

Desertos férteis

Método identifica seqüências funcionais de DNA em meio às imensidões desprovidas de genes

MARCELO LEITE

Marcelo de Aguiar Nóbrega é filho do Recife e adotou a Califórnia para viver, mas mantém distância das ondas e da praia. Sua paixão são os desertos – de genes, bem entendido. Após três anos de garimpo naquele um terço do genoma humano em cujas areias se acreditava não haver nem sombra de genes e que por isso foi durante anos injustamente glosado como DNA lixo, o pesquisador do Laboratório Nacional Lawrence Berkeley, nos Estados Unidos, começa a colher resultados de alto quilate: não só as dunas genômicas estão cheias de oásis, na forma de seqüências de DNA com funções ainda pouco conhecidas, como o brasileiro está na vanguarda dos métodos para mapeá-los.

Os achados já estão rendendo ao pernambucano de 32 anos artigos e reportagens em publicações de alto impacto, como *Science* e *Nature*. O primeiro veio na forma de um pequeno relato na *Science* de 17 de outubro do ano passado, sob o título “Varredura dos desertos gênicos humanos em busca de amplificadores de longa distância”. O

próximo manuscrito já foi aceito por uma revista de primeira linha, mas ainda se encontra sem data definida de publicação. Por ora, os novos resultados só foram apresentados em encontros científicos, como o 50º Congresso Brasileiro de Genética, realizado em Florianópolis de 7 a 10 de setembro. Entre um e outro, a pesquisa do laboratório de Edward Rubin, onde Nóbrega trabalha, foi objeto de notícias na própria *Science*, em junho, e na *Nature Reviews Genetics*, em dezembro do ano passado.

As descobertas do grupo são tão intrigantes quanto o termo *enhancers* ou amplificadores, em uma tradução aproximada. *Enhancers* são seqüências de DNA que modulam a expressão de genes na célula, favorecendo a produção das proteínas por eles especificadas. Supunha-se até agora que esse gênero de elemento regulador ficasse sempre na vizinhança dos genes propriamente ditos, ou seja, dos seus módulos ditos codificantes (os éxons, que especificam tipo e ordem dos aminoácidos que vão compor a proteína correspondente), ou ao menos dos não-codificantes (íntrons). O trabalho de genômica comparativa da equipe de Rubin e Nóbrega tem mostrado, porém, que esses moduladores podem estar, paradoxalmente, a centenas de milhares de pares de bases

daquilo que modulam – no meio dos desertos gênicos.

“Para usar uma metáfora, imagine que os elementos regulatórios de um gene sejam equivalentes ao interruptor de uma lâmpada”, explicou Nóbrega durante o curso que deu no congresso de Florianópolis, que lotou o salão Flores do resort Costão do Santinho. “Normalmente você pensaria que o interruptor da lâmpada do seu quarto está no quarto, não é? O que a gente mostrou agora é que é possível que esse interruptor esteja na garagem de uma casa no quarteirão vizinho.”

Nóbrega estudou medicina na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde entrou aos 16 anos, depois de alfabetizar-se aos 4. “Minha mãe pôs os filhos cedo na escola para se livrar da gente”, conta. Numa família em que todos são engenheiros, até seu irmão gêmeo, ele foi o único a aventurar-se na medicina e na pesquisa. Começou como estagiário num laboratório da UFPE, pesquisando fisiologia (hipertensão) por três anos, com Ana Maria Cabral, e antes mesmo de se formar foi para o laboratório de Allen Cowley na Universidade de Wisconsin, em Milwaukee, nos Estados Unidos, pois queria “ser exposto a pesquisa ainda mais séria”. Para isso interrompeu o es-

tudo formal por seis meses, no meio, mas depois voltou ao Recife para terminar o curso de medicina. Em 1995, aos 23, já era aceito para o doutorado em Wisconsin.

Com o Projeto Genoma Humano perto da conclusão, largou a hipertensão e se bandeou para estudar biologia molecular com Howard Jacob, que Wisconsin havia acabado de tirar de Harvard a peso de ouro. Terminado o doutorado, procurou um laboratório que trabalhasse com genes e doenças e foi bater à porta de Eddy Rubin. Apesar de certa incompatibilidade no estilo de vida – o chefe é fanático por surfe e fala com os pupilos de olho num serviço californiano *on-line* sobre o *swell* ou intensidade das ondas –, Nóbrega aceitou no ato uma missão que parecia fadada ao fracasso, três anos atrás: iniciar uma linha de genômica comparativa para esquadrihar os desertos.

Quando fala de desertos gênicos, Nóbrega se refere àqueles 25% a 30% do genoma humano que compõem regiões intergênicas com mais de 500 mil pares de bases (ou kb, a medida padrão da genômica). Essas regiões intergênicas haviam sido qualificadas como desertos e incluídas com vários tipos de seqüências repetitivas no DNA lixo, assim chamado porque não participa di-

retamente do que se considerava a função por excelência do DNA, especificar aminoácidos.

O valor do DNA lixo ficou ainda mais saliente quando o alinhamento das seqüências dos genomas do homem e do camundongo revelou entre os desertos gênicos centenas de trechos com pelo menos 200 pares de bases idênticos, ou quase. Esse trabalho de busca em massa de seqüências não-codificantes ultraconservadas foi publicado em 28 de maio deste ano na *Science* por David Haussler, da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (UCSC), Estados Unidos, mas uma das primeiras havia sido descoberta pelo time de Rubin.

Já se sabe que há cerca de 1.250.000 regiões evolutivamente conservadas com extensão de pelo menos cem pares de bases e 70% de coincidência entre os genomas do homem e do camundongo, 80% delas em regiões não-codificantes (não-éxons) e 58% no espaço intergênico (não-éxon e não-ítron). O fato de essas seqüências de DNA encontrarem-se tão conservadas após mais de 70 milhões de anos de divergên-

cia evolutiva entre primatas e roedores faz supor que elas tenham, sim, alguma função. O problema era descobrir qual. Foi essa a incumbência que Nóbrega aceitou de Rubin, quando se mudou de Wisconsin para a Califórnia.

Uma das especialidades do laboratório de Rubin no Lawrence Berkeley é a criação de camundongos geneticamente modificados, e Nóbrega tirou partido disso. Ali se injetam 500 óvulos de roedor por dia com DNA, o que reduz numa média diária de 15 a 20 animais com modificação genética bem-sucedida. O grupo escolheu nove seqüências desérticas para testar, a fim de descobrir se tinham alguma função desconhecida. Todas elas estavam presentes em regiões genômicas áridas que flanqueavam um gene importante no desenvolvimento embrionário, o DACH, que tem 430 kb de extensão e, como vizinhos, desertos de 1.330 kb e 830 kb. O teste propriamente dito consistiu em confeccionar camundongos com uma cópia de cada uma dessas seqüências acoplada a um gene de bactéria que, se ativado, faz a célula toda que o ativou ficar tingida de azul.

Examinando os fetos dos roedores transgênicos, Nóbrega observou que sete das nove seqüências escolhidas participavam de algum modo do de-

envolvimento embrionário, pois vários órgãos e estruturas – como partes do sistema nervoso, olhos e medula espinhal, exatamente tecidos em que o gene DACH costuma estar ativo – ficaram azuis. Segundo o pesquisador pernambucano, as lições desse trabalho – publicado na *Science* em outubro de 2003 – foram duas: “Uma, que desertos gênicos não contêm genes, mas podem conter seqüências que são críticas para funções de genes na vizinhança; e, duas, que elementos reguladores de genes podem estar a distâncias incríveis do mesmo, muito maiores do que antes imaginado”.

Sete áreas desérticas com função comprovada, porém, são quase nada diante de mais de 1 milhão de seqüências ultraconservadas entre humanos e camundongos. Partindo da pressuposição de que a maioria talvez não tivesse função importante, ou seja, seria mesmo algum tipo de lixo, o grupo saiu em busca de um filtro capaz de discriminar aqueles trechos com maior probabilidade de desempenhar alguma função. O passo seguinte foi dado com a ajuda de um parente vertebrado ainda mais distante do homem, um peixe, mais precisamente um tipo de baiacu venerado na culinária japonesa, *Fugu rubripes*, do qual nos separamos 450 milhões de

anos atrás. Seu genoma acabava de ser publicado. Em lugar de compartilharmos mais de 1 milhão de seqüências, com o baiacu, partilhamos apenas 40 mil regiões conservadas, 56% em éxons e só 36% em espaços intergênicos.

Para Nóbrega, isso significa que essas seqüências provavelmente estão envolvidas no que há de mais básico no plano corporal de todos os vertebrados, não importa se terrestre, alado ou aquático. Se forem alteradas por uma mutação, provavelmente tornam inviável o indivíduo mutado. Isso acarreta a imediata remoção daquela variante do *pool* genético, permitindo assim a conservação daqueles trechos cruciais de DNA, mesmo fora de genes, por quase meio bilhão de anos. Em suma, estavam de posse de um provável excelente guia para descartar desertos conservados de menor interesse sugeridos em profusão pela simples comparação homem/camundongo. Mas antes era preciso provar que seqüências mantidas por 70 milhões de anos eram de fato menos essenciais que as de 450 milhões de anos.

Foram esses os experimentos apresentados por Nóbrega em seu curso no Congresso Brasileiro de Genética, há um mês, cujos resultados devem ser publicados em breve numa revista de primeira linha. Um total de 15 seqüências desérticas conservadas do camundongo para o homem, mas não desde o baiacu, foram objeto de testes com camundongos, e apenas uma delas revelou função – uma proporção muito menor do que as 7 do total de 9 vizinhas ao gene DACH. “Os outros 14 trechos?”, pergunta o brasileiro. “Não temos idéia do que sejam e de que atividade tenham, se é que têm alguma.”

O grupo do Lawrence Berkeley decidiu ir além, pois não estava excluída a possibilidade de que a ausência de atividade das seqüências escolhidas fosse um artefato do desenho experimental, ou seja, do tipo de função que o método empregado com o gene DACH tinha capacidade de revelar. Para isso Nóbrega recorreu ao que chama de ensaio força-bruta: pura e simplesmente remover algumas dessas seqüências do genoma de camundongos, para ver o que acontecia. Força bruta mesmo: arrancaram logo dois desertos inteiros, um com 1,5 milhão de bases, outro com 800 mil, só para

ver o estrago e assim descobrir possíveis funções. Nada aconteceu.

“Arquitetamos as maiores deleções já feitas em camundongos”, contou Nóbrega em seu curso. “Surpreendentemente, não só os camundongos com as deleções que fizemos foram viáveis como eles cresceram, se reproduziram e não desenvolveram nenhuma anormalidade aparente. Ou seja, parece que o que arrancamos equivale, de fato, a um pedaço do genoma menos importante, ou no mínimo menos crítico, do que outros.” Nem mesmo algum tipo de instabilidade cromossômica foi observado, embora num dos casos tenham sido deletados quase 10% do cromossomo do animal.

Não foi à toa que o trabalho, mesmo antes de publicado, chamou a atenção da *Science*. Na reportagem publicada em 11 de junho, o geneticista Jim Hudson, da empresa Open Biosystems, do Alabama, nos Estados Unidos, declarou sua incredulidade: “Nocautear dois megabases e não obter efeito é notável”. Mais cético ainda se disse Arend Sidow, da Universidade Stanford: “Não pode ser verdade”. Ambos afirmaram à revista norte-americana que provavelmente as regiões deletadas cumprem funções que os testes não foram capazes de detectar.

Nóbrega não descarta tal hipótese, mas afirma que o resultado não é assim tão absurdo, à luz de descobertas recentes sobre a ocorrência em seres humanos normais de deleções espontâneas e acréscimos enormes de DNA, também, da ordem de 100 mil a 2 milhões de bases. “Tudo começa a se encaixar e a fazer sentido”, diz. Os trabalhos foram publicados por Jonathan Sebat e colaboradores na *Science* de 23 de julho, e por John Iafrate e colegas na *Nature Genetics* do mês passado. Aparentemente, essas alterações estão associadas com a variação fenotípica entre indivíduos, ou seja, representam uma fonte antes insuspeitada – mais uma – do que os geneticistas chamam de polimorfismos.

“Começa uma nova corrida para ver quem consegue – de forma mais completa, rápida e barata – escanear o maior número possível de genomas à procura dessas variações de grande escala”, resume Nóbrega. “Para minha sorte, eu já vinha pensando nisso há algum tempo e, assim, comecei a correr antes dos outros.” O pesquisador brasileiro diz que sua próxima meta é

combinar a genômica comparativa com a engenharia genética para desenhar um mapa de variações naturais na arquitetura do genoma, por meio de deleções de grande escala, e do seu impacto na biologia e fisiopatogenia dos organismos. “Todo o genoma agora é alvo para buscar seqüências funcionais.”

Esse trabalho já está dando frutos surpreendentes para o entendimento da complexidade do genoma. Primeiro, descobre-se que há vários oásis em meio aos desertos gênicos. Depois, que nem tudo que parece oásis é oásis de fato, quer dizer, alguns desertos são tão desertos que podem produzir miragens – quando o pesquisador se limita a comparar cromossomos humanos com os de camundongos.

A força bruta que Nóbrega empregou com os roedores, pelo menos, já lhe permitiu extrair deles uma solução parcial para a questão posta por seu chefe na *Science*: será o genoma uma novela descartável, da qual se podem arranjar cem páginas sem problema, ou será como uma obra de Ernest Hemingway, em que o enredo se desfaz se uma única página se perder? Resposta à brasileira: “Parece mesmo que o genoma é uma novela da Globo, e não um *Código da Vinci*”.