4. Manipulação genética

Eloi S. Garcia

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

GARCIA, E.S. Manipulação genética. In: *Genes: fatos e fantasias* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006, pp. 79-106. ISBN: 978-65-5708-102-0. <https://doi.org/10.7476/9786557081020.0006>.

All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

4

Manipulação Genética

A manipulação genética consiste em experiência científica na qual células são fundidas, genomas são manipulados pela recolocação de genes existentes ou modificados, há adição de genes extras e produção de clones, células-tronco e animais transgênicos, ou para fins de terapia gênica, mostrando que a natureza biológica pode ser alterada para produzir organismos melhorados, órgãos para transplantes e curas para certas patologias.

A Fusão Genética

Para alguns, a ciência deveria estar ligada somente ao que às pessoas consideram como aspectos positivos para a humanidade. Tal relação ideológica geralmente se alinha ao que é bom para a humanidade com o que não é progresso. Muitas vezes, porém, esse raciocínio não corresponde à realidade, mesmo quando novas tecnologias são desenvolvidas e utilizadas sem a necessária compreensão e discussão com toda a sociedade. Um dos casos que deverá tornar-se um item de pauta na imprensa, em futuro próximo, é a fusão de células animais. A capacidade de duas células se fundirem em uma é essencial para a geração de um feto (fusão do espermatozoide com o óvulo) e para o desenvolvimento de tecidos como os ossos, músculos e placenta.

Apesar da enorme importância biológica do processo da fusão, pouco se conhece das proteínas e genes envolvidos neste processo. Foi identificado o gene *eff-1*, no verme *C. elegans*, que não é somente essencial, mas também suficiente para as células se fundirem. Pesquisadores expressaram este gene artificialmente em células que não se fundem naturalmente, e estas adquiriram a habilidade de se fundirem entre si. Aparentemente, o gene *eff-1* é essencial para a fusão de células, desde o primeiro orifício entre as membranas celulares até sua completa fusão.

Assim, alguns experimentos desenvolvidos revelaram as condições para a fusão de células vivas e biologicamente ativas, através da utilização de células com membranas modificadas por engenharia genética. A fusão celular significa que duas células entraram em contato e suas proteínas se fundiram na superfície de uma das células, que reconheceu um receptor na outra célula. O ato de reconhecimento leva à fusão das membranas lipídicas. Este processo, conhecido como biofusão, pode levar ao desenvolvimento de novas terapias, de vacinas e a reparos de tecidos lesados.

Recentemente, foram desenvolvidos embriões de porcos inoculados com células-tronco humanas, que produziram células híbridas com materiais genéticos de ambas as espécies. Os dados, totalmente inesperados, mostraram que células humanas e suínas fusionadas tinham marcadores semelhantes de superfície celular. E mais: surpreendentemente, a análise molecular do sangue e dos órgãos dos suínos adultos que, quando fetos, tinham recebido células humanas, demonstrou a presença de células com material genético de porcos, de humanos e também células híbridas.

No entanto, observou-se que nessa fusão foi carreado um retrovírus suíno (Perv), primo distante do HIV (o vírus que causa a Aids), apto a infectar células humanas normais. O mais interessante é que um dado prévio mostrava que o vírus suíno não infectava células humanas. Embora não exista uma explicação plausível para a questão de saber como esta fusão se processa, e se a infecção viral pode ser útil, por exemplo, para o estudo da Aids, esse resultado aponta, pela primeira vez, para uma maneira de fundir células entre espécies diferentes, e mostra uma infecção viral que passa diretamente de células animais para células humanas.

Os dados da fusão de células puderam explicar como um retrovírus pode infectar células de espécies diferentes, facilitando a compreensão das zoonoses. Esse tipo de fusão celular é do maior interesse para aqueles que estudam saúde pública, doenças infecciosas, imunologia e transplantes. Alguns vírus, como o da influenza (gripe), são bem conhecidos por passarem de uma espécie animal para outra. Algumas viroses podem se difundir entre diferentes espécies animais, o que de fato ocorre, embora raramente, e em circunstâncias especiais.

A ciência quer saber como e por que certas viroses podem passar para diferentes espécies animais, pois certas zoonoses são doenças devastadoras. Exemplos terríveis são os do vírus HIV, que causa a Aids humana e que pode ter surgido entre macacos selvagens, passando para a espécie humana em poucas

décadas; do coronavírus, responsável pela Sars, que passou para o homem através de gatos selvagens asiáticos; e do vírus da gripe dos frangos, que já matou diversos vietnamitas.

Essa pesquisa é importante para entender a biologia dos transplantes. Pelo mundo afora, inclusive no Brasil, milhares de pessoas necessitam de transplantes de órgãos como fígado, coração, pulmão, rins e pâncreas. Muitas dessas pessoas morrem por não ter, no momento necessário, órgãos disponíveis. O xenotransplante – uso de órgãos de animais no homem – é uma das tecnologias que pode ser explorada para salvar a vida do ser humano necessitado. Se a fusão genética vier a permitir o desenvolvimento de órgãos animais com baixa rejeição pelo sistema imune humano, por que não usá-los nos transplantes de órgãos? A nossa sociedade precisa começar a discutir o uso desta tecnologia.

A Ciência das Células-Tronco

As células-tronco são encontradas em embriões humanos, fetos, cordões umbilicais, placentas e alguns outros tecidos. Recentemente, pesquisadores induziram a diferenciação celular para produzir novamente células-tronco. Embora tal re-diferenciação ocorra em processos naturais, jamais tinha sido realizada em laboratório. Os cientistas esperam algum dia cultivar células-tronco em laboratório para utilizá-las no tratamento de doenças. A pesquisa sobre as células-tronco, no fundo, é uma ‘batata quente’, devido ao potencial terapêutico e ao dilema ético associado às técnicas necessárias para produção dessas células.

Para diminuir o problema ético, os pesquisadores têm usado células-tronco obtidas de cordões umbilicais e de placentas. No entanto, elas mostraram-se menos versáteis que as células-tronco embrionárias. Além disso, também foi demonstrado que células da medula óssea e células adiposas, obtidas por lipoaspiração, têm o potencial de serem reprogramadas, ou seja, de se comportarem como células-tronco.

Certas células envolvidas no desenvolvimento de ovos da ‘mosca da fruta’ puderam ser estimuladas a se transformarem em células-tronco. Estas células são precursoras dos ovos, podendo apontar para novas fontes de células-tronco em outros tecidos animais, inclusive os dos humanos. Por outro lado, pesquisadores coreanos criaram as primeiras células-tronco humanas obtidas a partir de embriões clonados, com uma mistura de métodos: a técnica padrão e uma outra não convencional. Basicamente, foram utilizados óvulos humanos

desnucleados, nos quais foi inserido DNA de outras células, conseguindo-se que os ovos se desenvolvessem até os primeiros estágios de divisão embrionária. Após esta fase, os embriões foram destruídos para remoção das células-tronco. Foi demonstrado que estas células eram geneticamente semelhantes às da pessoa que forneceu o DNA.

As células-tronco são classificadas em três grupos:

- Totipotentes – capazes de tornarem-se quaisquer tipos de células;
- Pluripotentes – geram quaisquer tipos de células com exceção daquelas necessárias ao desenvolvimento do feto, como a placenta;
- Multipotentes – transformam-se em um número limitado de células.

Enquanto o óvulo fertilizado é considerado totipotente, as células isoladas do interior de um embrião de um dia são pluripotentes e as células-tronco obtidas de adultos são multipotentes. Estas últimas são conhecidas como células-tronco adultas – o termo adulto se refere à maturidade das células e não à idade do indivíduo. Todos os seres humanos têm como origem um óvulo fertilizado – uma célula-tronco totipotente. Esta célula se divide em duas, que formam quatro, quatro fazem oito, 16, 32 – 60 trilhões de células. Neste desenvolvimento, as células, seguindo suas instruções genéticas, estimulam certos genes e inibem a ação de outros. Se alguma coisa na natureza pode ser considerada mágica são estas células, pois são versáteis e podem tornar-se células especializadas e serem transplantadas no doador que deseja substituir um tecido lesado ou doente, sem ameaças de rejeição.

O uso médico de células-tronco não é novo nem foi motivo de controversa na área médica. Como já vimos, após a célula-tronco se diferenciar em um tecido embrionário ela se torna célula ‘somática’ ao invés de se chamar célula totipotente. Como o embrião desenvolve em feto, as células-tronco continuam a se especializar em células multipotentes, que possuem funções específicas e limitado potencial de produzir tecidos. Por exemplo, células-tronco multipotentes da pele podem produzir quaisquer tipos de células de pele, mas não podem se transformar em células sanguíneas ou cerebrais. Elas têm sido usadas para tratar doenças sanguíneas e condições de auto-imunidade, bem como para produzir ossos e cartilagens, por mais de 20 anos. O primeiro tratamento de lúpus sistêmico com transplantes de células-tronco foi realizado há sete anos e apresentou 70% de sucesso. Células-tronco hematopoiéticas (hemato significa sangue; poiético significa criar) são somente multipotentes.

No entanto, vários cientistas acreditam que mesmo as células-tronco embrionárias não são panacéias para todas as doenças. Para eles, a idéia de que as células-tronco totipotentes possam curar doenças ou lesões teciduais ainda não tem fundamento científico. As células-tronco são encontradas no organismo humano desde o desenvolvimento do feto até o indivíduo falecer e têm a função de durante a vida refazer as células que, por vários motivos, são destruídas pelo organismo. Os pesquisadores acreditam que as células-tronco estão disponíveis para todos os tipos de tecidos e refazem quaisquer ferimentos, se necessário. Espera-se que no futuro estas células possam ser utilizadas em transplantes para tratamento de lesões nervosas e cardíacas ou de diabetes.

Mesmo com estes questionamentos, pesquisadores sul-coreanos utilizaram 242 óvulos humanos frescos, obtidos de 16 voluntárias que os doaram especificamente para este estudo. Este pode ser um dos pontos importantes para o sucesso da técnica, pois normalmente os óvulos são obtidos em clínicas de fertilidade, desconhecendo-se sua idade e apresentando, potencialmente, menor qualidade biológica. Também foi utilizada uma nova técnica para remover o DNA dos óvulos. Ao invés do DNA ser sugado por uma pipeta finíssima, foi feita uma pequena abertura na membrana dos óvulos que, delicadamente espremidos, permitiam a saída dos núcleos.

De fato, a sucção do núcleo utilizando pipeta pode causar microlesões no tecido próximo ao núcleo, deixando os cromossomos defeituosos, quando são chamados de aneuplóides. Aparentemente, a remoção do DNA, realizada pelos coreanos, retira menos material celular das vizinhanças do núcleo. Uma outra inovação foi que o núcleo reposto em cada óvulo era da mesma pessoa que doou o óvulo. Na clonagem de animais, foram usados DNA de indivíduos diferentes, para facilitar a comprovação de que o embrião clonado possuía o mesmo DNA do doador.

É possível que a utilização do óvulo e do DNA de uma mesma pessoa tenha sido uma vantagem para o sucesso dessa clonagem. Quando o núcleo é inserido no óvulo desnucleado, ele carrega material da célula de onde foi retirado. No caso dos coreanos, isto pode ter levado a uma menor incompatibilidade, pelo fato de o núcleo doado ser da mesma pessoa. Uma vez inserido o DNA, esperou-se duas horas para que ele fosse reprogramado, ativando genes embrionários versáteis, aptos a coordenar o desenvolvimento fetal. Os sinais que regulam o desenvolvimento das células-tronco e o controle da obtenção de um determinado tipo específico de célula são os segredos para utilização das células-tronco na regeneração ou reparação de tecidos lesados.

Recentemente foi demonstrado que células-tronco mesenquimais, que naturalmente se transformam em células gordurosas, cartilagens, ossos e músculos, quando forçadas a assumirem forma esférica, transformam-se, eficientemente, em células precursoras das células gordurosas, enquanto aquelas esticadas tornam-se células ósseas. Os cientistas também investigaram os compostos químicos nos quais as células se desenvolvem. Após cultura de cinco ou seis dias, o embrião atinge o estágio de blastócito. Neste ponto, a massa celular é de aproximadamente 100 células, compondo uma forma arredondada, com 75 células do lado externo e 25 células na parte interna. Com esta técnica foram cultivados 30 blastócitos para se obter 20 massas de células-tronco. Entretanto, foi obtida somente uma simples linhagem de células-tronco. Os resultados são promissores, mas o transplante baseado em células-tronco ainda é uma esperança distante e deve-se ter cuidado antes de afirmar que este é um avanço espetacular. A verdade é que ninguém ainda sabe se as células-tronco terão poderes curativos.

Apesar de ter sido divulgado que as células-tronco poderiam reparar danos causados por lesões parasitárias ou funcionais no tecido cardíaco, teses contrárias têm sido demonstradas, como as que se referem às células-tronco não se transformarem em miócitos cardíacos após a injeção em um miocárdio lesado. Outros pesquisadores estão otimistas e acreditam que as células-tronco poderão ser usadas no tratamento de infarto do miocárdio. Estudos prévios demonstraram o potencial das células-tronco de reativar a musculatura cardíaca e desenvolver vasos sanguíneos. O tratamento não causou nenhum efeito colateral sério. Os batimentos cardíacos eram anormais e os corações bombearam mais sangue, se comparados a órgãos que somente sofreram cirurgias.

Nos próximos cinco anos, os especialistas estimam que seja desenvolvida a tecnologia dos tecidos engenheirados, possivelmente cultivando órgãos humanos flácidos em formato tridimensional, sem contaminação de ossos, cartilagens e outros tecidos. Assim, órgãos complexos, como fígado e pâncreas, poderão ser desenvolvidos. Isto poderá levar a um tremendo impacto no que se refere ao transplante desses órgãos para tratamento de hepatite e diabetes. Em uma década será possível desenvolver ou regenerar órgãos, como o coração, diversos músculos, estômago etc., causando impacto na vida de milhões de pessoas. O ganhador do Prêmio Nobel Walter Gilbert acredita que nos próximos 20 anos cada um dos órgãos humanos será desenvolvido em laboratório. Assim que um órgão se tornar doente, envelhecido ou lesado, haverá a opção produzir um novo órgão com o uso de células-tronco.

Pesquisadores demonstraram recentemente, procurando superar questões éticas e legais levantadas pelo uso de células-tronco de tecido fetal, que células-tronco da medula de indivíduos adultos, chamadas estromas, cultivadas na presença de fatores de crescimento, transformaram-se em células-tronco que foram convertidas em células cerebrais e responderam a critérios utilizados para transplantes em cérebros lesados. Estudos estão sendo desenvolvidos através de experimentos, em animais com desordens neuro-degenerativas, para explorar o potencial regenerativo dessas células convertidas.

Células-tronco obtidas de tecidos adultos oferecem um grande potencial terapêutico. Mas, permanece o desafio de tratar uma doença com estas células, por causa de sua incapacidade de se desenvolverem num laboratório. É prioritário definir o mecanismo molecular do crescimento e o processo de replicação ou ciclo destas células. Há pouco tempo foi descrito que células-tronco sangüíneas de camundongos, com deficiência do gene p18, tinham a capacidade de se multiplicarem e desenvolverem com facilidade. Este gene é da classe dos chamados 'inibidores da quinase dependente de ciclinas', que são inibidores críticos na regulação do ciclo celular. Assim, o isolamento de células-tronco deficientes de p18, ou a retirada deste gene, é uma estratégia nova para proliferá-las e torná-las mais eficazes no combate às doenças.

Mesmo com estes possíveis avanços, a questão da clonagem terapêutica levanta questões políticas e éticas. Um ponto se refere à pressão para as mulheres não doarem óvulos para a clonagem. Um outro questionamento diz que o uso de células-tronco embrionárias reduz a vida humana a pouco mais que um produto farmacêutico. Ainda temos a questão sobre quando a vida começa. Responder a isto, pelo menos até agora, está além da ciência. No momento da fecundação, o ovo tem o potencial de gerar um bebê. Se isto significa vida humana não está claro cientificamente. Entretanto, já existe um consenso mundial no meio científico de que a clonagem humana para reprodução seria altamente perigosa e equivocada. Toda clonagem reprodutiva deveria ser evitada.

Temos de iniciar o engajamento de pessoas da comunidade científica e não científica para nos ajudar nas questões éticas e sociais relacionadas a este assunto. Parece-me claro que criar o novo ser humano por clonagem não tem uma justificativa plausível numa sociedade civilizada. No entanto, a geração de células-tronco por meio da técnica da transferência nuclear envolvendo as mesmas pessoas interessadas pode tornar-se um avanço extraordinário nos transplantes e terapias, vindo a socorrer indivíduos afetados por terríveis lesões e doenças.

Transgênese em Insetos

Em toda a ciência biológica, nos últimos anos, houve um avanço extraordinário na utilização de ferramentas moleculares. Nos campos da medicina e agricultura foi dada uma ênfase particular, no início da década de 1970, à tecnologia de transferência de genes. O desenvolvimento desta técnica sugeria novas possibilidades para o uso da engenharia genética em várias áreas de biologia pura e aplicada. No campo da aplicação, foram considerados alvos as doenças que prejudicavam a produção agrícola e a saúde pública. Nestas duas áreas do conhecimento, apesar dos esforços dos entomologistas, químicos e ecologistas em desenvolver novos métodos para efetivo controle, os insetos representavam o maior problema para a sociedade moderna, como pragas agrícolas ou vetores de doenças para o homem e os animais.

A mosca *Drosophila melanogaster* foi transformada geneticamente, na década de 1980, estimulando novas idéias relacionadas ao uso da transgênese para controle de insetos. Entretanto, a aplicação desta tecnologia em outros insetos somente foi possível quando quatro transposons (pedaços de DNA que carregam os genes a serem inseridos) foram construídos: mariner, Minos, Hermes e piggy-Bac. Estes elementos transposonais têm sido usados para transformar 15 espécies de insetos, incluindo dípteros, himenópteros, lepidópteros e coleópteros. Como ferramentas de laboratório, os elementos transposomais provaram ser a tecnologia-chave para mediar a transformação nestes animais. Estes vetores podem ser úteis para modificação genética em uma enorme variedade de espécies de insetos.

Utilizando-se deste conhecimento, a biotecnologia está desenvolvendo insetos geneticamente modificados para uma variedade de propósitos, incluindo os relacionados à agricultura e saúde pública. A liberação dos insetos transgênicos em larga escala na natureza ainda deve demorar alguns anos. Se realmente tiverem uma repercussão positiva, os insetos modificados podem ser importantes para a economia e a saúde pública. Por exemplo, os *Anopheles* transgênicos seriam incapazes de transmitir malária, doença que ataca de 300 a 500 milhões de pessoas por ano, e que causa de um a três milhões de óbitos. Os *Aedes aegypti* não transmitiriam o vírus da dengue que infecta, anualmente, milhares de pessoas além de causar um grande impacto na economia. Em insetos confinados em laboratórios, a utilização de mosquitos geneticamente alterados, refratários ao *plasmodium*, parasita da malária, é um modelo espetacular e elegante do uso da transgênese em insetos.

Já foram identificados três genes do mosquito que podem afetar o ciclo de vida do plasmódio no *Anopheles gambiae*. Dois desses genes, CTL4 e CTLMA2, codificam proteínas que protegem o desenvolvimento dos parasitos. Quando estes genes são silenciados, o sistema imune do mosquito destrói mais de 97% dos parasitos. Um terceiro gene, LRIM1, tem o efeito oposto: mosquitos que têm este gene retirado produzem mais parasitas do que os insetos normais. Estas descobertas trouxeram novas possibilidades para controlar a malária. Por exemplo, mosquitos transgênicos com genes extras que destroem os parasitas, ou deleção dos genes que protegem o plasmódio, podem ser extremamente úteis na diminuição da propagação da doença.

Também está sendo estudado um aspecto molecular relacionado a um mecanismo hormonal da excreção do *Aedes aegypti*, o vetor da dengue e da febre amarela. Como o mosquito produz a resposta diurética após o repasto sanguíneo? Os mosquitos se alimentam e, rapidamente, iniciam a excreção ou produção de urina. Estão sendo clonados genes e estudados receptores celulares de mosquitos. Os receptores são proteínas de membranas celulares envolvidas na transferência de informação de uma região da célula para outra. Este processo de comunicação celular é regulado por hormônios. A interferência neste processo refletirá na diminuição da diurese, levando o inseto à morte.

Outros exemplos de transgênese: as abelhas geneticamente modificadas tornaram-se resistentes a doenças e parasitas que devastaram inúmeras populações desses insetos. O bicho da seda 'engenheirado' produziu proteínas, como a seda mais resistente para produzir vestimentas especiais, pára-quadras e ligamentos artificiais. Entretanto, ainda não se sabe que efeitos estes insetos terão sobre o ecossistema, a saúde pública e a segurança dos alimentos, se liberados na natureza. O sucesso dos insetos transgênicos está na habilidade de destruir os insetos selvagens e de estabelecer uma população sem prejuízo ao meio ambiente.

Os receios dos pesquisadores na liberação dos insetos transgênicos é que esta liberação aumente a possibilidade de um gene modificado se espalhar através da população de insetos e piore os problemas pré-existentes ou crie novos desafios biológicos. Também é possível que o inseto modificado liberado no campo cause uma consequência não imaginada, por exemplo, tornando a população de insetos mais eficiente na propagação de uma epidemia ou, até mesmo, tornando-se vetor de uma doença que antes não era transmitida pelo inseto. Há a possibilidade que a modificação genética da abelha, por exemplo, possa alterar a composição do mel produzido, criando problemas quanto à segurança do alimento.

A engenharia genética aplicada aos insetos, infelizmente, ainda não possui normas regulatórias bem definidas, que focalizem a segurança ambiental e outras exigências associadas aos insetos geneticamente modificados. São necessárias uma articulação e uma condução transparente de como os insetos transgênicos serão controlados, quais os ministérios envolvidos, quais os riscos, benefícios e incertezas científicas relacionadas a este tipo de tecnologia molecular. Não nos parece que um simples ministério possua a autoridade para cobrir todos os aspectos levantados para liberação de diferentes tipos de insetos modificados. Pelo menos os ministérios da Saúde, da Agricultura e do Meio Ambiente deverão estar envolvidos nesta regulamentação.

A Terapia Gênica

A terapia gênica envolve a inserção de genes selecionados em um paciente, com a esperança de melhorar ou curar uma doença. Inicialmente, foi vista como uma solução para o tratamento de doenças genéticas. Atualmente, esta terapia está sendo avaliada para outros tipos de doenças, incluindo câncer, doença vascular, artrite e desordens neuro-degenerativas. Muito embora as estratégias para o uso da terapia gênica sejam muito variadas, certos elementos são indispensáveis para o sucesso desta tecnologia. Como ponto inicial é básico que um gene importante tenha de ser identificado e depois clonado.

Na terapia genética o gene 'ruim' pode ser corrigido pela inserção, através um vetor, geralmente um vírus, do gene 'bom'. Após a identificação e clonagem do gene, o próximo passo é a sua expressão. Problemas quanto à eficiência da transferência gênica e sua expressão permanecem como tópicos importantes no desenvolvimento da terapia gênica. Uma das dificuldades desta tecnologia se relaciona com a transferência do gene desejado para as células-alvo, além da obtenção de um nível de expressão suficiente para o tratamento da doença. Normalmente, um vírus é utilizado para carrear o gene e infectar o organismo. O vírus multiplica-se rapidamente injetando o gene 'bom' nas células do paciente.

São necessárias mais investigações sobre a transferência de gene e a especificidade do tecido na sua expressão. Um outro ponto importante na estratégia da terapia gênica é a compreensão da genética da doença considerada, inclusive dos efeitos colaterais potenciais da terapia gênica, e o conhecimento sobre as células-alvo que receberão a terapia gênica. Os avanços recentes da biologia molecular facilitaram a identificação, isolamento, determinação da seqüência,

clonagem e expressão de inúmeros genes e seus produtos. As ferramentas usadas para isto, como '*northern, western e southern blots*', e a reação da cadeia da polimerase (PCR) levaram a uma avaliação mais precisa das atividades de genes individuais na reposta celular. A facilidade de introduzir genes em várias células *in vitro* e a fidelidade da replicação do material genético nestas células tornaram a terapia gênica uma tecnologia importante para várias atividades médicas.

Nos próximos dez anos, os especialistas acreditam que cinco a dez doenças genéticas poderão ser tratadas por esta terapia. Nos próximos 20 anos, calcula-se que 50 a 100 doenças genéticas poderão utilizar a terapia genética. No entanto, o tratamento ficará restrito a doenças dependentes de um simples gene, devido à enorme dificuldade de estudar doenças causadas por uma combinação de genes, e à interação com o ambiente. Nos próximos 30 anos, é provável que centenas de doenças sejam tratadas por esta terapia. Doenças multigênicas vão demorar décadas para serem tratadas pela terapia gênica. Estas doenças incluem problemas mentais que afligem 1% da humanidade (em geral esquizofrenia), doenças auto-imunes (artrites, lúpus) e doenças cardíacas.

A imunodeficiência severa combinada e a terapia gênica

Cientistas ingleses publicaram na revista *The Lancet*, de dezembro de 2004, novas informações sobre a tecnologia de terapia gênica que normaliza o sistema imunológico de crianças com imunodeficiência severa combinada (SCID). Esta doença interfere no sistema imune, em particular no sistema de leucócitos ativos, levando à patologia descrita há alguns anos, como a de David Vetter, paciente que viveu por 12 anos na 'bolha' para se prevenir de infecções. Neste estudo, quatro crianças com SCID tiveram as células-tronco removidas da medula, e os genes foram identificados e colocados em um vírus da leucemia. Este vírus foi então introduzido de volta nos pacientes nos quais os genes foram replicados. Após este tratamento gênico o sistema imune dos pacientes funcionou normalmente.

A Clonagem para Terapia

Um dos assuntos científicos mais apaixonantes, neste início de século, refere-se ao debate mundial sobre a realização ou não da clonagem humana. Vários países acabaram de optar pela proibição do uso desta tecnologia, inclusive da

clonagem terapêutica, terapia que os cientistas acreditam ser a chave para tratamento de várias doenças degenerativas, como mal de Parkinson, Alzheimer, diabetes e lesões no tecido nervoso. Baseados no *lobby* dos contras e do movimento contra o aborto, o principal argumento utilizado pelos proibicionistas foi que a clonagem humana é baseada na destruição de embriões de quatro dias de idade, processo classificado por eles como um assassinato. Argumento oposto a este, com base nas centenas de embriões descartados pelas clínicas de fertilização *in vitro*, diz que seu uso poderia levar ao tratamento de pessoas necessitadas.

Diariamente vemos na imprensa notícias e argumentos utilizados para tornar ilegal a clonagem humana para obtenção de células-tronco. Geralmente são reflexões que mexem mais com o imaginário e o emocional das pessoas do que com sua lógica e raciocínio, não levando em consideração que a clonagem tem enormes perspectivas benéficas para a sociedade. Ouvimos que a clonagem pode ameaçar a dignidade do clone, ou que os cientistas estão brincando de Deus e tentando criar um futuro desumanizado gerando castas como em uma colméia em que o genoma de inúmeros indivíduos será único e padronizado.

Estes argumentos nos deixam a impressão de que a clonagem terapêutica humana será condenada por todos ou considerada um crime contra a humanidade. Os cientistas estão profundamente divididos sobre esse assunto, mas mesmo os mais conservadores não são claros sobre o descarte dos embriões ou sua utilização em pesquisas. A questão básica é: quando um ser humano se torna um ser humano? Os especialistas em ética argumentam, e com razão, que o problema não está em quando a vida começa, mas na utilização dos embriões que são descartados pelas clínicas de reprodução assistida. Também garantem que, na era da globalização, leis nacionais obviamente não são suficientes para controlar este tipo de atitude.

A tecnologia da clonagem realmente pode responder a algumas questões básicas da biologia. Enquanto a maioria dos cientistas se opõe à clonagem humana, que leva ao nascimento de uma criança, conhecida como clonagem reprodutiva, vários pesquisadores apóiam a clonagem terapêutica. Nesta mesma linha, cerca de 40 cientistas, laureados com o Prêmio Nobel, se manifestaram.

Sabemos que inúmeros avanços científicos relevantes, hoje vistos com a maior naturalidade, foram condenados levando em conta os valores morais e religiosos enraizados em nossa sociedade. Como bom exemplo, temos o caso de Galileu, que há 400 anos, em Florença, descobriu que a Terra não era o centro do universo. Ou de Charles Darwin, cuja teoria da evolução mexeu com os que acreditavam que Deus tinha criado direta e pessoalmente todas as criaturas.

Ainda podemos citar as repercussões negativas que tiveram a anestesia, as vacinas, os transplantes de órgãos, a fertilização *in vitro* e mais recentemente dos animais e plantas transgênicos, entre outros – técnicas utilizadas normalmente no mundo de hoje. O que podemos concluir desses fatos é que o ser humano possui reações imediatas que são emocionais e morais e não que dizem respeito ao bom senso e à lógica, ou a uma visão promissora e esperançosa quanto ao futuro. Quantas pessoas morreriam ou sofreriam hoje sem vacinas e anestésias?

Em 1869, o Papa Pio IX declarou que a vida começa na concepção. Entretanto, em 1978, a embriologia humana mudou para sempre. Louise Brown, o primeiro bebê nascido de fertilização *in vitro* (*test tube baby*), provou que era possível manter um embrião humano no laboratório – pelo menos por 14 dias; depois, o embrião deve ser implantado no útero de uma mulher, ou congelado. A fertilização *in vitro* criou problemas para os eticistas. O que é realmente aglomerado de células em uma placa de laboratório? O debate permanece não resolvido. Se quisermos testar, por exemplo, um risco genético, toma-se um embrião no estágio de desenvolvimento de cinco células e removem-se duas células para o teste. As células remanescentes ainda podem ser chamadas de embrião? Cada uma das duas células retiradas, em teoria, é capaz de desenvolver um embrião. Elas são embriões também?

A clonagem é também conhecida como transferência nuclear ou transferência nuclear de células somáticas, um processo que pode produzir uma cópia genética de uma outra pessoa, sem o convencional encontro entre o óvulo e o espermatozoide. Na clonagem, o núcleo de um óvulo é removido e substituído pelo núcleo de uma célula somática adulta. Este núcleo contém toda a informação genética de uma pessoa particular. Após o núcleo ter sido colocado no óvulo, a célula é submetida a uma carga elétrica, e o novo núcleo passa a coordenar o desenvolvimento de um novo ser humano, cuja composição genética de DNA nuclear é uma cópia idêntica da célula somática original. O embrião também pode ser formado por partenogênese – um modo de o ovo não fertilizado formar um indivíduo. Alguns peixes, pássaros e cobras se reproduzem naturalmente através da partenogênese. No entanto, ainda não se sabe o potencial deste método na produção de células-tronco humanas.

A clonagem tem sido realizada também numa grande variedade de animais: Dolly, a ovelha, foi um dos mais famosos clones. Recentemente, em um estudo detalhado, foi comparada a clonagem por transferência nuclear de células somáticas com a inseminação por injeção intracitoplasmática de espermatozoide e a partenogênese em óvulos de camundongo. Os embriões desenvolvidos por

partenogênese e por injeção intraplasmática de espermatozoides apresentaram similares desenvolvimentos até o estágio de blastócito, e não revelaram quaisquer sinais de anormalidades, enquanto os clones atingiram somente 30% deste desenvolvimento, alguns com sinais de anormalidades.

O maior interesse da clonagem não é a formação de um novo indivíduo. A clonagem reprodutiva humana é considerada uma técnica de riscos e enfrenta enormes dilemas éticos. No entanto, se os embriões pudessem se desenvolver para formar estruturas multicelulares conhecidas como blastócitos, eles poderiam ser fontes de células-tronco embrionárias, aquelas que são capazes de se dividir repetidamente, e, quando estimuladas com sinais biológicos corretos, podem se transformar em diferentes tipos de células. Alguns afirmam que já conseguiram clonar embriões humanos até 16 células, entidade chamada de mórula – predecessor de um blastócito. Outros dizem que já geraram células-tronco, através da partenogênese, e estão trabalhando para construir um banco de células-tronco com características particulares do sistema imune, a fim de diminuir o risco de rejeição, quando for o caso.

Os primatas (incluindo o ser humano) são mais difíceis de serem clonados do que outros animais, devido à maquinaria molecular necessária para a divisão celular ser, de algum modo, alterada durante o processo da clonagem. Um modo de evitar esta agressão é a partenogênese, que já foi feita em macacos. Estas células se desenvolveram e se dividiram em diferentes tipos, incluindo células nervosas que produzem dopamina, uma substância que se torna deficiente no mal de Parkinson. O próximo passo será inoculá-las em macacos para verificar se tais células se comportam de maneira similar a células cultivadas. Outro problema é tentar cultivar células-tronco humanas em tubos de ensaio. Infelizmente, nesta condição, essas células não crescem bem e em quantidades e purezas suficientes para trabalhos de pesquisa, ou para aplicações terapêuticas.

Foi divulgado pela imprensa mundial que cientistas sul-coreanos deram um enorme salto em direção à clonagem de um embrião humano para obtenção de células-tronco – células que podem substituir tecidos de indivíduos que estão doentes ou com algum tecido lesado. Os cientistas desenvolveram a técnica com base na ‘compressão’ delicada de ovócitos para retirada do núcleo, ao invés da técnica tradicional com agulha e vácuo, e utilizaram 242 óvulos humanos para realizar a clonagem. A idéia era produzir embriões clonados de células saudáveis de pacientes e retirar do embrião as células-tronco que poderiam ser usadas para reparar o órgão ou o tecido lesado. Estas células, provenientes de pacientes geneticamente idênticos, não seriam, em teoria, rejeitadas pelo sistema

imune dos receptores. Dos 242 óvulos doados, 176 tiveram o núcleo retirado, e destes somente 30 embriões foram gerados, cada qual contendo de 100 a 150 células-tronco. Entretanto, apesar disso, foi produzida somente uma linhagem de células que puderam ser cultivadas no laboratório. Em dezembro de 2005, os trabalhos do sul-coreano Woo-Suk Hwang sobre clonagem humana foram considerados fraudes, e a revista *Science* cancelou as publicações dos artigos. Todavia, com esta técnica será possível, no futuro, que um coração com parte do tecido necrosado tenha este tecido substituído por um novo músculo cardíaco; ou que células-beta das ilhotas pancreáticas não funcionais sejam substituídas por células normais, produtoras de insulina; ou ainda que células nervosas ativas sejam usadas para tratamento do mal de Parkinson. Mas ainda há um longo caminho pela frente até chegar ao processo terapêutico. No entanto, mesmo com essa longa estrada a ser percorrida, a promessa é real, embora, até agora, os cientistas tenham produzido somente células-tronco, que ainda devem ser transformadas em células específicas de tecido cardíaco, pancreático ou nervoso.

Antes de considerar a possibilidade de inocular células-tronco em pacientes, uma série de questões necessitam ser respondidas: as células-tronco serão realmente incorporadas somente no tecido lesado? As células-tronco poderão se transformar em tipos de células não necessárias ao tecido lesado? As células-tronco se multiplicarão, incontrolavelmente, e poderão produzir câncer? Apesar desses questionamentos, a descoberta dos cientistas coreanos é um avanço para a biologia. A clonagem terapêutica deixou de ser um sonho.

As primeiras células-tronco embrionárias foram isoladas em 1994, por Ariff Bongso, professor de obstetrícia e ginecologia da Universidade Nacional de Singapura. Desde esta época sabe-se que, para torná-las úteis à terapia, teriam de ser transformadas em células específicas de tecidos a fim de serem inoculadas nos pacientes. Para evitar complicações colaterais, como formação de teratomas, a população de células transformadas deve estar sem contaminação de outras células.

Ian Wilmut, o cientista que clonou a ovelha Dolly, quer investigar uma doença neuromotora que afeta os neurônios motores do cérebro e espinha dorsal. Estes neurônios são células nervosas que recebem as instruções cerebrais e as transmitem em forma de impulsos elétricos para os músculos. A degeneração desses neurônios torna os músculos flácidos e enfraquecidos. Wilmut quer encontrar os erros existentes nas células nervosas de pessoas que sofrem desta doença. Ele pretende retirar DNA do sangue, ou de um outro tecido, de uma pessoa que tenha a doença neuromotora, e implantar num óvulo humano que

tenha tido o núcleo removido. O ovo é estimulado a produzir células-tronco e não bebês. Enquanto o embrião ainda estiver nos primeiros estágios de desenvolvimento, algumas células serão retiradas para estudos. Estas células poderão ser usadas para criar vários tipos de células nervosas, que são afetadas na doença neuromotora. O embrião depois será destruído. O sucesso de seu trabalho pode ter profunda implicação em várias doenças nervosas e genéticas. A identificação dos genes envolvidos nesta doença seria mais fácil. É bem verdade que o conhecimento da sequência dos genes é o primeiro passo para resolver a terapia contra determinadas doenças. No entanto, ainda faltaria saber como as influências ambientais determinariam se o indivíduo portador destes genes teria ou não a doença.

O próprio Wilmut vai tentar criar um animal clonado perfeito nos próximos cinco – dez anos. Wilmut admitiu que se a clonagem de mamíferos é agora uma realidade, o processo de clonagem ainda é um problema não bem resolvido. Ele acredita que pode desligar o ‘relógio biológico’ na célula clonada, evitando os problemas do envelhecimento prematuro que afligiu a Dolly. Este ‘relógio’ parece estar embebido nos núcleos das células, o qual pode ligar ou desligar vários processos e sinalizar inclusive a morte celular. Isto significa na clonagem que, quando um núcleo é transferido para um ovócito, elementos da célula agem como se fossem da mesma idade do organismo doador. Isto não é problema se o núcleo for obtido de uma célula jovem, mas se ele for adquirido de uma célula adulta pode causar inúmeros problemas. No caso da Dolly, cujo material genético foi obtido da glândula mamária de animal adulto, o efeito ‘relógio’ estava relacionado com a artrite e o câncer de pulmão que a levou à morte com somente seis anos, sendo que a vida média de uma ovelha é por volta de 10 a 16 anos. O que Wilmut deseja é compreender como os vários processos biológicos são controlados no núcleo e como ‘convencê-los’ de que são novamente de um organismo jovem.

Todavia, não se pode repetir aqui os erros que ocorreram com a difusão da biotecnologia vegetal. A maneira como esta tecnologia foi divulgada ao grande público foi arrogante. O receio da sociedade deve ser levado em conta. As questões levantadas sobre a moralidade de usar embriões existentes, ou que serão criados, com o propósito de pesquisa e utilização para tratamento médico, devem ser consideradas profundamente. Homens e mulheres têm seus limites sociais.

No caso da clonagem humana terapêutica, nós temos três alternativas de engajamento. Na primeira, podemos lutar contra o desenvolvimento científico e somar nossas forças às conservadoras que procuram deturpar toda nova

tecnologia que poderá mudar o futuro do planeta. Na segunda, podemos ainda ficar sentados e passivamente ver o panorama do futuro que está vindo. Alternativamente, podemos participar da criação de um futuro melhor no qual o ser humano usará os avanços científicos e tecnológicos para evitar, prevenir ou tratar de doenças e do processo de envelhecimento, para aumentar sua expectativa e melhorar a qualidade de vida e, conseqüentemente, aumentar o bem-estar no planeta.

De qualquer maneira, a sociedade brasileira deve iniciar o debate e agir com discernimento em questões como ‘quando a vida humana começa?’ e tentar legalizar a clonagem terapêutica e as pesquisas com células-tronco. Finalmente, é preciso colocar na balança o fato de a ciência tentar socorrer as pessoas que necessitam de tratamento para doenças que hoje não têm cura contra a possível eliminação neste processo de terapia de células de um embrião de quatro dias.

A clonagem de primatas não-humanos

Gerald Schatten e colegas da Universidade de Pittsburgh, Pensilvânia, Estado Unidos, divulgaram na revista *Developmental Biology*, em 11 de dezembro de 2004, o resultado da pesquisa sobre a clonagem de um ovo de um primata não-humano até o estágio de blastócitos. Nesta fase, o fluido interno do ovo contém camadas de células-tronco embrionárias. Utilizando a técnica de ‘comprimir’ delicadamente do ovócito para remoção do núcleo – método descrito pelos sul-coreanos para criar a primeira linhagem de células-tronco de um clone humano –, os cientistas deram um enorme avanço em direção ao sucesso da clonagem terapêutica em embriões de primatas não-humanos. Este conhecimento facilitará a compreensão das células-tronco humanas embrionárias e responderá inúmeras questões sobre como as células-tronco embrionárias funcionam e se elas podem ou não ser usadas efetivamente e com segurança no tratamento de doenças e lesões.

Apesar de este estudo representar um significativo progresso, várias barreiras para clonagem de primatas não-humanos ainda permanecem. Schatten e seus colegas descreveram na revista *Science*, de abril de 2003, que, apesar de a técnica de transferência nuclear ter sido sucesso na clonagem da Dolly, camundongos e outros animais, em macacos não funcionava. Neste estudo, os pesquisadores encontraram obstáculos moleculares básicos que bloqueavam o desenvolvimento celular, como a ausência ou deficiência de proteínas importantes, estruturas mitóticas caóticas e cromossomos desalinhados.

Para melhorar o processo de clonagem, no artigo recente, o grupo americano retirou o núcleo de um ovócito, 'comprimindo' delicadamente a célula, ao invés de remoção do material genético utilizando-se uma agulha e vácuo. Os pesquisadores também utilizaram, na transferência nuclear, ovócitos que não estavam completamente maduros, ainda no primeiro estágio da meiose, quando o número de cromossomos começa a reduzir pela metade, para formar o ovócito pronto para a fertilização pelo espermatozóide. Na técnica tradicional, os ovócitos tinham os núcleos retirados no segundo estágio (metáfase) antes de ocorrer a mitose.

Apesar do sucesso, a clonagem reprodutiva nestes animais permanece distante. O grupo americano mostrou no artigo, claramente, a dificuldade de obter primatas clonados (e talvez humanos): 135 embriões clonados de macacos foram implantados em 25 fêmeas *Rhesus* e nenhuma gravidez obteve sucesso.

Xenotransplantes

A lista de espera para transplantes de órgãos continua a aumentar mais rapidamente do que o número de órgãos humanos disponíveis. Centenas de pacientes falecem à espera de órgãos. Os avanços científicos e tecnológicos têm fornecido esperanças para estes indivíduos, devido à possibilidade de órgãos de outras espécies animais serem transplantados nos seres humanos. Esta terapia dos sonhos, porém, ainda vai demorar a chegar, mas estão sendo dados os primeiros passos nesta direção. Este revolucionário processo de transplantes de órgãos entre diferentes espécies é conhecido como xenotransplante, e se refere a um futuro grande negócio para transplantes de órgãos vivos de uma espécie para outra.

A maior vantagem do uso de órgãos de animais para transplantes em humanos é o fato que se trata de uma maneira de ofertar órgãos de um animal saudável, ao invés de órgãos de uma pessoa já falecida, que podem ter alguma lesão tecidual resultante da morte. Mesmo órgãos obtidos de uma pessoa com morte cerebral, considerados candidatos ideais para transplantes, contêm normalmente pequenas anomalias. Sabe-se que o processo da morte cerebral causa lesões em outros órgãos, particularmente no coração. Como resultado, alguns órgãos transplantados não estão numa condição ideal.

Utilizando-se a tecnologia dos transgênicos, a idéia é produzir quimeras, parte homem, parte animal, como fábricas vivas de produção de células e órgãos para transplantes. Alguns tecidos suínos têm sido usados pelo ser humano,

como pâncreas para produção de insulina e válvulas cardíacas para substituição das defeituosas humanas. Além disso, por exemplo, pode-se combinar DNA do homem com o de suínos. Como resultado desta junção de dois segmentos de DNA, o porco transgênico levará em seu genoma uma pequena amostra de genes humanos, em número insuficiente para criar uma nova espécie animal. Quanto mais geneticamente similar um animal for do homem, menos o sistema imune rejeita o órgão animal. Quando a diferença nos genes for muito grande o órgão animal é rejeitado em nano-segundos pelo ser humano transplantado. Entretanto, o porco transgênico deverá possuir genes suficientes para que seus órgãos não sejam rejeitados quando transplantados para um ser humano. Não resta dúvida de que esta tecnologia será questionada, ética e moralmente, por várias facções sociais, que vêem este processo como não natural.

Além disso, há sempre o risco de o transplante de órgão animal ser uma fonte de transmissão de viroses animais para a população humana. O porco, por exemplo, coexiste muito bem com um vírus conhecido com retrovírus endógeno suíno (Perv em inglês) que não pode ser eliminado do animal. Tem sido demonstrado que o Perv não causa doença em ratos de laboratório, embora não se saiba se este retrovírus pode contaminar o homem. Considerando os efeitos de viroses animais que infectam o homem, como o ébola, e possivelmente o vírus da Aids, não pode ser descartado o risco desta contaminação.

No entanto, este animal quimera já está sendo criado e um dia produzirá células geneticamente idênticas, suficientes para reparar tecidos danificados ou mesmo órgãos para transplantes. Estas células terão um baixo índice de rejeição pelo paciente e serão conhecidas como tecidos 'humanizados'. Os xenotransplantes poderão salvar centenas de vidas humanas e ser considerados como um método de tratamento. Esta tecnologia deverá ser implementada e melhorada, pois, se bem sucedida, será um avanço fundamental para a medicina. Uma vantagem importante seria que não estariam sendo criados embriões humanos, como na clonagem terapêutica, que é um método mais questionável.

Alguns indagarão por que utilizar suínos como fonte de órgãos? Por várias razões. Uma delas é que estes animais existem em grande quantidade, são relativamente baratos e de fácil manuseio zootécnico. Na prática do xenotransplante sempre haverá o risco de introduzir novos agentes patogênicos, como retrovírus que poderiam sofrer uma mutação e infectar células humanas. Entretanto, os pesquisadores acreditam que poderão selecionar suínos livres de microorganismos. Uma outra vantagem é que o tamanho dos órgãos dos porcos

é semelhante ao dos seres humanos. Além disso, as anatomias dos corações de ambas as espécies são similares, bem como as dos rins, pulmões e fígados.

Já foram realizados experimentos de transplantes de três corações de suínos transgênicos em três macacos. Um dos animais transplantados foi capaz de sobreviver por trinta horas. Tal experimento, realizado antes do desenvolvimento da tecnologia dos transgênicos, levava os macacos a viverem somente de 30 a 90 minutos. A rejeição atrasa o uso deste processo nas práticas clínicas, mas o coração de um suíno transgênico bate muito mais tempo no peito de um macaco do que um coração de porco normal. Em termos genéticos, como os macacos são muito próximos aos seres humanos, acredita-se que estes dados representem como o homem reagiria a um xenotransplante.

Imagina-se que nos próximos cinco anos ocorrerão os primeiros transplantes de órgãos de animais em homens e mulheres. O maior problema do uso de órgãos de suínos nos humanos é a rejeição. Os porcos têm um açúcar – a galactose – na superfície de seus vasos sanguíneos, que é um excelente alvo para anticorpos humanos. Os anticorpos atacam o órgão transplantado, levando a uma rápida destruição. Uma solução para a rejeição é transformar geneticamente o animal doador, de tal modo que seus órgãos não mais expressem a galactose.

A produção de suínos transgênicos é um processo relativamente simples. As porcas são expostas a um aumento de hormônios que as conduz a um processo de superovulação. As fêmeas são acasaladas e os óvulos fertilizados. Os ovos resultantes, conhecidos como zigotos, são coletados nos ovidutos – tubos que ligam os ovários ao útero. O ovo embrionário é então inoculado com uma solução contendo segmentos do DNA humano. Desde que somente um pequeno segmento de DNA é inoculado no ovo, nem todos serão incorporados ao DNA do animal, ou seja, em média somente 1% deles expressará a nova informação genética. Entretanto, quando os porcos transgênicos cruzam entre eles, 50% dos embriões resultantes expressam 1% do segmento do DNA humano. Os suínos crescerão até a fase adulta, idade em que seus órgãos serão removidos cirurgicamente. Depois os animais serão sacrificados.

Nos experimentos iniciais foram extraídas e injetadas em fetos de ovelhas células-tronco mesenquimais humanas. Elas se tornaram partes dos corações, peles, músculos, gorduras e outros tecidos das ovelhas. Mas o número de células humanas ainda era muito pequeno. Recentemente, foram obtidas, através do aprimoramento dessa tecnologia, quimeras ovelha-homem com uma proporção de 15% de células humanas no fígado do animal. As células humanas deviam

ser inoculadas por volta da metade do período de gestação, antes de o sistema imune do feto ter aprendido a diferença entre suas próprias células e as humanas. Para assegurar que o animal ainda é uma ovelha normal, foram criados animais híbridos por fusão dos embriões das ovelhas 'humanizadas' com carneiros.

Com a familiarização lenta e gradual desta tecnologia pela sociedade, o conceito de xenotransplante se tornará mais aceitável, principalmente considerando que estes órgãos poderão salvar a vida de um grande número de pacientes que enfrentam a lista de espera, devido à falta de doadores de órgãos humanos. Com o avanço do conhecimento científico sobre genética da hibridização e quimeras, em um futuro não muito distante, o xenotransplante se tornará uma opção real para aqueles que necessitam de um órgão por sofrerem de uma enorme variedade de doenças lesivas a seus organismos.

Das Fêmeas e não dos Machos

A natureza decidiu que para os mamíferos a reprodução sexual é a mais interessante, pois nela participam os genomas do macho e da fêmea. Por outro lado, as abelhas, formigas e alguns peixes, aves e répteis, podem reproduzir-se assexuadamente, utilizando o DNA maternal, através de um processo biológico conhecido como partenogênese. Este mecanismo jamais foi observado naturalmente nos mamíferos. Estes animais possuem uma reprodução característica, que necessita dos componentes Y e X para produzir um novo indivíduo. No ser humano, o óvulo e o espermatozóide contêm similar número de cromossomos (22 autossomos + o cromossomo sexual X, na fêmea; e Y, no macho). Na reprodução, a fusão do óvulo e do espermatozóide reconstitui um genoma humano completo com 46 cromossomos.

Entretanto, foi divulgado, recentemente, o nascimento de Kaguya, a filha de duas camundongas, o que demonstrou que um mamífero saudável conhecido como 'partenota', pôde ser produzido pela fusão de dois grupos de cromossomos femininos, sem a participação do sexo masculino. A inserção de um núcleo de um óvulo geneticamente modificado em um óvulo normal foi realizada em aproximadamente 600 óvulos. Após implantes de 457 ovos nos úteros de camundongas, somente 28 embriões foram produzidos. Destes, nasceram duas camundongas. Os restantes foram abortados ou nasceram anormais. Um dos 'partenotas' se desenvolveu até a fase adulta e apresentou habilidade de reprodução, produzindo várias ninhadas após acasalamento com um macho. Normalmente, os mamíferos adquirem a metade dos cromossomos das fêmeas

e a outra metade dos machos. Quando acontece dos embriões possuírem somente cromossomos femininos, normalmente morrem nas primeiras etapas do desenvolvimento placentário. Aqueles que possuem somente materiais genéticos masculinos geralmente são defeituosos.

O *imprinting* genômico foi a grande descoberta para o desenvolvimento desta tecnologia. Ou seja, alguns genes são expressos no DNA maternal, mas estão bloqueados no DNA paternal, ou vice-versa. Após bloquear o gene-chave no óvulo da doadora do DNA, os cientistas fusionaram dois óvulos. O gene bloqueado está envolvido no mecanismo que controla a atividade dos genes oriundos do macho e da fêmea. Os óvulos fusionados foram ativados quimicamente para produzir embriões que foram implantados nas placentas de camundongas.

Assim como na clonagem, um outro tipo de reprodução assexuada é possível em camundongos, e talvez seja possível em alguns outros mamíferos. Entretanto, a eficiência desta tecnologia é muito baixa, menor que no processo de desenvolvimento da ovelha Dolly. Somente 0,6% dos embriões criados sobreviveu. Assim é impensável, inaceitável e inseguro utilizá-la em seres humanos.

No experimento divulgado, os pesquisadores focaram dois genes importantes para o *imprinting* genômico. Os genes *Igf2* e *H19*, que residem no cromossomo 7 do camundongo, são também expressos no embrião humano. Quando o óvulo do camundongo amadurece, o *H19* torna-se ativo e o *Igf2* é inativado. Entretanto, no espermatozóide, o oposto ocorre com os mesmos genes. No cromossomo masculino, o gene *H19* está inativo e o gene *Igf2* é ativo.

Normalmente, quando dois grupos de cromossomos maternos são fusionados, o embrião não se desenvolve porque os genes não são apropriadamente ativados. Os pesquisadores retiraram o gene *H19* de um ovócito imaturo de camundonga e observaram que o gene *Igf2* no genoma maternal tinha sua atividade aumentada. Sabe-se que o *Igf2* regula a produção de uma proteína que por sua vez regula o desenvolvimento do embrião. O gene alterado teve um grande impacto sobre a expressão de mais de mil genes, demonstrando a complexidade da regulação do desenvolvimento embrionário.

Por que na evolução dos mamíferos foi selecionado o processo de reprodução que envolve genes de macho e de fêmea? Uma resposta simples seria que isto maximiza a mistura de gene dos dois sexos. Sem dúvida, se somente as fêmeas fossem responsáveis pela reprodução, elas produziriam uma população de indivíduos geneticamente semelhantes. O mesmo é verdade para os machos.

Plantas e animais que têm a competência de reproduzir por partenogênese ou androgênese (fusão de dois espermatozoides) produzem machos quando aumenta a necessidade deles. No entanto, este não foi o processo de seleção na evolução dos animais mamíferos.

De qualquer maneira, acreditamos que ainda não chegou o fim do sexo masculino. Dados recentes demonstraram que o macho não é obsoleto. Apesar da clonagem, que produz um embrião sem a fertilização do óvulo pelo espermatozoide, e do nascimento de camundongos sem pai, o macho tem mais importância na procriação do que se pensava. Foi descoberto que o espermatozoide fornece, além dos cromossomos masculinos na fertilização do óvulo, cerca de três mil moléculas de RNA mensageiras que são introduzidas no óvulo pela célula reprodutiva masculina no ato da fecundação. Destas, foram identificadas seis moléculas encontradas no espermatozoide e nos ovos fecundados, mas não nos óvulos não fertilizados.

Aparentemente, estes RNAs agem nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário. Utilizando espermatozoides humanos para 'fertilizar' artificialmente óvulos de hamsters, foram encontradas nos óvulos duas moléculas de RNA provenientes das células masculinas. Elas carregavam instruções genéticas para síntese das proteínas protamina-2 e clusteína. Esta última molécula está envolvida em numerosos processos da fertilização e no desenvolvimento embrionário saudável. Talvez estes dados expliquem a baixa eficiência da clonagem, ou seja, no embrião clonado deve haver deficiência dos RNAs fornecidos pelos espermatozoides.

A Misteriosa Máquina Celular

Nos últimos anos, apesar de a ciência ter avançado como nunca em toda sua história, ainda conhecemos muito pouco sobre os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento, a diferenciação e a regulação da divisão celular. Há pouco tempo a união de um espermatozoide com um óvulo era a única maneira de gerar a vida nos mamíferos. Este conceito começou a mudar quando os cientistas criaram animais através da clonagem, como foi o caso de Dolly, a ovelha vedete, e de tantos outros animais.

Estas investigações são importantes porque existem cientistas que acreditam que a espécie humana poderá se extinguir em 10 milhões de anos. Isto se refere principalmente ao cromossomo Y que poderá perder seus 45 genes, incluindo o gene SRY responsável pela produção de hormônios. Este cromossomo surgiu

a 300 milhões de anos possuindo 1.438 genes. Assim, neste período já perdeu 1.393 genes. Aparentemente um outro cromossomo terá a tarefa de desenvolver um gene para determinação do sexo. Os pesquisadores acreditam que se o cromossomo Y for extinto isto poderia criar dois ou mais sistemas de determinação sexual resultando em duas espécies humanas diferentes. Alguns cientistas acham que o cromossomo Y perdeu genes desnecessários e que não perderá os genes essenciais para a manutenção da espécie.

Sabendo do risco de extinção, pesquisadores japoneses há pouco tempo produziram um camundongo misturando DNA obtidos de duas fêmeas. O macho ficou fora da jogada! Em contrapartida, cientistas americanos sugeriram uma maneira de as fêmeas não fazerem parte desta equação reprodutiva, pois acabam de mostrar que camundongos machos foram capazes de produzir óvulos. Este novo modo de manipular a construção da vida pode, eventualmente, encaminhar a ciência para um lado que evitará as objeções éticas, morais e religiosas existentes em torno da pesquisa envolvendo embriões humanos. Com isto espera-se que se torne realidade a promessa médica de desenvolver células-tronco humanas sem destruir nada que seja considerado uma vida em potencial.

Os pesquisadores conseguiram produzir óvulos a partir de células-tronco embrionárias, sem utilização de fêmeas. Este experimento foi realizado em camundongos, mas a possibilidade de que dois homens pudessem combinar seus materiais genéticos para gerar um bebê existe, pelo menos teoricamente. Um homem supriria o espermatozóide e o outro o óvulo. Na realidade este não é o problema, os pesquisadores querem é entender o ainda complexo mistério da vida. Como alguma coisa tão pequena, como um ovo, pode desenvolver-se como um animal ou um ser humano completo?

Os óvulos são as células mais importantes do organismo, mesmo se comparados aos espermatozóides, por que eles colocam em sintonia o relógio biológico da reprodução. Numa clonagem, ao se transferir um DNA de uma célula adulta normal para um óvulo, o ovo formado reprograma o DNA, tornando-o totalmente diferente daquele existente no tecido do qual foi retirado. Esta célula clonada torna-se capaz de se desenvolver como qualquer tipo de células do organismo ou de tornar-se uma entidade complexa, como um organismo vivo. A clonagem fornece para a misteriosa máquina celular chamada ovo a possibilidade da volta no tempo.

Se o óvulo for fertilizado ou clonado, no ovo resultante formam-se células-tronco, desejadas pelas suas promessas médicas, já que podem se dividir e se

tornarem diferentes tipos de tecidos, como células de pele para serem utilizadas no tratamento de queimaduras, neurônios para serem usados em pacientes com doenças neuro-degenerativas, ou células pancreáticas que podem revolucionar o tratamento da diabetes, e assim por diante. No chamado clone terapêutico, o DNA de um paciente é transferido para um óvulo e produz células-tronco embrionárias que podem se diferenciar em tecidos e células que possuem o código genético do paciente: um perfeito tecido ou órgão, à prova de rejeição. Na busca de tais células, cientistas coreanos anunciaram, este ano, que tinham clonados embriões humanos, utilizando óvulos de mulheres doadoras.

A objeção a este trabalho não é somente devida ao fato de essa clonagem poder produzir uma criança, mas também devida à produção e destruição de aglomerados de células, em um estágio do desenvolvimento que, em teoria, poderia produzir bebês, caso fossem implantados num útero. Alguns indivíduos argumentam que embriões, mesmo que ainda microscópicos e desestruturados, não importando como foram desenvolvidos, são seres humanos. Outros somente vêem, nestes casos, aglomerados de células.

Os óvulos gerados por camundongos machos, caso produzissem células-tronco, evitariam as objeções quanto a colocar as fêmeas para doarem seus óvulos. Quando os óvulos obtidos de dois machos foram identificados, tentou-se fertilizá-los com espermatozóides. Mas, infelizmente, não funcionou! Os óvulos possuem o tempo fisiológico exato para serem fecundados. A utilização destas células muito cedo ou muito tarde impossibilita a fecundação. O controle da natalidade baseado na tabela da ovulação tem este princípio. O espermatozóide é mais versátil, ele poderá fecundar um óvulo se for inserido durante diferentes estágios de sua maturação.

Outros cientistas conseguiram produzir espermatozóides de camundongos a partir de células-tronco e usaram as células para fecundar óvulos desses animais. Os óvulos normalmente possuem somente o cromossomo X, enquanto os espermatozóides podem ter um X ou um Y, assim determinando o sexo da prole. Para sobreviver, o animal necessita pelo menos de um cromossomo X. No entanto, os pesquisadores que produziram óvulos a partir de células-tronco acreditam que possam ter óvulos Y que se desenvolveriam em machos se fertilizados com um espermatozóide X.

Quanto mais se desenvolvem os trabalhos engenhosos de biologia nos laboratórios, mais opções éticas e legais estarão sendo buscadas. Por exemplo, o uso da clonagem para desenvolver células-tronco embrionárias é preferível

ao pagamento de uma mulher para incubar células clonadas até o embrião estar crescido e ser depois abortado para possibilitar seu uso como fonte de tecidos para tratamento de lesões.

Pobre dos Atletas Comuns e Mortais

Antes do atentado terrorista na Espanha e, mais recentemente, ao aproximarem-se as olimpíadas da Grécia, as autoridades encarregadas da segurança já tinham solicitado à Organização do Tratado do Atlântico Norte (Otan) ajuda para garantir a tranquilidade e evitar acontecimentos indesejáveis durante os jogos em Atenas. Agora, com maior razão, a preocupação deve ter aumentado. No entanto, em jogos olímpicos anteriores, a maior ameaça aos atletas era a utilização de substâncias estimulantes ou excitantes ilegais – conhecidas como *doping* – para melhorar o desempenho. A aplicação ilegal de estimulantes já era comum em cavalos de corridas para aumentar o rendimento.

Historicamente, as primeiras drogas conhecidas para tal finalidade foram o ginseng, o ópio, e esteróides obtidos de testículos de ovelhas. Nas décadas de 1940 e 1950, com o avanço do conhecimento na área da endocrinologia, apareceram os esteróides anabolizantes e algumas outras substâncias não esteróides, com efeitos semelhantes. Os esteróides anabolizantes são derivados do hormônio masculino, a testosterona, formando a androstenediona, a nandrolona e o estanozolol, entre outros compostos. Eles aumentam a massa muscular e sua contratatura e a resistência à fadiga, diminuindo o ritmo cardíaco, bem como o período de recuperação – fatores críticos para os atletas em vários tipos de esportes que envolvem força de explosão muscular. Estas drogas não são específicas, e os pesquisadores estão aprendendo mais sobre fatores locais de desenvolvimento muscular.

Os avanços da biologia molecular e da engenharia genética permitiram que pacientes que possuem distrofia muscular, com perda de músculo seletivo, pudessem ser tratados com fatores genéticos locais para recuperar sua atividade física. Por outro lado, já se sabe que os bons velocistas tendem a ter uma versão do gene chamada alfa-actinina-3, ou ACTN3, enquanto corredores de longas distâncias tendem a apresentar uma versão diferente, a ACTN2, e os corredores mais rápidos tinham não apenas uma, mas duas cópias do ACTN3.

A investigação na terapia gênica, com objetivos voltados ao tratamento e prevenção de doenças, está avançando continuamente. O conhecimento científico sempre pode ser utilizado sem ética e ilegalmente. Assim, esta tecnologia pode

rapidamente infiltrar-se nas atividades esportivas, contaminando os atletas. Como os genes funcionarão no *doping*? Imagine os genes como o *software* de nosso organismo. Como num computador, os genes contêm códigos que assinalam, para cada célula em nosso organismo, quais são e quando devem realizar certas tarefas. Se tivermos uma falha no código que leve nosso computador a não funcionar apropriadamente, um técnico de computador pode inserir um segmento do código correto para corrigir o defeito. A transferência de genes é similar a fazer mudanças no *software* de nosso computador pessoal. Quando isto é realizado com material genético num organismo vivo, isto é conhecido como terapia genética. Se o computador esta funcionando bem, mas nós queremos fazer um *upgrade* em certa área, podemos arrumar um *software* que reforce os códigos existentes, tornando-o mais poderoso ou com mais recursos computacionais. O *upgrade* genético para aumentar a força muscular numa pessoa normal, utilizando-se a transferência de genes, é a base da terapia gênica, e no caso de atletas, do *doping* genético.

A injeção de camundongos com o gene de crescimento conhecido como fator I de crescimento (IGF-I) levou estes animais a obterem uma musculatura 30% mais forte. Assim, é possível que a transferência de genes dirigida ao músculo seja usada para aumentar seu rendimento. O *doping* gênico foi um problema para as olimpíadas de agosto de 2004 em Atenas, mas em 2008, poderá ser problema nos jogos olímpicos de Beijin.

Recentemente, os cientistas identificaram o gene responsável pela síntese de eritropoetina (EPO), o qual estimula a eritropoese (formação de hemácias, células vermelhas sanguíneas). Estas células são importantes para provas de resistência como a maratona e o ciclismo. A eritropoetina sintética, utilizada para tratamento de anemia é considerada ilegal pelo Comitê Olímpico Internacional, foi o centro de um escândalo de *doping* na clássica competição de ciclismo na França, em 1998. Utilizando como veículo vírus não patogênicos, o gene EPO já foi inoculado em músculos da perna de primatas, para mantê-los com alto suprimento de hemácias. A dificuldade neste trabalho, como em outros casos de terapia gênica, é controlar a atividade do gene EPO ligado ao vírus. Este é um problema tão importante na terapia gênica que logo terá uma solução tecnológica.

Devido ao fato de a transferência de gene usar o próprio organismo do atleta para desenvolver mudanças a nível celular, as evidências químicas do *doping* genético não são tão aparentes, como nos casos do uso de drogas, como esteróides e anfetaminas. As tecnologias disponíveis incluem a biopsia muscular,

imagens obtidas por ressonância magnética e a utilização de alguns marcadores do vírus vetor, que transporta o gene alterado no organismo. Ao longo dos anos, observou-se que alguns técnicos e empresários, para aumentar a *performance* dos atletas, querem usar o conhecimento científico mais moderno. Por isto, logo devem ser regulados os efeitos da engenharia genética no esporte e iniciado o desenvolvimento de métodos para detecção do *doping* molecular.