

DNA Recombinante e seu Uso para Regeneração Tecidual

LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES¹; LEANDRO SILVA NUNES²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; EDUARDO BIERHALS BLODORN²; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²; EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN²; HADASSA GABRIELA HORTIZ²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – laisdsantosg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – leandro_donfa@hotmail.com; williamwwe@yahoo.com.br; edu.blodorn@gmail.com; amandaweege98@gmail.com; edu.ndell@gmail.com; hortizhadassa@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A regeneração refere-se à capacidade de substituir tecidos ou estruturas corporais que tenham sido danificados, sendo um mecanismo essencial para a sobrevivência agindo contra as constantes alterações sofridas pela ação da natureza e conservando a multicelularidade dos seres vivos (SILVA, PATRICIA et al 2011). Esta capacidade é vastamente distribuída desde os filos mais basais aos mais complexos, entretanto, o grau morfológico e funcional de recuperação varia consideravelmente entre níveis de organização, grupos, espécies relacionadas e mesmo entre diferentes tecidos de um mesmo animal.

Dentre os vertebrados, algumas espécies como *Xenopus laevis* e *Danio rerio*, apresentam mecanismos de reconstrução de membros e órgãos inteiros (BROCKES & KUMAR et al 2006), como caudas, membros/nadadeiras, mandíbulas, retinas e extensas partes do coração. Embora os mamíferos apresentem a capacidade de renovação contínua, isso somente ocorre em certos tipos celulares como células hematopoiéticas, epitélio intestinal e pele, e têm a habilidade de restaurar um número restrito de tecidos, tais como músculos esqueléticos, sistema nervoso periférico e fígado.

A capacidade regenerativa limitada dos mamíferos tem sérias implicações para os danos teciduais. Uma das complicações decorrentes de danos teciduais que não pode ser reparada pela regeneração em mamíferos é a amputação, um processo que quando realizado em humanos ocorre em consequência de trauma, doença médica ou cirurgia, acidentes incluindo de trânsito e de trabalho, diabetes e doenças cardiovasculares. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) dos 13,2 milhões de brasileiros que declararam apresentar algum tipo de deficiência motora, 470 mil sofreram amputações. Somado a isso tem-se observado um aumento no número desse procedimento no Brasil, segundo dados do SUS, no período entre 2008 e 2018, foram realizados mais de 500 mil amputações hospitalares, isso se torna um problema, pois, esse procedimento resulta em diminuição da qualidade de vida e da capacidade laboral devido a redução da mobilidade.

Para encontrar possíveis soluções para esse problema, diversos estudos utilizando modelos animais têm sido aplicados em pesquisas de regeneração tecidual, sendo o mais consagrado deles o *Danio rerio*, conhecido como *Zebrafish* ou paulistinha. Esse é um peixe tropical teleósteo, da família dos ciprinídeos, que é uma espécie ovípara ornamental, apreciada por aquaríofilos e nativo dos córregos da região sudeste do Himalaia (MAYDEN, RICHARD et al 2007). O modelo *Zebrafish* ganhou popularidade por uma série de características, pois, além de o seu genoma ter sido totalmente sequenciado, apresentando

aproximadamente 80% de homologia com mamíferos, possui vantagens como: baixo custo de manutenção, a facilidade de manejo, a alta fecundidade das fêmeas, a fertilização externa dos ovos, a transparência óptica dos embriões, e o desenvolvimento rápido (LOPES, MÔNICA et al 2019).

Devido a estas características é muito apreciado em testes laboratoriais *in vivo*, especialmente, os que envolvem estudos sobre regeneração tecidual. Para estes testes é usado como modelo de regeneração para vertebrados a amputação da nadadeira caudal de *Zebrafish*, uma vez que, esta estrutura oferece vantagens como ser facilmente acessível para manipulação e avaliação, além de apresentar uma capacidade regenerativa extremamente rápida, recuperando a forma e o tamanho idênticos aos da nadadeira intacta em 20 dias.

Segundo estudos moleculares, o processo regenerativo é controlado por mecanismos regulatórios que ativam os genes responsáveis pela reconstrução do tecido, ou membro lesionado. Tendo conhecimento do gene de interesse, é possível, através da clonagem gênica, construir uma molécula de DNA recombinante, ou seja, uma sequência produzida sinteticamente contendo apenas as partes desejadas, tornando possível, induzir a expressão gênica de maneira dependente de contexto.

Baseado nesses conhecimentos, e na atual carência de uma metodologia eficaz, visto que, o processo regenerativo é limitado e muitas vezes custoso a nível biológico, o atual trabalho tem como objetivo produzir uma molécula de DNA recombinante que possua a capacidade de induzir a expressão específica do tecido lesionado em vertebrados.

2. METODOLOGIA

Para a construção do DNA recombinante, optou-se por sintetizar quimicamente a sequência, evitando, assim, que houvessem componentes indesejados, usando como template inicial a sequência enhancer do gene *lepb*, codificador de leptina em *Zebrafish*, juntamente com um promotor mínimo.

As sequências obtidas foram editadas no software de edição e clonagem gênica Vector NTI (ThermoFisher), logo após, realizou-se um mapeamento de restrição para a identificação de sítios para enzimas de restrição dentro da sequência, e posterior remoção destes sítios através da substituição de bases.

Passado o processo de mapeamento de restrição efetuou-se uma análise *in silico* para TFBS (sítios de ligação a fatores de transcrição; do inglês, *transcription factor binding site*) em softwares de predição de TFBS, tais como, AnimalTFDB3.0 (Guo Lab) e TRAP (Max Planck Institute for Molecular Genetics). A sequência enhancer otimizada foi ligada operacionalmente a um promotor mínimo eucariótico, tais como YB_TATA, minCMV, minSV40, miniTK.

Esta construção gênica foi considerada um invento e foi depositada como patente de invenção no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Para isso, foi realizada uma busca de anterioridade nos bancos de patente tais como, INPI, Google patents, Portal capes, USPTO, WIPO e Spacenet. A notificação de invenção foi submetida à CIT, a qual, posteriormente realizou o depósito sob o número de protocolo (BR102019024658-8).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da metodologia descrita foi possível desenvolver uma sequência de DNA sintético recombinante construída do enhancer capaz de direcionar a expressão de genes envolvidos no processo regenerativo na nadadeira caudal de

Zebrafish. Ademais, a busca de anterioridade demonstrou vários trabalhos conforme os termos de busca utilizados, demonstrados na tabela 1, porém, verificou-se que estes não abordavam a utilização de DNA recombinante para regeneração tecidual. Tornando possível o depósito da patente de invenção (BR102019024658-8) do método descrito neste trabalho a partir da qual, parceiros comerciais como laboratórios de desenvolvimento de suplementos ou medicamentos estão sendo contactados para uma possível transferência de tecnologia.

Termos de busca	Resultado da busca					
	INPI	WIPO	USPTO	Google Patents	Espacenet	Portal Capes
DNA recombinante; peixes	0					
Regeneração; peixes	0					
DNA recombinante; regeneração						0
Enhancer	6					
Enhancer; Zebrafish; gene expression.; regeneration		2368		992	1	
Enhancer; Zebrafish; gene expression.; gene construction		1599		715	0	
Enhancer; Zebrafish; regeneration; knockin		109		227	0	
Transgenic; Zebrafish		10433	19	4416	109	
Gene construction; fish		56407	3	33463	36	
Recombinant DNA; regeneration; Zebrafish		3485		1051	0	

Tabela 1: Número de documentos encontrados na busca de anterioridade.

4. CONCLUSÕES

A partir do resultado apresentado concluiu-se que através da metodologia descrita é possível se obter uma molécula de DNA recombinante capaz de direcionar a expressão de genes envolvidos no processo regenerativo em vertebrados, mais especificamente, na nadadeira caudal de *Zebrafish*. O grupo de pesquisa tem como perspectiva para esse a utilização da técnica para induzir a expressão específica do tecido lesionado em vertebrados. A presente invenção poderá ser transferida para o setor produtivo, visando a sua aplicação na indústria farmacêutica e médico, possibilitando o reparo da ponta dos dígitos em humanos, através da terapia gênica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MAYDEN, Richard; TANG, Kevin; CONWAY, Kevin; HASKINS, Miranda. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. **Journal of Experimental Zoology**. 308B, p. 642–654 (2007).

SILVA, Patrícia. **Mecanismos Celulares e Teciduais da Regeneração em Holotúrias (Echinodermata: Holothuroidea)**. 2011. Tese (mestrado) em Ciências, na área de Fisiologia Geral – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade.

LOPES, Mônica. Zebrafish. Sua Importância na Avaliação de Toxicidade. **III SIMPÓSIO “FRONTEIRAS NAS CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS”**. São Paulo. 2019. Acessado em 27 set. 2020. Online. Disponível em: <http://cienciasfarmaceuticas.org.br/wp-content/uploads/2019/10/O-uso-do-Zebrafish-como-modelo-para-avalia%C3%A7%C3%A3o-toxicol%C3%B3gica-n%C3%A3o-cl%C3%ADnica.-M%C3%B4nica-Ferreira.pdf>

Kang, J., Hu, J., Karra, R., Dickson, A. L., Tornini, V. A., Nachtrab, G., Gemberling, M., Goldman, J. A., Black, B. L., & Poss, K. D. Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. **Nature**, 532, p. 201–206 (2016).

MARQUES, Ines; LUPI, Eleonora; MERCADER, Nadia. Model Systems for Regeneration: Zebrafish. **The Company of Biologists Development**. 2019.

OCHANDIO, Beatriz Silva. **Estudo da ação da Dexametasona na Regeneração da Nadadeira Caudal do Peixe teleósteo *Cyprinus carpio* (carpa)**. 2010. 61 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

BROKES, Jeremy; KUMAR, Anoop. Appendage Regeneration in Adult Vertebrates and Implications for Regenerative Medicine. **Science**. 2006.