

NOTAS SOBRE EXPERIMENTOS COM CLONAGEM

Suzi de Almeida Vasconcelos Barboni
Prof. Assistente do Dep. de Ciências Biológicas
Cyntia Cajado de Souza
Aluna do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

RESUMO — *Breve registro sobre a clonagem molecular de genes, utilizando um modelo experimental trabalhado durante o mestrado de uma das autoras. Repercussão da clonagem de mamíferos, utilizando como modelo de análise a recente produção da ovelha “Dolly”.*

ABSTRACT — *A brief register about molecular cloning of genes making use of an experimental model developed during the author's master course. Spread of mammals cloning taking as model for analysis the recent production of Dolly.*

Hoje, Visconde, a novidade vai ser esta pulga. Vamos fazer nela um enxerto de tireóide de formiga e pituitária de grilo. Há de dar qualquer coisa interessante, disse Emília.

Monteiro Lobato, *A Reforma da Natureza*.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento da Biologia Molecular e das demais áreas afins, uma imensa variedade de avanços tecnológicos foi conquistada, graças a atividade de pesquisa de diversos grupos em todo o mundo. Os avanços se deram principalmente, no sentido de se isolar, alterar e reintroduzir, em laboratório, o material genético, para depois ser reintroduzido em microrganismos, sendo a essência dessa tecnologia a possibilidade de gerar espécies melhoradas ou novas (LEWIN, 1994).

Os trabalhos pioneiros de BERG e cols. (revisto em 1981) e de COHEN e cols. (1973) marcaram o advento da Tecnologia do DNA Recombinante (TDR), ou Engenharia Genética. E, desde então, a Biologia Molecular vem desenvolvendo nos meios acadêmicos e tecnológicos atuais o que se poderia chamar de uma verdadeira revolução.

Assim foi possível a realização da **clonagem**, ou seja, a produção de células ou de moléculas de DNA idênticas, *in vitro*, a partir de um único

ancestral. Os **clones** seriam, então, as cópias deste modelo. O cientista tem à sua disposição técnicas que lhe permitem um certo “poder criador”, uma vez que eles podem criar, por métodos artificiais, organismos não encontrados na natureza (ASTOLFI FILHO e cols., 1985).

Essas técnicas já são usadas há algum tempo. Durante os anos 70, quatro sistemas de recombinação em microrganismos já eram conhecidos e estavam estabelecidos, (sendo os dois primeiros naturais):

- 1 - a conjugação, ou troca de informação genética, que ocorre em bactérias, envolvendo a troca do plasmídeo sexual F entre as células;
- 2 - os elementos de inserção e transposons, que são segmentos de DNA capazes de mudar de posição de uma região do genoma para depois se inserirem em outra;
- 3 - fusão de protoplastos, remoção da parede celular, e promoção da fusão com outra célula, ou da mesma linhagem ou até de espécies diferentes, obtendo-se um hibridoma, uma célula híbrida;
- 4 - tecnologia do DNA recombinante, permite a recombinação genética entre espécies distintas, via manipulação do DNA (ASTOLFI FILHO e cols., 1985).

Eucariotos modificados geneticamente pela TDR são chamados “transgênicos”; e “recombinantes”, em caso de microrganismos. Esses são caracterizados pela aquisição de novas características pela adição de genes exógenos em seu genoma. Se as novas características genéticas se tornarem estáveis, elas passam a fazer parte de seus patrimônios genéticos, sendo transmitidas aos seus descendentes, o que naturalmente não aconteceria.

Aplicado à prática, o êxito no transplante do DNA em bactérias, por exemplo, poderá fornecer, em menos de 24 horas, cerca de um bilhão de descendentes da célula transformada, com genótipo idêntico a essa. Ou seja, a clonagem gera indivíduos geneticamente iguais, reduzindo a variabilidade genética.

Graças a essa prodigiosa capacidade de duplicação, é possível, atualmente, a partir de 7,5 quilogramas de bactérias produzir os mesmos 5mg do hormônio somatostatina obtidos a partir de 500 000 cérebros de carneiros (NOTHENBERG, 1988). Tradicionalmente, a produção de alguns peptídeos utilizados pela Medicina estava condicionada à purificação, a partir de tecidos animais ou humanos, para o que, além de serem requeridas altas quantidades de matéria-prima, acarretava o risco de contaminação viral cruzada, por exemplo. Preparações industriais do hormônio de crescimento humano iso-

lado, a partir de hipóteses humanas foram suspeitas de estarem contaminadas com o agente causador do mal de Creutzfeldt-Jakob, doença que debilita o sistema nervoso, hoje associada à mesma origem do devastador “mal da vaca louca” (JOSEPHSON E BISHOP, 1988; BARBONI, 1990).

Investido do “poder criador” através da manipulação gênica, não se trata de o cientista estar “brincando de Deus”, como sugeriu a jornalista June Goodfield, em seu livro homônimo publicado no Brasil em 1981. Mas, acima de tudo, os propósitos básicos da Engenharia Genética estão voltados para a melhoria das condições de vida no planeta, seguindo critérios científicos e éticos, passando pela supervisão e regulamentação dos Governos e comitês científicos.

É possível certificar-se dessas intenções através das tecnologias introduzidas na indústria de produção de fármacos, vacinas e enzimas; na obtenção de plantas resistentes a herbicidas e a pragas; no melhor aproveitamento dos recursos naturais não-renováveis, como minérios; ou mesmo, na pesquisa acadêmica básica, a qual provê a pesquisa aplicada de subsídios operacionais, em áreas que são fundamentalmente *science intensive*.

Eventos dessa natureza já são realidade no Brasil. Milho transgênico cultivado pela Sociedade Agrícola Germinal, em São Paulo, tem seu material genético híbrido com o de uma bactéria, que garante resistência à broca do colmo. Ainda em 1997, a EMBRAPA-CENARGEN dará início à produção de clones animais a partir de embriões. O órgão americano de controle de qualidade de alimentos (*Food and Drug Administration*), recentemente, liberou a comercialização de alguns legumes transgênicos (tomates e cenouras) que apresentam novos sabores, cores e de lento amadurecimento após colheita. Assim, a Biologia Molecular e a Engenharia Genética aparecem no cenário tecnológico mundial num papel inovador, abrindo novas perspectivas em todas as áreas de interesse econômico, alimentar, saúde, entre outras.

Essas aplicações práticas do uso de células e de processos biológicos em larga escala constituem a chamada Biotecnologia e têm sido amplamente divulgadas pela mídia, com enorme repercussão. Sem dúvida, trata-se de algo surpreendente, desde que, pela primeira vez na História, existe a manipulação consciente dos processos biológicos para aplicação em diversos ramos da atividade humana. No entanto, pelo grande valor econômico das descobertas e conseqüente patenteamento dos produtos e dos processos, bem como o impacto social causado (como a recente divulgação nos meios de comunicação da obtenção de ratos bioluminescentes, pela adição em seu genoma de genes que produzem proteínas bioluminescentes, encontradas em seres abissais, por exemplo), o desenvolvimento científico é prejudicado. As

descobertas que têm gerado esperanças na solução de diversos problemas geram também o “fabuloso”, a novidade. Ou seja, são distorções que levam a uma avaliação incorreta da sociedade sobre o verdadeiro significado dos experimentos com clonagem e suas conseqüências (MARQUES, 1996).

MODELOS EXPERIMENTAIS ANALISADOS

EXPERIMENTO I

Há vários métodos para produção *in vitro* de clones ou células geneticamente iguais. Entre eles estão os experimentos realizados pelo Dr. IAN WILMUT e cols. (1997), do Instituto Roslin e da empresa PPL Therapeutics, de Edimburgo, na Escócia, que ficaram conhecidos mundialmente pelo que a mídia chamou de “clonagem de Dolly”, foram divulgados no início deste ano, pela revista *Nature*. No artigo, além da ênfase na produção da ovelha, sem manipulação do material genético, foi ressaltado, pela primeira vez na literatura científica, a possibilidade da aplicação da abordagem que eles desenvolveram para a clonagem de humanos.

A técnica consistiu no isolamento de óvulos de um ovelha adulta (da raça cara preta escocesa) com a retirada de seu núcleo, e união a núcleos de células de glândulas mamárias de ovelhas de lã clara, considerada “mãe-gêmea”. Os “preparados celulares” foram transferidos para condições ensaio, onde é permitida a reconstrução de uma nova célula. As células consideradas aptas a formar um novo embrião foram transferidas para uma ovelha-mãe e então o embrião se desenvolve. Para a geração de “Dolly” foram utilizadas, então, três ovelhas: a receptora do embrião, a doadora da célula sem núcleo e a doadora do núcleo, sendo que apenas a primeira não influenciou nas características do animal.

O experimento e seu produto final lançam novas luzes sobre o estudo da diferenciação celular, a reprodução de animais transgênicos e o estudo de moléstias degenerativas. Areladas a essas, diversas justificativas científicas surgiram para execução de novos experimentos utilizando outras espécies animais. Entre elas, como fonte de avanços para a área médica, por exemplo, o preparo de células imunocompatíveis para o transplante ou como opção de ter filhos para casais estéreis. Na agropecuária é onde reside seu maior potencial de aplicação. Animais portadores de qualidades comercialmente desejáveis poderão ser copiados, multiplicando assim a qualidade

dos rebanhos. No entanto, um rebanho geneticamente idêntico corre o risco de ser dizimado completamente, caso haja uma epidemia a que os animais sejam suscetíveis. A clonagem se contrapõe à variabilidade genética que naturalmente ocorre nas populações a qual evita que todos os indivíduos sejam exterminados numa epidemia.

Além desses aspectos abordados, surgiram também as questões de ordem ético-sociais. Pessoas que desejam garantir a produção de filhos com as mesmas características genéticas que as suas ainda não encontram respaldo científico para concretização de seus desejos. Para tanto, pela primeira vez na história da ciência, diversos grupos de pesquisadores criaram, via Internet, com divulgação na mídia, os serviços *Clonaid* e *Insuraclone*, os quais, a custos que variam entre US\$ 50 mil e US\$ 200 mil, garantem produzir clones humanos, sem deixar claro qual a metodologia que utilizam para viabilizá-los.

Entretanto, o Dr. Ian Wilmut, o criador da metodologia que propiciou a concepção de “Dolly”, acredita não ser possível que o protocolo seja aplicável a células humanas com o mesmo sucesso.

Além disso, “Dolly” não é um clone conforme definição apresentada anteriormente, pois não é geneticamente idêntica ao seu ancestral, a ovelha doadora do núcleo (ovelha de lã clara) devido à existência de outro DNA — o DNA mitocondrial — que estava presente na célula receptora (ovócito anucleado, proveniente de ovelha da raça cara preta escocesa). Em humanos, por exemplo, a mitocôndria possui DNA de fita dupla com 37 genes, os quais codificam proteínas da cadeia respiratória e alguns RNAs. Algumas sérias doenças genéticas humanas são atribuídas a mutações do DNA mitocondrial, como a neuropatia óptica hereditária de Leber, que causa a perda da visão bilateral; e a epilepsia mioclônica ou doença da fibra vermelha estragada, que é caracterizada por um espasmo muscular intenso (LEHNINGER e cols., 1995). Isso remete à reflexão da influência dos genes mitocondriais na formação do indivíduo, ainda que essa contribuição seja pequena.

Outro aspecto ressaltado é que a herança humana não é só biológica. O ambiente familiar, cultural e social têm influências diferentes sobre as pessoas na aquisição da personalidade. Ou seja, o desenvolvimento é imprevisível. Não há determinismo genético, pois os fatores ambientais são também controladores da manifestação de genes. Estudo de clones em ambientes diferentes poderão responder a algumas perguntas sobre interação de fatores genéticos e ambientais na determinação de certas características.

EXPERIMENTO II

Existem, por outro lado, formas de se obter organismos geneticamente manipulados através de métodos de produção de DNAs quiméricos *in vitro*, pela via de ligação de fragmentos obtidos pela clivagem com enzimas de restrição e ligação dos mesmos com a enzima T4 DNA ligase (COHEN e cols., 1973). São as técnicas propostas pela Engenharia Genética, que se apresenta como “arma poderosa” para o melhoramento genético. De posse dessas técnicas, foi possível romper as barreiras entre as espécies, podendo-se reunir num só organismo as qualidades de seres diferentes, como as bactérias e o homem (SCHENBERG-FRASCINO, 1985). Exemplificando, em 1977, quando ITAKURA e cols. (1977) conseguiu a produção do interferon humano em *Escherichia coli*, e em 1980, MULLIGAN e BERG referem-se ao êxito obtido na expressão de genes bacterianos em células de mamíferos.

Esses métodos são muito aplicados em células procarióticas, especialmente *E. coli* e bactérias do gênero *Bacillus*; assim como leveduras; fungos e células vegetais. Produzida a molécula nova *in vitro*, esta deverá ser introduzida numa célula hospedeira para ser propagada. Esse processo recebe o nome de **transformação genética**, que teve como marco histórico a comprovação de que a transformação de *Pneumococcus* era mediada pelo DNA (AVERY e cols., 1944).

As técnicas de transformação variam de acordo com a célula hospedeira. Os protocolos modernizam-se a cada dia, objetivando melhorar a eficiência de transformação, ou seja, um maior número de transformantes por massa de DNA exógeno utilizada.

Diversos trabalhos de pesquisa têm sido realizados em todo meio acadêmico e tecnológico mundial, valendo-se dessas técnicas de manipulação *in vitro* do DNA oferecidas pela TDR, visando obter microrganismos com potencial hidrolítico industrialmente desejáveis. Dentro dessa linha, alguns grupos brasileiros se destacam, como, os Laboratórios de Biologia Molecular e Enzimologia da Universidade de Brasília.

O resultado de um experimento realizado por nós (BARBONI, 1990), para a produção de microrganismos recombinantes, é apresentado na fig. 1.



Fig.1- Eletroforese em Gel de agarose 0,8% dos plasmídios recombinantes construídos e digeridos com: *EcoRI* (liberando fragmento de 2,4Kb)

1 - pABC1

2 - pAA11

3 - pKA11

4 - pTA11

EcoRI / *HindIII* (liberando o fragmento de 1,9Kb)

6 - pAA88

7 - pKA88

8 - pTA88

9 - pASA28

No "slot" 5, DNA do fago _ digerido com *EcoRI* / *HindIII*. O plasmídio representado no "slot" 8 não foi utilizado nos experimentos deste trabalho.

Vários experimentos foram realizados objetivando a expressão do gene de alfa-amilase de *Bacillus subtilis* em *Escherichia coli*, (um organismo que naturalmente não produz essa enzima) sob controle de diferentes promotores em diferentes linhagens.

O resultado apresentado mostra que os plasmídios recombinantes apresentam o perfil de restrição esperados. Ou seja, os plasmídios portadores do fragmento de 2,4 Kb (AMY) digeridos com *EcoRI* liberaram o fragmento (poços de 1 a 4). Já os plasmídios portadores da inserção de 1,9 Kb (AMY*) digeridos com *EcoRI* / *HindIII* estão nos poços 6 a 8.

Os clones de *E. coli* transformados com plasmídios recombinantes mostraram-se estáveis produtores de alfa-amilase. Assim, a bactéria que antes não possuía a característica produção de alfa-amilase passou a tê-la, através da inserção de um gene exógeno em seu genoma.

NOTAS FINAIS

Algumas notas sobre experimentos envolvendo clonagem foram vistas acima, enfocando seus múltiplos aspectos e conseqüências, sem querer esgotar o assunto ou abrir polêmicas. Seria absurdo supormos que o que expomos seja completamente satisfatório e nada tenha deixado por explicar, diante de um tema tão complexo.

Vistas as duas possibilidades aqui expostas — clonagem a partir de células e clonagem molecular de genes — levaram o mesmo grupo que produziu a “clonagem da ovelha Dolly”, a produzirem uma outra ovelha (desta vez, chamada Polly) a qual possui genes humanos. Com divulgação apenas na mídia, a ovelha foi obtida por engenharia genética em células fetais, utilizando genes humanos. Polly é, portanto, um animal transgênico.

Segundo os pesquisadores envolvidos nesse experimento, o objetivo principal é tentar obter, em escala comercial, produtos terapêuticos, como proteínas humanas do leite e do sangue. E aí reside a grande diferença e novidade em relação à clonagem da ovelha Dolly.

Há, no Brasil, legislação que regulamenta a atividade de grupos de pesquisa e de projetos que envolvam Engenharia Genética e projetos biotecnológicos. Trata-se da Lei n. 8 974, de 5 de janeiro de 1995, que regulamenta os incisos II e V do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal. Nesse documento, são estabelecidas normas para o uso das técnicas de Engenharia Genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados,

* Leia-se AMY estrela.

visando proteger a vida dos seres vivos, bem como o meio ambiente. A partir desse documento, foi criada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CNTBio – órgão fiscalizador, vinculado ao Ministério da Ciência e Tecnologia, pelo decreto n. 1 752/95. (VALLE, 1996).

As técnicas de clonagem que permitiram ao homem intervenção no processo de reprodução das espécies, desde microrganismos até a espécie humana, levam a uma grande perspectiva no campo da pesquisa e da manipulação genética e do estudo de características adquiridas pela adição de genes ao genoma inicial e sua capacidade de transmiti-las.

A clonagem de células animais aponta o caminho para a terapia gênica humana. Esse campo visa tratar apenas doenças genéticas severas. Mas, à medida que se avança, avança também o potencial de alterar características físicas. Daí, o envolvimento da sociedade no debate dessas questões.

O potencial uso da tecnologia de manipulação do DNA e conseqüente produção de clones parece aparente para o benefício da humanidade e do meio ambiente, em meio a tanta controvérsia. É consenso, porém, que os caminhos devem ser norteados pelos princípios éticos e científicos, ainda que seja difícil de se definir pelo nosso limitado entendimento do metabolismo celular e da ecologia, a que conseqüências chegaremos com nossa intervenção nos segredos da vida (MARQUES, 1996; LEHNINGER e cols., 1995; BARBONI, 1990).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho (UnB/Brasília) pelo apoio constante que tem dado aos nossos projetos de pesquisa na área da Biologia Molecular.

Ao Prof. Raymundo Luiz Lopes, editor desta revista, e a Regivaldo Rios, secretário de *Sitientibus*, pela atenção dispensada às autoras.

Ao Prof. André Renê Barboni, do Laboratório de Informática em Saúde - LIS/UEFS, pelo auxílio na edição dos textos que culminaram com esta publicação.

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres, Professor Adjunto (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília (UnB), pelas críticas, correções e sugestões apresentadas.

Aos alunos do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UEFS pelo estímulo constante que recebemos, a quem dedicamos este trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTOLFI FILHO, S., AZEVEDO, J. L., AZEVEDO, M. O. Novas técnicas de recombinação em microrganismos: a engenharia genética pela tecnologia do DNA recombinante. In "Genética de Microrganismos", Piracicaba/São Paulo: FEALQ, 1985.
- AVERY, D. T., MC LEOD, C. M., MC CARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Exp. Med.*, n.79 p.137-158, 1944.
- BARBONI, S. A V. Expressão do gene de alfa-amilase de *Bacillus subtilis* em *Escherichia coli* sob controle de diversos promotores. Brasília, 1990. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, UnB.
- BERG, P. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science*, n.213 p.296-303, 1981.
- COHEN, S. N., CHANG, A C.Y., BOYER, H.W. E HELLING, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, n.70 p.3240-3244, 1973.
- ITAKURA, K., HIROSE, T., CREA, R., RIGGS, A D., HEYNEKER, H. L., BOLIVAR, F., BOYER, H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, n.198 p.1056-1063, 1977.
- JOSEPHSON, S., BISHOP, R. Secretion of peptides from *Escherichia coli*: a production system for the pharmaceutical industry. *TIBTECH*, n.6 p.218-224, 1988.
- LEHNINGER, A L., NELSON, D. L., COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LEWIN, B. *Genes V*. 5.ed. USA: Wiley, 1994.
- MARQUES, Edmundo Karan. Impacto de novas tecnologias genéticas: a necessidade de uma nova ética. In: REUNIÃO ESPECIAL da SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 4., Anais..., Feira de Santana, Universidade Estadual de Feira de Santana, 1986
- MULLIGAN, R. C.; BERG, P. Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, n.209 p.1422-1427, 1980.
- NOTHENBERG, A. Auto-suficiência à vista. In *Química Nova*, São Paulo, 1988.
- SCHENBERG-FRASCINO, A C. Aplicação da engenharia genética na produção de energia. In *Genética de Microrganismos*. Piracicaba/São Paulo: FEALQ, 1985.
- VALLE, S. *Regulamentação da Biossegurança em Biotecnologia*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996.
- WILMUT, I., SCHNICKE, A E., MC WHIR, J., KIND, A J., CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, n.385 p.810-813, 1997.