e dispostos a aprender a técnica para empregá-la na geração de animais transgênicos de grande porte. “Queremos alterar geneticamente suínos e bovinos”, comenta Visintin.

Encomendas - O sucesso na produção de camundongos geneticamente modificados levou a pesquisadora a receber as primeiras encomendas de cobaias sob medida, feitas pelo Instituto do Coração de São Paulo (Incor) e pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro. Atualmente, os brasileiros que precisam de cobaias transgênicas têm de importar esse tipo de animal. O custo desses roedores modificados pode ser baixo, se pertencerem a linhagens já desenvolvidas lá fora. E muito elevado, na casa dos milhares de dólares, quando se trata de um animal com uma alteração genética ainda não realizada em nenhum laboratório do mundo.

A obtenção de animais geneticamente modificados depende do pleno domínio das técnicas de manipulação e cultura das células-tronco de

embriões, uma das áreas de pesquisa que mais despertam debates hoje em dia, porque essas células podem ser usadas para fins como a clonagem de espécies. Lidar com esse tipo de célula suscita polêmicas das mais variadas, sobretudo se forem de embriões humanos. Por quê? Porque os embriões dos quais se extraem as células-tronco acabam morrendo após a retirada desse material. Por não trabalhar com células-tronco de embriões humanos, Lygia não enfrenta esse dilema ético.

Na prática, seu primeiro desafio para produzir camundongos transgênicos foi conseguir boas células-troncos de embriões de roedores, ou, na linguagem dos biólogos moleculares, células-tronco altamente pluri ou totipotentes. O que são exatamente essas células e para que servem? São as células primordiais, indiferenciadas, que darão origem a todas as células de um organismo com funções específicas: células nervosas, sanguíneas, musculares, germinativas, cardíacas e as demais (*ver quadro*).

Portanto, a introdução de uma modificação genética no DNA (ácido desoxirribonucléico, portador do código genético e presente em todas as células) de células-tronco de embriões, como a executada pela bióloga molecular do IB nos camundongos, tem grandes chances de ser incorporada por todos os tipos de células que vão formar um organismo, gerando assim um ser transgênico.

A exemplo dos embriões, os seres adultos também têm células-tronco. O problema é que, até agora, só há evidências concretas de pluri-potência no material retirado de embriões – e não no de animais em idade avançada. Por isso, quem se dedica a produzir cobaias transgênicas se vê obrigado a arranjar e cultivar em laboratório células-troncos de embriões de roedores, onde vai ser injetado o DNA alterado.

Foi exatamente isso o que Lygia fez. Do blastocisto (um tipo de célula que antecede a formação do ovozigoto) de camundongos de pelagem

Camundongo geneticamente modificado: independência na produção de cobaias

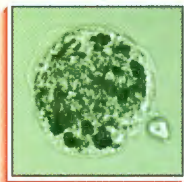
O passo-a-passo de um camundongo transgênico



Os pesquisadores retiram o botão embrionário (no detalhe) do blastocisto, tipo de célula pré-embriônica, de um camundongo.



O botão origina as células-tronco embrionárias, que são cultivadas e recebem o gene modificado.



As células-tronco se juntam a mórulas (à esquerda) de outro camundongo. O conjunto de células forma o embrião, que é implantado em uma “mãe de aluguel”.



Nascem filhotes que expressam o gene modificado em diferentes intensidades: os brancos não o manifestam, os marrons-claro o expressam de forma moderada e os marrons-escuro, intensamente. Os machos marrons-escuro cruzam com fêmeas brancas, e seus filhotes constituem a primeira linhagem de cobaias transgênicas.

SIRO J. B. CANÇADO SOBRE FOTO DE ALEXANDRE KERKIS-IB/USP

agouti, a bióloga molecular retirou o chamado botão embrionário, a partir do qual estabeleceu *in vitro* linhagens de células-tronco embrionárias. Em seguida, substituiu no DNA dessas células-tronco uma das cópias normais do gene *Fbn1* por uma das duas versões do gene modificado, o *Fbn1* incapaz de produzir fibrilina ou o *Fbn1* programado para codificar uma forma degradada dessa proteína.

Os quiméricos - Essas células-tronco modificadas foram, então, cultivadas e agregadas em laboratório a mórulas – células que representam o estágio inicial do desenvolvimento embrionário, retiradas de óvulos fertilizados

– de roedores normais, de pelagem branca. Esse novo conjunto de células formou um embrião, que, por sua vez, foi transplantado para uma “mãe de aluguel”, um camundongo de

sexo feminino – e de pelagem branca. A ela cabe a tarefa de gerar uma ninhada de animais quiméricos.

Por que quiméricos? Esses animais são formados por dois tipos de células geneticamente distintas, uma vinda do embrião original e outra das células-tronco alteradas geneticamente. “O nível de quimerismo pode ser estimado a partir da coloração da pele, variando de 0 a 100%”, diz o russo Alexandre Kerkis, professor visitante do IB, que auxiliou Lygia no desenvolvimento dos camundongos transgênicos. Como a tonalidade agouti é dominante em relação à branca – e o gene alterado foi inserido em células-tronco de animais agouti –, as quimeras mais escuras

O PROJETO

Desenvolvimento de um Modelo Animal para a Síndrome de Marfan através da Manipulação do Genoma do Camundongo

MODALIDADE

Programa Jovem Pesquisador

COORDENADORA

LYGIA DA VEIGA PEREIRA – IB/USP

INVESTIMENTO

R\$ 70.382,31 e US\$ 100.645,00

O futuro das células-tronco

As células animais capazes de se dividir indefinidamente em meio de cultura e originar outras, que desempenham tarefas específicas – formam o tecido nervoso, muscular ou cardíaco, por exemplo –, são chamadas de células-tronco. Há duas grandes categorias: as derivadas do embrião e as de adultos.

As células-tronco embrionárias são mais pesquisadas que as adultas

por serem mais versáteis. Normalmente, provêm do tecido fetal de uma gravidez interrompida ou, com maior frequência, de óvulos fecundados *in vitro* não utilizados por casais com problemas de infertilidade. Os óvulos ficam armazenadas em clínicas e hospitais.

De acordo com seu estágio de evolução, esses óvulos podem oferecer células-tronco totipotentes (po-

dem gerar todos os tecidos de um ser, além do próprio ser), pluripotentes (originam a maior parte dos tecidos) e multipotentes (transformam-se em alguns tipos de células). A retirada das células inviabiliza o embrião, fato que alimenta a polêmica das pesquisas com células-tronco embrionárias. “Essa questão está mal-posta”, opina Marco Antonio Zago, professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. “Esses embriões foram descartados e nunca iriam gerar um ser.”

apresentam maior quantidade de células derivadas das células-tronco modificadas. Ou seja, nelas a alteração genética se incorporou plenamente ao DNA. Já nas quimeras mais claras, obviamente, o grau de expressão da alteração genética é menor.

Nova linhagem -É por essa razão que, na hora de promover os cruzamentos finais que vão resultar na criação de uma linhagem estável de roedores transgênicos, os pesquisadores usam fundamentalmente as quimeras de pelagem agouti.

“O processo de gerar uma nova linhagem de camundongos transgênicos demora cerca de um ano”, comenta Lygia, que aprendeu a técnica de manipulação de células-tronco embrionárias no início da década de 90, durante doutorado no Hospital Monte Sinai de Nova York. É um processo demorado e, além das dificuldades com células-tronco e manipulação genética, sempre há o risco de se perder uma ninhada de camundongos transgênicos. Em setembro do ano passado, por exemplo, um leve descuido na assepsia do biotério fez uma colônia de camundongos que estava sendo manipulada para um experimento pegar sarna e ser descartada. Um pequeno acidente de percurso que atrasou o cronograma dos pesquisadores do IB e da Veterinária, mas não os tirou da rota traçada. •

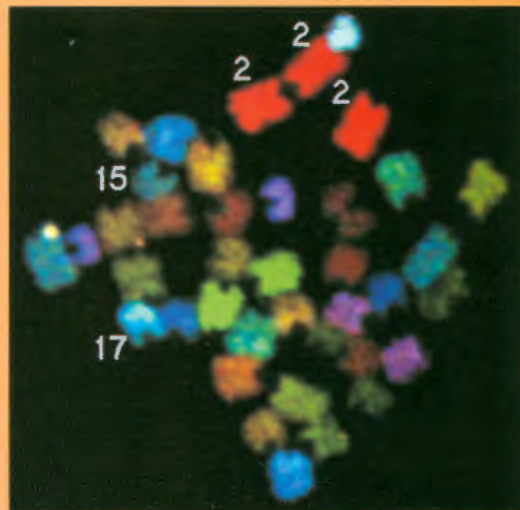
Em adultos, as células-tronco provêm da medula óssea, do cordão umbilical e, em menor quantidade, da própria corrente sanguínea. O problema é que ainda faltam evidências indiscutíveis de pluripotência nas células-tronco obtidas de seres desenvolvidos. “Houve alguns avanços nessa área nos últimos anos, mas o assunto ainda é controverso”, diz Zago, que pesquisa o sangue do cordão umbilical como fonte de células para doenças como leucemias.

Estudo detecta variação cromossômica bem acima do esperado em neurônios

Num sistema nervoso normal, os neurônios devem possuir um genoma idêntico. Seu cariótipo deve ser composto pelo mesmo número de cromossomos. É o que diz a teoria. Na prática, a realidade pode ser mais complexa, como mostra o resultado de um estudo feito por pesquisadores da Escola de Medicina da Universidade da Califórnia, em San Diego, Estados Unidos, com participação do brasileiro Stevens Kastrup Rehen, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que faz pós-doutorado na instituição norte-americana. O trabalho revela que um terço dos neuroblastos, células precursoras dos neurônios, de embriões de camundongos apresentam uma quantidade variável de cromossomos. Em vez dos esperados 40 cromossomos, 33% dos mais de 200 neuroblastos analisados continham cromossomos a mais ou a menos do que o padrão. “Esse nível de aneuploidia (variação no número de cromossomos) é dez vezes maior do que o padrão aceito na citogenética convencional”, diz Rehen, que está publicando o trabalho na revista *Proceedings of the National Academy of Sciences*, da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos. Nos linfócitos, um tipo

de glóbulo branco do sangue, a taxa de aneuploidia é de 3%.

As medições foram feitas durante a mitose dos neuroblastos, processo de divisão de seu núcleo, que se parte e gera duas células-filhas. Quando a mitose é perfeita, as células-filhas têm o mesmo número de cromossomos da célula-mãe. Pelos dados da pesquisa, esse processo apresenta muitas imperfeições no caso dos neuroblastos. Felizmente, o destino da maioria desses neuroblastos com cromossomos a mais ou a menos é morrer à medida que o organismo cresce. Tanto que os níveis de aneuploidia em neurônios, os sucessores dos neuroblastos, de camundongos adultos é significativamente menor, da ordem de 10%. Menor, mas não desprezível. Rehen acredita que a maior prevalência de aneuploidia em neurônios adultos pode ser um indicativo de maior predisposição a doenças neurodegenerativas. •



Os anormais: há três cromossomos 2 (vermelho) e apenas um 15 (azul claro) e 17 (esverdeado). O cariótipo normal de neuroblasto de rato tem 20 pares de cromossomos