

Capítulos

CAPÍTULOS

PRINCÍPIOS ESSENCIAIS DA GENÉTICA, DA ESTRUTURA E DA FUNÇÃO DO DNA

1. Como Aprendemos que o DNA É o Material Genético
2. Como Aprendemos a Função do DNA
3. Como Aprendemos a Regulação dos Genes

MÉTODOS DE PEQUENA E GRANDE ESCALA PARA A ANÁLISE DO DNA

4. Ferramentas e Técnicas Básicas da Ciência do DNA
5. Métodos para Encontrar e Expressar Genes Importantes
6. Métodos Modernos de Análise de Genomas Completos

GENÉTICA HUMANA

7. A Ciência do DNA no Câncer
8. Aplicação da Ciência do DNA à Genética e à Evolução Humana





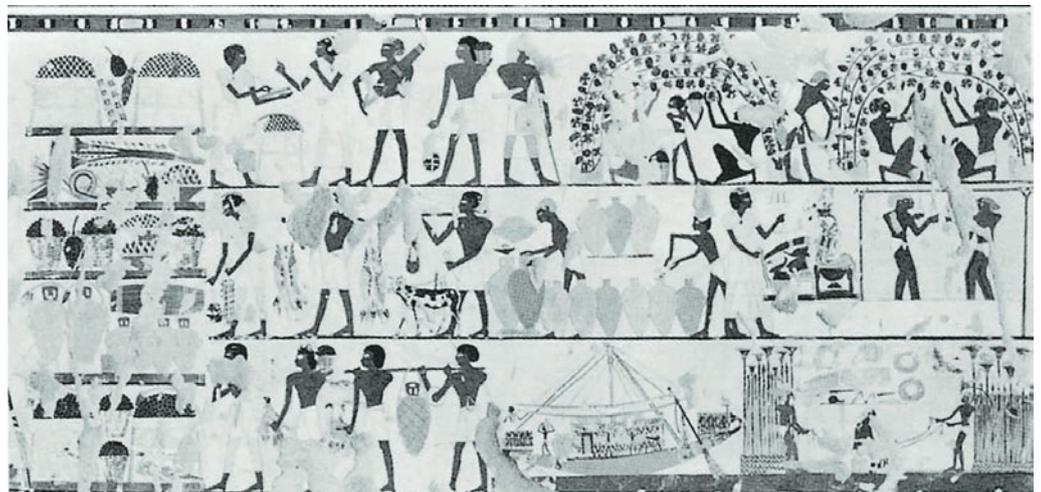
Francis Crick e James Watson em Cambridge, Inglaterra, 1953

(Cortesia da coleção especial de James D. Watson, Cold Spring Harbor Laboratory Archives.
De James J. D. 1968. *The double helix*. Atheneum Press, New York.)

Como Aprendemos que o DNA É o Material Genético

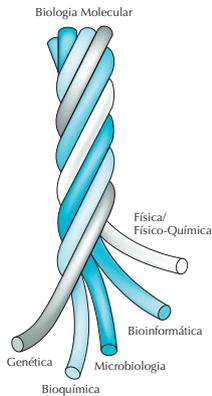
A ciência do DNA nasceu em 25 de abril de 1953, quando James Watson e Francis Crick anunciaram, na revista britânica *Nature*, a determinação da estrutura de “dupla hélice” da molécula de DNA. A era do DNA atingiu a maturidade em 2001, com a publicação de uma versão preliminar do genoma humano, o conjunto integral dos códigos de DNA que estabelece os parâmetros da vida humana. Todavia, veio a infância da clonagem de genes, da engenharia genética, do processamento de genes e da recombinação do DNA. Na maturidade do futuro é onde residem as respostas para as velhas perguntas: De onde viemos? Por que devemos morrer? Como conseguimos lembrar o passado e prever o futuro?

Para o público em geral, essa nova era é provavelmente representada com mais frequência pela palavra “biotecnologia”. Assim, iniciemos nossa exploração do DNA com essa palavra em mente. Traduzida literalmente, biotecnologia significa “tecnologia da vida”, a aplicação do conhecimento a respeito das coisas vivas no uso prático pela humanidade. Os antigos usos das leveduras na produção do pão e das bebidas alcoólicas e das bactérias na fabricação do queijo são, no sentido amplo, biotecnologia. Entretanto, a revolução da biotecnologia moderna baseia-se em uma compreensão profunda da tecnologia da vida, a mecânica das máquinas vivas.



Hieróglifos egípcios da produção de vinho

A fermentação da uva para fazer vinho é um dos exemplos mais antigos da biotecnologia. (Cortesia do Metropolitan Museum of Art.)



Biologia molecular é a síntese de diversas disciplinas

(Representação artística desenvolvida por Lisa Shoemaker)

Os aspectos técnicos da vida envolvem as interações químicas complexas que têm lugar entre as milhares de diferentes moléculas encontradas dentro de toda e qualquer célula viva. Entre elas, o DNA (ácido desoxirribonucléico) é a molécula-mestra, em cuja estrutura está codificada toda a informação necessária para criar e comandar a maquinaria química da vida. A análise do fluxo e da regulação dessa informação genética, entre DNA, RNA (ácido ribonucléico) e proteína, é o objeto da genética molecular.

Em um sentido amplo, os termos genética molecular e biologia molecular têm se tornado quase sinônimos. Tal mudança em nossa compreensão da vida tem desencadeado uma dramática e aparentemente súbita revolução biológica. Entretanto, é prudente lembrar que incorporados à palavra “revolução” estão os termos “revolver” e “evolução”. Isso nos traz à mente as forças ocultas das revoluções históricas e cíclicas que, embora irrompam de súbito do passado, progridem a longo prazo. À medida que traçamos o desenvolvimento dos conceitos que conduziram a essa revolução biológica, muito ajudará termos em mente alguns temas e algumas tendências que podem auxiliar a organizar nossa compreensão em relação à biologia molecular.

A BIOLOGIA MOLECULAR É UMA DISCIPLINA HÍBRIDA

As técnicas da genética molecular estão agora sendo aplicadas em quase todos os principais campos da biologia – da neurofisiologia à botânica e da imunologia às práticas forenses. A genética molecular tem mesmo obscurecido as linhas entre a biologia, a física e a química, com muitos cientistas movendo-se livremente entre elas. Apesar disso, com frequência estudantes são levados a pensar que os ramos das ciências são separados por completo uns dos outros. Física é física, química é química e



Max Delbrück (acima, à direita) com estudantes na Cal Tech, em 1949
(Cortesia do California Institute of Technology.)

biologia é biologia – os três ramos jamais deverão se encontrar. Infelizmente, tal divisão artificial ainda persiste, mesmo na mente de alguns cientistas.

A ciência da biologia molecular é a antítese dessa noção de separação. Ela surgiu da confluência de disciplinas das ciências físicas e naturais, em especial da genética, da físico-química, da cristalografia de raio X, da bioquímica, da microbiologia, da bacteriologia e da virologia. No início do século XX, a física e a química foram unificadas pela teoria quântica, a qual explicou a estrutura fina da matéria. Com início na quinta década do século passado, a biologia, por sua vez, começou a se beneficiar com o afluxo de idéias da físico-química.

Dois físicos quânticos foram muito influentes na ruptura das barreiras entre as ciências: Max Delbrück e Erwin Schrödinger. Delbrück, que é, com todo o direito, considerado o pai intelectual da biologia molecular, foi treinado sob a supervisão de Niels Bohr, o grande físico atômico que deduziu que os elétrons ocupam estados energéticos discretos (orbitais) em torno do núcleo atômico. Já as equações de onda de Schrödinger definiram o movimento dos elétrons dentro dos orbitais. Esses dois cientistas pensavam que o mistério biológico da auto-replicação poderia ser explicado em termos quantomecânicos. Já maduro, Delbrück mudou sua atenção para a biologia e nunca mais olhou para trás.

No entanto, Schrödinger nunca fez a mudança para a biologia, mas o seu livro *O que É a Vida? Aspectos Físicos da Célula Viva* (1944) influenciou uma geração de cientistas físicos a olharem de perto os sistemas biológicos. Apesar de Schrödinger ter admitido ser um diletante no campo da genética, ele especulou que “(...) de tudo o que nós temos aprendido sobre a estrutura da matéria viva, devemos estar preparados para descobrir que ela funciona de uma maneira que não pode ser reduzida às leis ordinárias da física”. Dessa forma, Schrödinger instigou uma geração de cientistas com a expectativa de que, ao estudar a natureza da hereditariedade, se poderia descobrir princípios da matéria inteiramente novos.

Mesmo que não se tenha descoberto nenhuma nova lei, Delbrück e outros recém-chegados mostraram que os axiomas e os métodos das ciências físicas aplicam-se igualmente bem à biologia. A biologia molecular não poderia se tornar uma disciplina rigorosa sem que essa noção estivesse firmemente estabelecida. Teria sido impossível estudar como as moléculas interagem, e mesmo o mais simples dos organismos, sem uma compreensão básica de como eles reagem no quadro-negro ou no tubo de ensaio.

A BIOLOGIA MOLECULAR BASEIA-SE NOS PRINCÍPIOS DA FÍSICO-QUÍMICA E EM MODELOS ABSTRATOS DE SISTEMAS

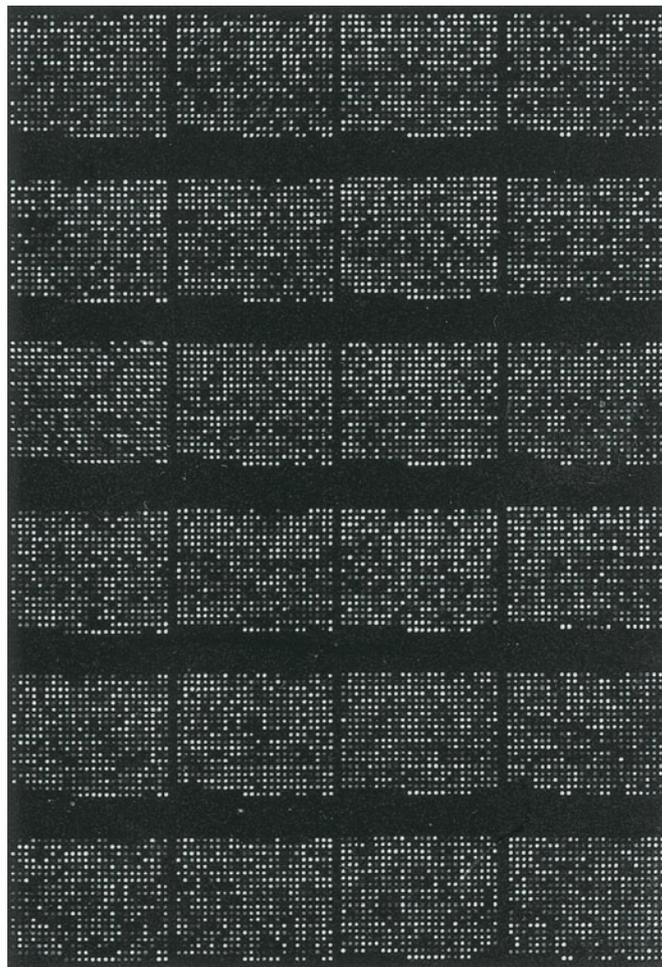
Princípios básicos fundamentam todos os fenômenos biológicos; as coisas vivas obedecem a todas as leis da física e da química. O comportamento químico e físico das partículas elementares definem em última instância os parâmetros do comportamento de qualquer sistema biológico complexo: uma bactéria, uma planta, uma rã ou um ser humano. Essa explanação “reducionista” da vida é resultado direto da idéia de que os sistemas vivos são a fertilização cruzada da biologia pela química e pela física.

Historicamente, a biologia baseou-se na observação direta dos fenômenos naturais complexos no mundo real. A genética molecular tomou emprestado das ciências físicas o uso rigoroso de modelos de sistemas – abstrações simplificadas da realidade em que as variáveis são restritas e as situações experimentais podem ser controladas. O desenvolvimento da biologia molecular foi, em grande parte, movido pela questão de encontrar abstrações mais puras e mais poderosas dos processos biológicos essenciais. Sendo assim, os sistemas de experimentação genética progrediram de organismos multicelulares complexos (tais como os pés de ervilha e as moscas-da-fruta usadas no início do século XIX) a organismos simples de uma célula (bactérias e vírus, no início dos anos de 1940) e a componentes celulares purificados (sistemas *in vitro*, no início dos anos de 1960). A sofisticação crescente dos sistemas experimen-

tais culminou na habilidade de se adicionar genes novos ou alterados a uma bactéria (na década de 1970) e em mamíferos e plantas (nos anos de 1980), bem como de se dirigir alterações de genes em células específicas a um tempo específico no desenvolvimento (nos anos de 1990).

A ERA PÓS-GENÔMICA EXIGIRÁ UMA ABORDAGEM MAIS SINTÉTICA

Os primeiros 50 anos da biologia molecular assumiram uma abordagem primária analítica; isto é, os cientistas estavam especialmente preocupados em reduzir os problemas biológicos aos genes individuais. Tal abordagem foi muito útil na busca de genes-chave, envolvidos na replicação e no desenvolvimento, assim como na identificação de genes envolvidos em um número de desordens genéticas raras, tais como a fibrose cística, a enfermidade de Huntington e a neurofibromatose. Todavia, adiante reside a tarefa difícil de se discernir as atividades sincronizadas de numerosos genes, durante eventos biológicos-chave, como o desenvolvimento e a formação da memória. Abordagens diferentes serão necessárias para identificar os múltiplos genes, os quais se presume que estejam envolvidos nos distúrbios metabólicos comuns, como a



Microarranjo de DNA

Microarranjos de DNA permitem aos cientistas analisar a expressão de milhares de genes de uma só vez. (Reproduzida, com permissão, de Bowtell D. e Sambrook J. 2002. *DNA microarrays: a molecular cloning manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.)

asma e a diabete. Agregando-se à complicação, estão os fatos de que (1) várias proteínas diferentes podem ser produzidas a partir de um único gene, por arranjos diferentes do RNA transcrito e (2) formas adicionais de uma proteína são criadas por modificações “pós-traducionais”, realizadas depois da montagem da proteína original no ribossomo. Ainda mais difícil será examinar as interações complexas entre os genes e o ambiente, a velha questão da natureza *versus* o modo de criação.

Para construir um quadro mais completo do gene, da proteína e das contribuições ambientais para os processos biológicos, os biólogos deverão, cada vez mais, se voltar a abordagens sintéticas que permitirão examinar a expressão coordenada de genes múltiplos. Os microarranjos de DNA, ou *chips* de genes, têm provido muitas das pistas iniciais, mostrando que centenas e mesmo milhares de genes são expressos de modo coordenado, em resposta a vários sinais do desenvolvimento e do ambiente. Esse tipo de multitarefa está além das habilidades mesmo do mais brilhante dos seres humanos, razão pela qual são necessários programas de computadores para detectar e analisar os milhares de experimentos individuais contidos em um único *chip*. Esta é uma das muitas tarefas da nova disciplina híbrida da bioinformática, que usa os algoritmos de computador para administrar e analisar experimentos em larga escala.

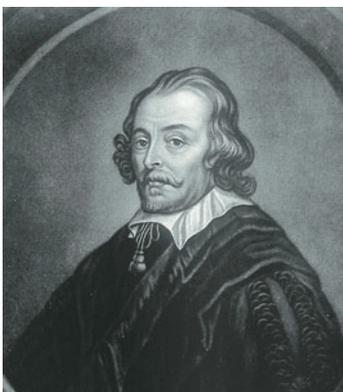
As funções dos genes envolvidos em uma rota metabólica específica podem ser exploradas por diversos meios. Programas de computador podem ser usados para pesquisar em bancos de dados de genes, genes relacionados que tenham sido descobertos previamente, em humanos ou em outros organismos. Uma cópia mutante de um gene pode ser inserida na linhagem germinativa celular de um camundongo e os animais transgênicos resultantes serem analisados quanto às mudanças metabólicas ou comportamentais. Esse tipo de raciocínio sintético demanda que os biólogos integrem conhecimentos derivados de experimentos realizados *in vitro* (“no vidro”, no tubo de ensaio), *in vivo* (na célula ou no organismo vivo) e *in silico* (no computador).

A BIOLOGIA MOLECULAR EMERGE DA TRADIÇÃO DA ESTRUTURA E DA FUNÇÃO

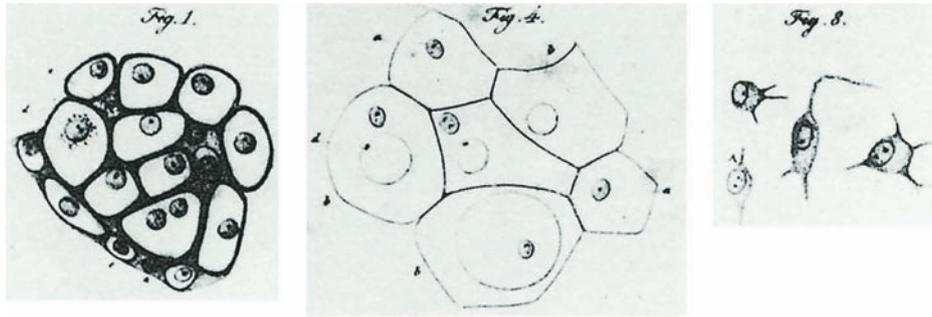
Cientistas naturais têm sempre tentado encontrar relações entre a estrutura e a função das coisas vivas. A biologia molecular é o apogeu dessa tradição, que tem levado os biólogos a remover as sucessivas camadas da organização, revelando por fim as interações moleculares que têm lugar dentro da célula viva. Tal busca começou com o exame dos atributos físicos mais óbvios.

Os médicos do tempo das civilizações mais antigas procuravam relacionar seu conhecimento do corpo humano aos tratamentos das doenças. Assim, anatomia e fisiologia tornaram-se a expressão clássica do funcionalismo estrutural nas ciências naturais. William Harvey, o anatomista do século XVIII, por exemplo, mostrou que certas estruturas físicas – órgãos, incluindo coração, pulmões, veias, artérias e válvulas – trabalham juntas como um sistema para fazer circular o sangue pelo corpo. O coração funciona como uma bomba e os vasos sanguíneos como tubulações.

A teoria celular, desenvolvida por Matthias Schleiden e Theodor Schwann em fins dos anos de 1830, foi um marco importante. Ela fez o funcionalismo estrutural avançar além dos sistemas observáveis diretamente a olho nu. Schleiden e Schwann propuseram que as células microscópicas, definidas essencialmente pela presença de núcleos individuais, são as unidades básicas da estrutura e da função, tanto das plantas quanto dos animais. Foi observado que os órgãos eram compostos de vários tecidos – agrupamentos de células com estrutura similar que cumprem uma função específica. Por exemplo, células epiteliais que recobrem as passagens respiratórias contêm cílios que oscilam para ajudar a ejetar partículas estranhas, tais como fumaça e pó. Por outro lado, foi constatado que as células eram compostas de subestruturas chamadas de organelas, cada uma com sua função específica: mitocôndria para a produção de energia, vacúolos para a armazenagem, cloroplastos para a fotossíntese e ribossomos para a síntese de proteínas.



William Harvey
(Cortesia da Moody Medical Library.)



Desenhos de Theodor Schwann de células de vertebrados mostrando núcleos

(De *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*, 1839. Sydenham Society, Londres.)

O palco foi montado para que o funcionalismo estrutural se movesse para o nível de moléculas biológicas importantes durante os anos de 1930, quando o físico-químico Linus Pauling codificou as leis que governam os arranjos de átomos dentro das moléculas. Durante esse mesmo período, J. Desmond Bernal mostrou que a estrutura de moléculas gigantes, como as proteínas, podem ser estudadas com a utilização da cristalografia de raio X.

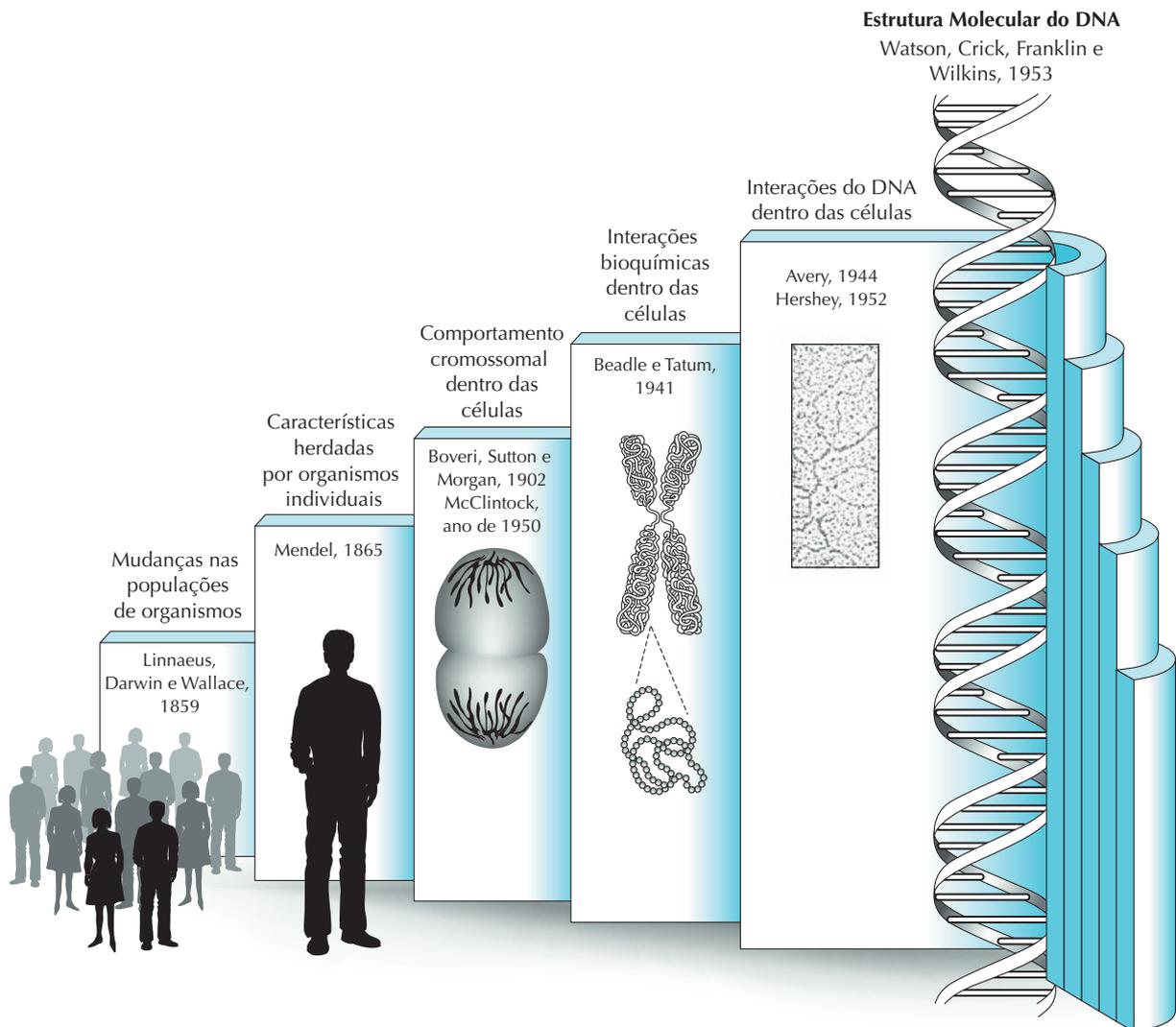
A BIOLOGIA MOLECULAR EMERGE DA BUSCA DA DEFINIÇÃO DA NATUREZA DA HEREDITARIEDADE

A reprodução ou a replicação autônoma é talvez o mais emblemático atributo da vida. Explicar a replicação das células e a herança das características através das sucessivas gerações é, em grande extensão, definir a vida. Durante o desenvolvimento da biologia molecular, os cientistas buscaram uma explicação cada vez mais explícita sobre a natureza da hereditariedade. Com esses temas em mente, vamos agora voltar no tempo para percorrer o caminho do desenvolvimento da biologia molecular, por meio das sucessivas explicações sobre o processo da hereditariedade:

- diversidade e mudanças nas populações dos organismos (Linnaeus, Darwin, Wallace);
- características herdadas pelos organismos individuais (Mendel);
- células germinativas especializadas são “separadas” das células somáticas (Weismann);
- comportamento dos cromossomos dentro das células (Boveri, Sutton, Morgan, McClintock);
- interações bioquímicas dentro das células (Beadle e Tatum);
- interações do DNA dentro das células (Avery, Hershey);
- estrutura molecular do DNA (Watson, Crick, Franklin e Wilkins).

Adiante da dupla hélice de Watson e Crick reside a questão que iria impulsionar a revolução da biotecnologia: pode o DNA e, portanto, a vida ser manipulada? Antes de tratar dessa questão – que é o objeto deste livro – deve-se entender as questões que antecedem a dupla hélice. As respostas a tais questões “pré-DNA” proverão uma revisão da biologia básica e uma perspectiva da revolução do DNA.

Espera-se que muitas questões venham à mente durante a leitura deste livro e que, surpreendentemente, elas possam ser do mesmo tipo de questão que conduziu a desenvolvimentos importantes da biologia molecular. Entretanto, é preciso ter consciência de que há apenas 100 anos não havia explicação de como alguns gêmeos tinham olhos castanhos e outros tinham olhos azuis. Há 75 anos, as estrutu-



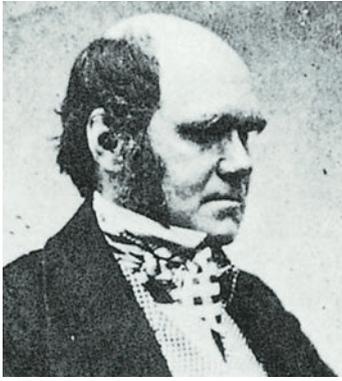
Buscando uma definição cada vez mais explícita de hereditariedade

(Concepção artística desenvolvida por Lisa Shoemaker.)

ras físicas das moléculas orgânicas mais simples não eram conhecidas. Há 50 anos, ainda não sabíamos o número correto dos cromossomos humanos. E, há 25 anos, não conhecíamos nenhum gene por trás do câncer. Contudo, ainda não sabemos o número preciso de genes no genoma humano. Desse modo, ainda existem diversas boas perguntas a serem formuladas.

COMO SE PODE EXPLICAR A DIVERSIDADE (E A SIMILARIDADE) DAS ESPÉCIES?

O biólogo sueco Carolus Linnaeus construiu a primeira hierarquia sistemática para classificar todas as coisas vivas – baseada na unidade “espécie”. A catalogação de uma multiplicidade de organismos por Linnaeus e seus discípulos durante o século XVII evidenciou uma incrível diversidade de formas de vida. Ao mesmo tempo, sua taxonomia enfatizou das marcantes às relativamente sutis similaridades que existem entre os membros de um mesmo gênero, família, ordem, classe, filo e reino.



Charles Darwin, ca. 1859.
(Cortesia do American Museum of Natural History.)

Mesmo assim, a questão de como explicar a diversidade e a similaridade entre as coisas vivas não valia a pena ser colocada nos séculos XVIII e XIX. Ela já tinha sido respondida, por inferência, pela interpretação da história bíblica da criação, que afirmava que cada uma das diversas formas de vida estava presente em forma perfeita no momento da Criação. Em nenhum lugar da Bíblia encontra-se explicitamente a idade da Terra ou dos seres humanos. No entanto, um religioso irlandês do século XVII, o arcebispo James Ussher, concluiu, por meio do estudo das genealogias bíblicas, que a terra tinha sido criada em 4004 A.C. Isso deixou pouco tempo para qualquer grande alteração dos organismos vivos. Cada tipo principal de organismo deve ter sido “criado perfeito”, como uma forma fixa; similaridades entre espécies foram explicadas como pequenas mudanças que tinham ocorrido dentro das formas fixas. Assim, era presunçoso, senão plenamente blasfemo, fazer perguntas acerca da variedade de formas de vida sem mencionar a Criação no mesmo fôlego. Entretanto, no século XIX perguntas agitaram de fato a mente dos naturalistas ingleses Alfred Wallace e Charles Darwin. Independentemente, eles chegaram às mesmas conclusões desrespeitosas: todas as coisas vivas têm evoluído a partir de formas preexistentes, por meio de um processo de mudanças incrementais ao longo dos milênios.

A publicação, em 1859, do livro épico de Charles Darwin *On the Origin of Species* (A Origem das Espécies) assinalou a primeira etapa na revolução biológica que culminou aproximadamente um século mais tarde na estrutura do DNA de Watson-Crick. A teoria da evolução descreveu como a hereditariedade atua em grandes populações de coisas vivas:

- Existe uma seleção natural, ao longo de grandes períodos de tempo de evolução, para as formas de vida mais “adaptadas”.



Espécie de biguá incapaz de voar



Archeopteryx

Darwin observou diversas espécies continentais, tais como o biguá incapaz de voar, que se adaptaram de modos especializados à vida nas Ilhas Galápagos. Fósseis, tais como o réptil na forma de pássaro *Archeopteryx*, forneceram evidências da evolução gradual das formas de vida ao longo de períodos de tempo geológicos.

- A seleção natural surge devido à competição pelo alimento limitado e por outros recursos entre os membros de uma mesma espécie, bem como entre as espécies.
- Só os membros mais adaptados da população sobrevivem para reproduzir.

Em raras ocasiões, mudanças físicas que ocorrem ao acaso aumentam a habilidade individual de se adaptar às condições do meio, ou de explorar novas fontes de alimentos. Essa mudança “adaptativa” aumenta as chances individuais de sobrevivência e de reprodução. As mudanças adaptativas são transferidas para a descendência, como parte do seu patrimônio hereditário. Tais indivíduos são, por sua vez, mais ajustados do que seus pares e sobrevivem para passar as suas características físicas adiante, às sucessivas gerações. Pelo processo de “radiação adaptativa”, populações de organismos se desenvolvem gradualmente para explorar fontes de alimentos especializadas, limitando, desse modo, a competição e aumentando as chances de sobrevivência.

Darwin foi profundamente influenciado pelo geólogo britânico *Sir Charles Lyell* e sua doutrina do uniformitarismo, a qual afirma que as características físicas da terra podem ser atribuídas aos processos climáticos e geológicos que têm ocorrido contínua e *uniformemente* através de períodos de tempo muito longos. Processos comuns que podem ser observados hoje, tais como vulcanismo, sedimentação, deposição de corais e erosão são os *mesmos* processos que deram origem ao Himalaia e a outros aspectos físicos aparentemente “fixos”. Tal teoria foi uma oposição direta à interpretação bíblica de que todos os fenômenos geológicos são produtos de diversos eventos catastróficos singulares: um único ato de criação e um único dilúvio. Lyell argumentou que as camadas de rochas sedimentares (*strata*) são linhas de tempo geológico, estendendo-se desde milhões de anos atrás na história da terra. Ele demonstrou que se poderia determinar a data da emergência e da extinção das espécies, observando-se os seus restos fossilizados nas camadas de rocha.

Darwin estudou avidamente os *Principles of Geology* (Princípios da Geologia) (1830) de Lyell em sua viagem ao redor do mundo do H. M. S. Beagle, durante a qual fez muitas das observações em que baseou sua teoria da evolução. Descrevendo as distintas mudanças anatômicas em formas fósseis relacionadas, Darwin mostrou a operação da evolução ao longo de períodos da pré-história. Seus estudos de anatomia comparada de tentilhões que colonizaram as ilhas vulcânicas de Galápagos, por exemplo, ilustrou vividamente a radiação adaptativa durante a história relativamente recente. Darwin terminou por formular o equivalente biológico do uniformitarismo geológico: o mesmo processo seletivo que tem moldado as novas espécies de Galápagos recentemente tem também diferenciado as formas de vida nas “penumbras” do passado.

COMO OS CARACTERES SÃO TRANSFERIDOS DE UMA GERAÇÃO PARA OUTRA?

Darwin não conhecia a fonte da variação individual sob a qual seu processo evolucionário atuava ou como passava para as gerações sucessivas. Na sua teoria de pangênese, formulada mais tarde, Darwin propôs que as “gêmulas” são liberadas pelas células do corpo, recolhidas nos órgãos sexuais e transmitidas para a geração seguinte. Essa idéia recebeu pouco apoio dos outros cientistas e o seu próprio primo, o cientista multifacetado e matemático Francis Galton, publicou um experimento que a refutava.

Foi o monge agostiniano Gregor Mendel quem trouxe o processo da hereditariedade para o nível do organismo individual, provendo, assim, um mecanismo propulsor da evolução. O artigo de Mendel “Experimentos com Hibridização de Plantas”, publicado em 1865, forneceu base para a análise matemática da hereditariedade.



Gregor Mendel, ca. 1860
(Cortesia do Austrian Press and Information Service.)

de. A partir de resultados de cruzamentos controlados com ervilhas de jardim, ele mostrou que os caracteres são herdados em uma maneira previsível, como “fatores”, que chamamos agora de genes.

O senso comum diz-nos que, como um todo, a descendência é uma mistura de caracteres dos pais. Entretanto, Mendel mostrou que os genes que governam caracteres individuais não se combinam. Em vez disso, os genes são mantidos como *bits* discretos de informação hereditária, imutáveis durante gerações. Mendel propôs que os genes comportam-se como os átomos que compõem uma substância pura – podem se combinar de maneiras diversas, mas sempre mantendo suas identidades distintas.

Séculos de cruzamento de plantas e animais domésticos tinham mostrado que caracteres úteis – velocidade nos cavalos, força nos bois e frutos grandes nos cultivos – podem ser acentuados por meio de cruzamentos controlados. No entanto, não existia uma maneira científica de prever o resultado do cruzamento de dois genitores em particular. A abordagem rigorosa de Mendel transformou o melhoramento agrícola de uma arte para uma ciência. Ele partiu de uma geração parental de patrimônio genético conhecido – para dispor de uma linha de base para, contra a qual, se comparar os padrões de herança da geração filial resultante. Então, Mendel, cuidadosamente, apontou os caracteres encontrados nas gerações sucessivas da descendência. Além disso, antes de olhar o pé de ervilha como um todo, ele se restringiu a sete características físicas (ou visíveis) individuais, as quais podia distinguir com facilidade. Cada característica tem duas formas alternativas. Por exemplo, flores de ervilha são de cor vermelha ou branca. Mendel raciocinou que cada planta parental deve contribuir com um gene alternativo para cada descendente, resultando em um par de genes para cada característica.

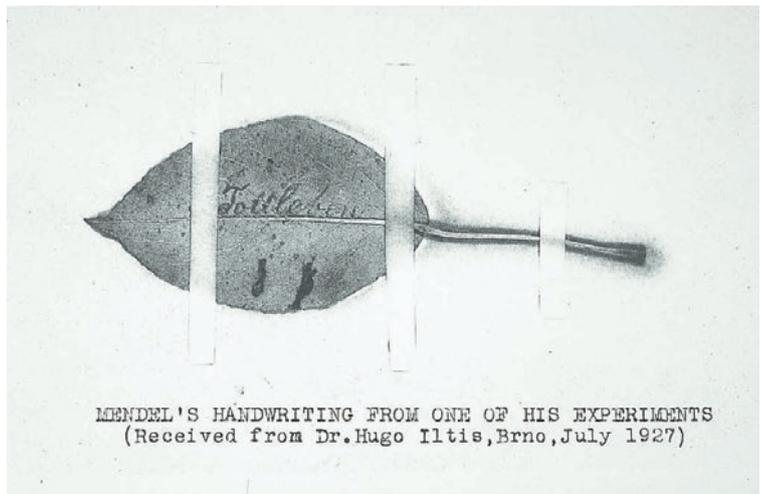
Afim de seguir a herança de genes dos pais para a descendência, Mendel primeiro necessitou estar seguro de quais genes cada um dos pais portava. Assim, ele desenvolveu estoques de linhagens puras, cruzando repetidamente um pé de ervilha consigo mesmo. Isso resultou em estoques de ervilha que apresentam um só caractere alternativo e que, de modo consistente, passam adiante para a descendên-



Algumas características da ervilha examinadas por Mendel e Album Bernay

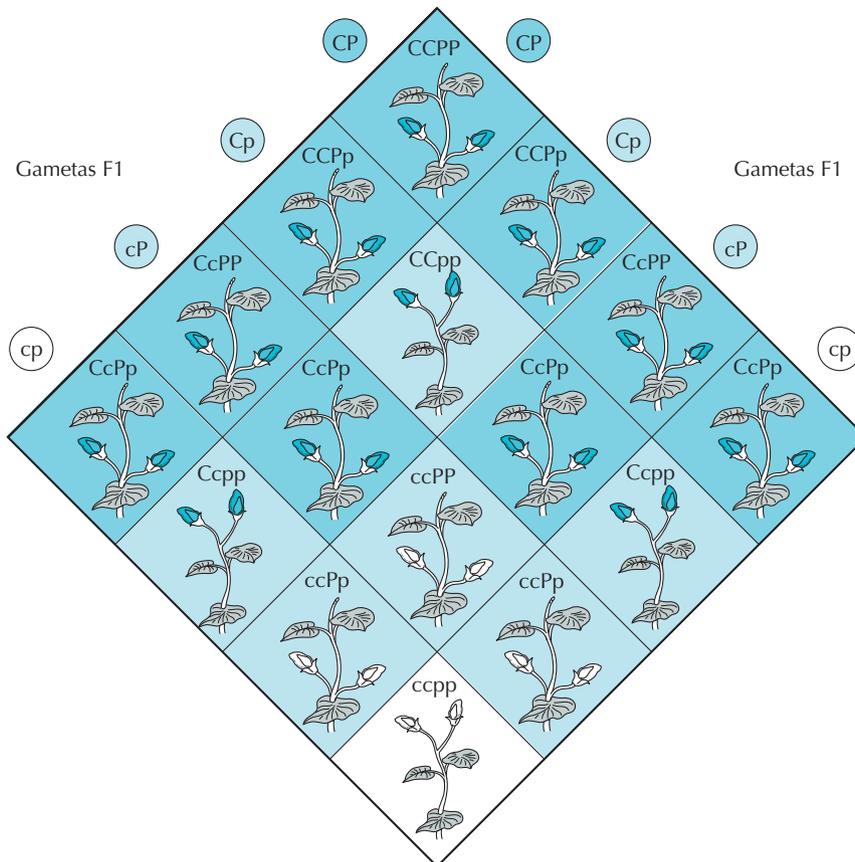
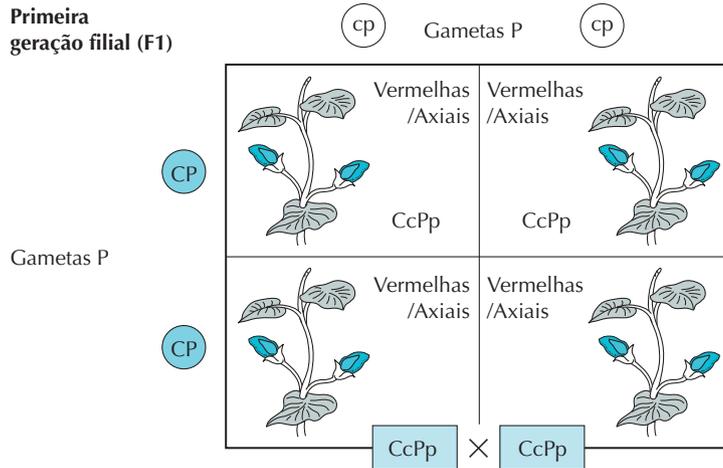
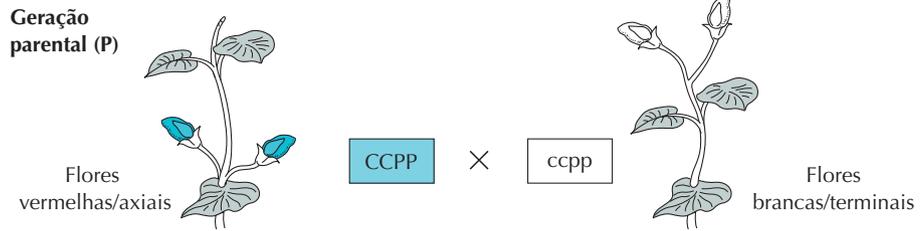
Album Bernay (1876-1893) mostra algumas das características da ervilha que Mendel usou.

(John Innes Foundation Historical Collections. Cortesia da John Innes Foundation.)



Uma folha de um dos experimentos de Mendel

Escrito na folha está “fouleben”, que significa “plana” em alemão.
(Cortesia da American Philosophical Society, Curt Stern Papers.)



Cruzamento di-híbrido

Um cruzamento di-híbrido de ervilhas de jardim, mostrando a herança de duas características: cor da flor (C) e posição da flor (P). (Azul escuro). A presença de pelo menos um alelo dominante para cada caractere resulta em um fenótipo dominante para ambos (azul claro). A presença de ao menos um alelo dominante para um caractere e de dois alelos recessivos para o outro resulta em um fenótipo misto (branco). A presença de dois alelos recessivos para ambos caracteres resulta em um fenótipo recessivo para ambos.

cia apenas um gene alternativo. O cruzamento de duas linhagens puras de plantas de flores vermelhas produz apenas descendência com flores vermelhas. Já o cruzamento de duas linhagens puras de plantas com flores brancas produz apenas descendência com flores brancas.

Poder-se-ia esperar que um cruzamento entre uma planta de linhagem pura de flores vermelhas e uma planta de linhagem pura de flores brancas produzisse uma descendência de flores cor-de-rosa ou uma mistura de flores vermelhas e brancas. Entretanto, Mendel encontrou que tal cruzamento produz somente descendência de flores vermelhas. Apesar de essa descendência híbrida dever ter recebido um gene diferente de cada indivíduo paterno, não ocorre a mistura de cor. Se, como Mendel raciocinou, um híbrido tem herdado uma cópia de um gene de cor diferente de cada indivíduo parental, então o gene para flores vermelhas (C, para cor) deve ser “dominante” sobre o gene para flores brancas (c). Quando Mendel cruzou duas plantas híbridas, plantas de flor branca reapareceram na geração seguinte. A partir disso, ele raciocinou que o caractere “recessivo” branco aparece apenas quando são herdadas duas cópias do gene recessivo (cc) – uma de cada indivíduo parental híbrido. Assim, ele relacionou a aparência externa de cada planta (fenótipo) com a sua constituição genética interna (genótipo).

Mendel concluiu que existia uma relação matemática consistente entre genótipo e fenótipo. Por exemplo, um cruzamento entre duas plantas híbridas com flores vermelhas produz três vezes mais plantas de flores vermelhas que plantas de flores brancas. Reproduzindo esse experimento com híbridos de cada um dos sete pares de caracteres distintos, resultou a famosa relação fenotípica de Mendel, de caracteres dominantes-para-recessivos de 3-para-1.

Quando Mendel propôs que os caracteres são determinados por um par de genes, ele apresentou um problema em potencial. Se os pais passam adiante ambas as cópias de um par de genes, então a descendência acaba com quatro genes de cada caractere. Essa duplicação do material genético iria continuar nas gerações seguintes. Mendel deduziu que cada indivíduo parental doa apenas a metade dos genes à sua descendência. Formulou a hipótese de que o número de genes é reduzido durante a gametogênese, assim que cada gameta (célula sexual) recebe uma cópia do par de genes. Durante a fertilização, os gametas masculinos e femininos se fundem para produzir um par de genes na descendência.

Em um cruzamento híbrido, a mistura de genes parentais resulta na descendência em três combinações genotípicas possíveis: CC, Cc e cc. O fenótipo dominante (flores vermelhas) é expresso quando duas cópias do gene estão presentes, CC. Flores vermelhas também resultam de genótipo misturado Cc, no qual o gene C domina o gene recessivo c. O fenótipo recessivo (flores brancas) é expresso somente pelo genótipo cc, no qual duas cópias do gene recessivo estão presentes.

Agora imagine seguir simultaneamente uma segunda característica, a posição da flor, onde flores axiais são dominantes (P, para posição) e flores terminais são recessivas (p). Dados dois pais híbridos com genótipo CcPp, Mendel mostrou que os genes para cada característica “segregam”, de modo que cada célula sexual contém somente um tipo. Assim, cada membro contrastante de um par de genes é igualmente provável de ocorrer nos gametas: C ou c e P ou p. Os genes para cada característica diferente “distribuem-se” nos gametas “independentemente” um do outro, tornando concebível qualquer combinação possível: CP, Cp, cP e cp. Esse cruzamento “di-híbrido” produz uma relação fenotípica de nove flores vermelhas/axiais: três flores vermelhas/terminais: três flores brancas/axiais: uma flor branca terminal (9:3:3:1).



Carl Correns

(Cortesia da American Philosophical Society, Curt Stern Papers.)



Hugo de Vries, ca. 1920

(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)

ONDE ESTÃO LOCALIZADOS OS GENES?

Embora Mendel tenha sido um contemporâneo de Darwin, seu trabalho permaneceu estagnado, tendo sido ignorado durante o início do século XX. Em 1900, o cientista holandês Hugo de Vries, o alemão Carl Correns e o austríaco Erich von Tschermak-Seysenegg redescobriram o artigo de Mendel e publicaram resultados de pesquisa que confirmaram o seu trabalho anterior. Hugo de Vries percebeu que os “fatores” de Mendel eram as mesmas entidades que ele chamou de “pangenes” e, em 1909, Wilhelm Johansson encurtou o termo para “gene”.

Historiadores ainda discutem as razões para este lapso de 35 anos para aceitação. Embora Mendel tenha publicado sua pesquisa em uma revista relativamente obscura, pelo menos 140 cópias circularam, sobretudo na Europa. Entretanto, sua noção abstrata dos genes não foi apreciada pelos naturalistas do seu tempo – eles tinham sido treinados para, em primeiro lugar, observar e categorizar coisas vivas. Claramente, Mendel estava adiante do seu tempo. Ele vislumbrou um processo de hereditariedade à frente de um contexto teórico mais amplo que poderia ser compreendido por outros cientistas brilhantes. Essa poderia ser muito bem a definição prática de gênio.

Existe pouca dúvida de que o trabalho de Jean-Baptiste de Lamarck, o cientista francês autodidata, confundiu seriamente o pensamento sobre a hereditariedade durante a maior parte do século XIX. Em seu livro *Système des Animaux sans Vertèbres* (Sistema dos Animais Invertebrados) (1800), afirmou que os organismos adquirem seus traços físicos em resposta a mudanças ambientais e que tais características são, então, herdadas pelas gerações sucessivas da descendência. Diante disso, a teoria da herança de caracteres adquiridos de Lamarck era consistente com a evolução e até Darwin a favoreceu. Contudo, para os reformadores sociais, o lamarckismo ofereceu uma alternativa mais promissora à aplicação cruel do darwinismo nas fábricas prósperas e nas manufaturas penosas da Europa. O darwinismo social justificava as duras condições de trabalho e de vida como um meio de seleção natural dos indivíduos mais fortes. O lamarckismo contrapunha que os bons ambientes acabavam produzindo boa herança, provendo uma racionalidade para o tratamento caridoso do pobre, do enfermo e do doente mental.

Nos anos de 1880, descobertas-chave na biologia celular e no comportamento dos cromossomos proveram um contexto físico para o entendimento do trabalho genético abstrato de Mendel. A teoria celular de Schleiden e Schwann havia sido estendida para o processo de fertilização – na qual células espermáticas e ovócitos fundem-se para dar origem a um zigoto. As anilinas, corantes subprodutos do carvão, revelaram cromossomos filamentosos no núcleo. Diferentes organismos evidenciaram dispor de um número distinto de cromossomos, sugerindo que os mesmos podem conter informações específicas para cada forma de vida. Em 1882, Walter Flemming descreveu o processo de mitose, a duplicação e o movimento de cromossomos que ocorre quando a célula divide-se para produzir duas células-filhas.

Durante os anos de 1883 a 1885, o médico alemão August Weismann proferiu uma série extraordinária de conferências na Universidade de Freiburg, contrapondo o lamarckismo, e proveu um mecanismo para a continuidade da herança pelas gerações. Ele concebeu uma distinção fundamental entre as células que compõem os tecidos do corpo, ou soma, e aquelas produzidas nos órgãos sexuais, as células germinativas. Weismann postulou que as células germinativas são apartadas no momento da concepção e permanecem separadas das células somáticas por toda a vida. Diferentemente das células somáticas, as células germinativas não são, em essencial, afetadas pelos fatores externos, tais como nutrição, danos e doenças. Seu conceito de “continuidade do plasma germinal” de imediato explicou como as informações hereditárias-chave, que definem as formas físicas “fixas” de espécies singulares de plantas e animais, foram passadas virtualmente imutáveis de geração à geração.



Jean-Baptiste de Lamarck,
ca. 1821

(Cortesia da Wellcome Institute Library, London.)



August Weismann

(Cortesia da National Library of Medicine.)



Theodor Boveri

(Cortesia da American Philosophical Society, Curt Stern Papers.)



Edmund Wilson, ca. 1925

(Cortesia da American Society of Zoologists.)



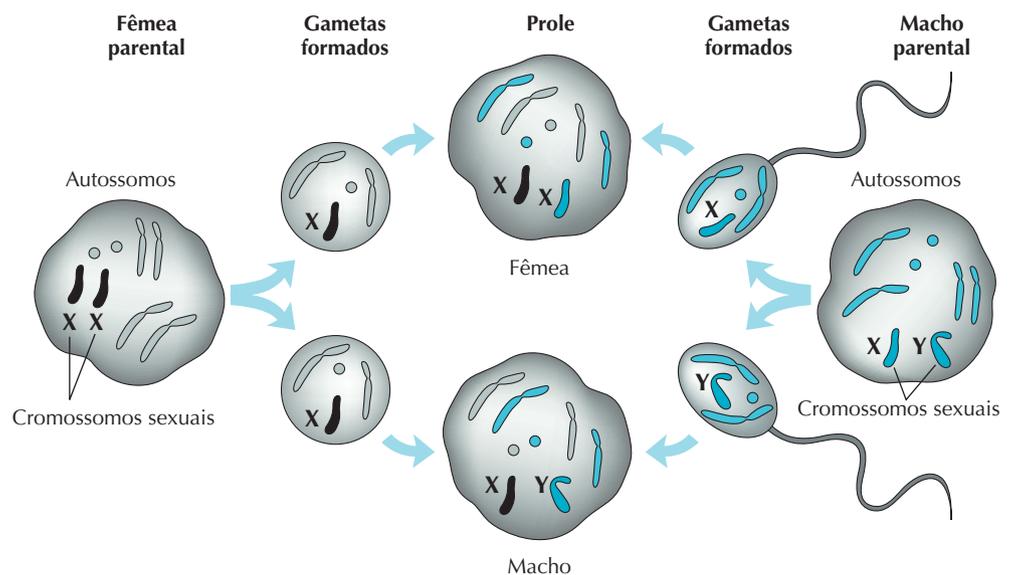
Nettie Stevens, ca. 1904

(Cortesia do Carnegie Institute de Washington.)

Com o mundo científico assim preparado, a genética aparentemente apareceu em cena de repente, formada por completo em 1900. Em 1902, o cientista alemão Theodor Boveri e Walter Sutton, um aluno da Universidade de Columbia, foram os primeiros a relacionar diretamente a hereditariedade ao comportamento do cromossomo, ou citologia. Boveri descobriu que os zigotos do ouriço-do-mar morrem ou se desenvolvem de maneira anormal quando um único óvulo foi fertilizado por dois espermatozoides. A fertilização de início resulta em três células-filhas que, então, se dividem de forma assimétrica, produzindo células com um conjunto incompleto de cromossomos. A análise dos movimentos do cromossomo durante a meiose, feita por Sutton no gafanhoto *Brachystola*, constituiu a base da teoria cromossomal da hereditariedade. Sutton mostrou que o material genético do gafanhoto consiste de 11 pares de cromossomos homólogos e que os gametas formados durante a meiose recebem apenas um cromossomo de cada par homólogo. Esse comportamento acompanha exatamente a segregação dos fatores hereditários de Mendel e sugere que os genes são fisicamente localizados nos cromossomos.

O comportamento dos cromossomos sexuais, descrito independentemente em 1905 por Nettie Stevens e Edmundo Wilson (orientador de Sutton na Universidade de Columbia), proveu a primeira evidência direta que dá suporte à teoria cromossomal da hereditariedade. Eles mostraram que o sexo é determinado por cromossomos independentes, X e Y. O caráter feminino é caracterizado por duas cópias do cromossomo X (XX) e o caráter masculino é determinado por uma cópia única de cada tipo de cromossomo (XY). Os movimentos dos cromossomos X e Y durante a formação do espermatozoide e do óvulo são exatamente como previstos pela genética mendeliana: cada óvulo recebe uma única cópia de um cromossomo X; cada espermatozoide recebe ou um cromossomo X ou um Y.

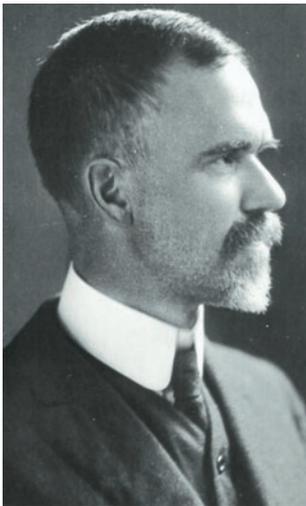
Evidências de que outras características, além da determinação do sexo, estão localizadas nos cromossomos emergiram durante a segunda década do século XX. Durante esse período, Thomas Hunt Morgan e seu grupo de brilhantes alunos – Alfred



Segregação dos cromossomos X e Y na *Drosophila*

Sturtevant, Calvin Bridges e Hermann Muller – estabeleceram as bases intelectuais da genética moderna. Eles também estabeleceram a *Drosophila melanogaster*, a comum mosca-das-frutas, como o organismo de escolha para a pesquisa genética. O pequeno laboratório de Morgan, no departamento de Zoologia da Universidade de Columbia tornou-se conhecido simplesmente como a Sala das Moscas.

QUAL A CONEXÃO ENTRE EVOLUÇÃO E GENÉTICA?



Charles Davenport, ca. 1919
(Cortesia da National Library of Medicine.)

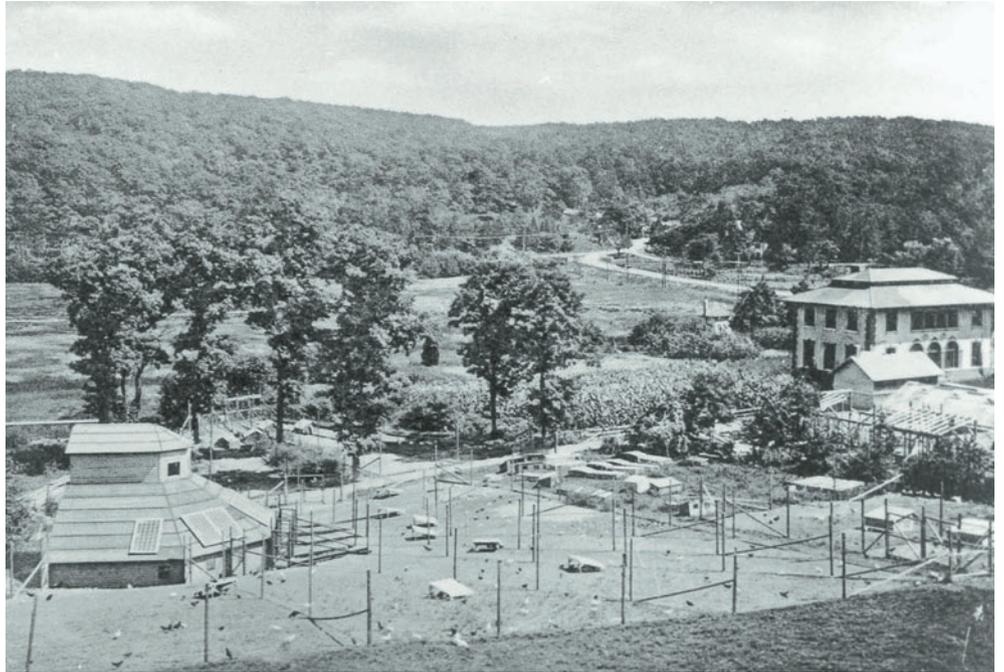
A citologia foi uma trilha clara para a genética na virada do século XX e a evolução foi outra. Embora a conexão entre a teoria da evolução e a teoria genética faça sentido para o estudante de biologia, a transferência direta de idéias ocorreu durante um momento curto e pouco conhecido da história da biologia moderna. Esse momento – quando a natureza do processo da hereditariedade foi focalizado pela primeira vez do nível das populações para o organismo individual – é mais bem captado como o antecessor do atual Cold Spring Harbor Laboratory.

Dois anos antes da redescoberta do trabalho de Mendel, o biologista treinado em Harvard, Charles Davenport, assumiu a direção do Laboratório de Biologia em Cold Spring Harbor, um “campo de verão” avançado, embora tivesse algo de modorrento, para o estudo da evolução. Fundado em 1890, o Laboratório de Biologia seguiu as pegadas do Laboratório de Biologia Marinha fundado em Woods Hole, Massachusetts, em 1888. Ambos tinham sido instalados na tradição das estações biológicas marinhas fundadas ao longo da costa europeia, em seguida à publicação da obra de Darwin *Origin Species* (Origem das Espécies). A intersecção de terra e água era considerada o lugar ideal para estudar como os organismos evoluíram e se adaptaram para ocupar uma grande variedade de nichos aquáticos, semi-aquáticos e terrestres. Os biólogos que ocuparam essas estações de estudo a campo estavam muito contentes em observar os resultados da evolução no mundo natural. Muitos se tornaram especialmente interessados nas interações dinâmicas entre os organismos e o seu ambiente, assim, constituindo a primeira geração de ecologistas.

Embora Davenport tivesse sido treinado nos métodos clássicos de observação da zoologia e da morfologia comparada, ele se tornou interessado no novo movimento que procurou recriar a evolução diretamente no laboratório. Ele e um número crescente de biólogos acreditavam que experimentos de cruzamentos controlados com plantas e animais iriam resultar em um novo entendimento do processo evolucionário. Davenport conseguiu ser ouvido no Conselho da Carnegie Institution de Washington, uma das diversas organizações filantrópicas formadas sob o testamento de Andrew Carnegie. Dessas, Davenport teve garantidos os fundos para instalar em Cold Spring Harbor uma Estação para a Evolução Experimental.

A dedicação do primeiro prédio da Station, em 1904, ofereceu uma antecipação acerca do futuro da evolução experimental – a palestra de inauguração foi ministrada por Hugo de Vries, um dos três investigadores que tinham recém-redescoberto o trabalho pioneiro de Mendel. Davenport povoou a Station com pesquisadores de pensamento afinado, os quais fizeram das plantas agrícolas e dos animais seus objetos de pesquisa.

A Estação tomou a forma de aviários, estábulos de cabras, gatis de Manx, viveiro de canários e plantações de milho e estramônio. Muitos dos pesquisadores da Station for Experimental Evolution abraçaram as leis de Mendel e as notações popularizadas por Reginald Punnet como um meio de acompanhar as características por meio dos cruzamentos experimentais. Para muitos, a um tempo, os emaranhados da genética consubstanciaram os estudos experimentais da evolução e, em 1920, a Station for Experimental Evolution foi discretamente rebatizada como Carnegie Department of Genetic. Assim, os evolucionistas experimentais se tornaram a primeira geração de geneticistas.



Aviários na Estação para Evolução Experimental, ca. de 1910

(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)

SÃO OS GENES ENTIDADES FÍSICAS?

Thomas Hunt Morgan teria se incluído no campo dos evolucionistas experimentais. Ele, como muitos outros, estava interessado em testar se as variações que resultavam em novas espécies aconteciam de maneira gradual ou ocorriam em surtos abruptos e arrancadas – o ainda persistente problema contencioso da evolução gradual *versus* evolução pontuada. Trabalhando em Nova York, Morgan não dispunha do espaço para cultivar as plantas e os animais domésticos preferidos por muitos evolucionistas experimentais. Ele escolheu a mosca-das-frutas – *Drosophila melanogaster* – como seu modelo experimental, devido à sua geração curta, sua prole numerosa e sua facilidade de cultivo. Ademais, ele não dispunha de recursos suficientes e de instalações para manter organismos superiores, como camundongos. O aparecimento de uma única mosca de olhos brancos no laboratório de Morgan, na primavera de 1910, foi claramente um golpe de sorte – moscas-das-frutas selvagens têm olhos vermelhos. Por sorte, Calvin Bridges, então um aluno de graduação, deu-se conta da importância potencial do achado e preservou aquela mosca singular. A variante de olhos brancos poderia ter sido considerada como apenas uma diminuta etapa evolucionária não-adaptativa. No entanto, ela se tornou a pedra angular sobre a qual as heranças mendelianas, cromossômica e sexual foram construídas como um todo coeso. A mosca macho de olhos brancos também estabeleceu para sempre a importância das mutações observáveis ou as variações da norma como o ponto de partida para a análise genética.

A mosca macho de olhos brancos foi cruzada com suas irmãs de olhos vermelhos, e o aparecimento das características foi seguido através de diversas e sucessivas gerações. A análise mendeliana revelou que, em muitos tipos de cruzamento, olhos brancos apareceram apenas em machos. O grupo de Morgan mostrou que olhos brancos (assim como alguns tipos de calvície e hemofilia em humanos) são uma característica recessiva ligada ao sexo. Em assim fazendo, o gene para a cor dos olhos foi localizado no cromossomo X.



A Sala das Moscas na Columbia University, ca. 1920

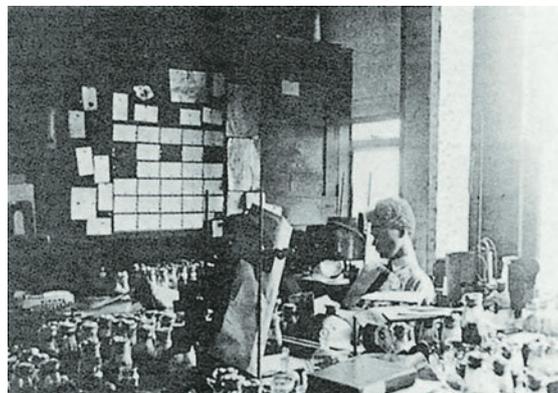
Note as bananas utilizadas como alimento para as moscas. Essa sala não existe mais na Columbia University. (Cortesia da American Philosophical Society, Curt Stern Papers.)



Thomas Hunt Morgan, ca. 1917
(Cortesia da American Society of Zoologists.)

Durante a década seguinte, Morgan e seus discípulos identificaram numerosas outras mutações em *Drosophila* e as usaram para expandir a descrição física e cromossômica da hereditariedade. Ainda cedo, eles mostraram que certos genes são “ligados” ou herdados juntos, como se eles fossem uma única unidade física. Todos os genes repartiam-se em quatro grupos de ligação, que correspondem ao número de cromossomos de *Drosophila* vistos ao microscópio.

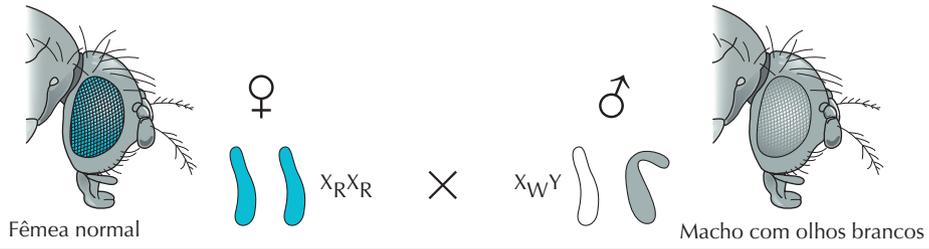
O citologista belga F. A. Janssens descobriu que, no início da meiose, os cromossomos homólogos se entrelaçam e trocam pedaços. Esse processo mais tarde tornou-se conhecido como *crossing over*. Morgan deu-se conta de que o *crossing over* podia prover uma medida da distância relativa entre dois genes. Enquanto os genes estreitamente ligados iriam raramente se separar no *crossing over*, os genes que se localizavam distanciados em geral seriam separados. Assim, quanto menor a frequência de *crossover* entre dois genes, mais próximos eles estariam no cromossomo. Alfred Sturtevant forneceu a prova desse conceito na sua pesquisa de doutorado, no qual ele usou os dados de *linkage* para construir o primeiro mapa genético do cromossomo.



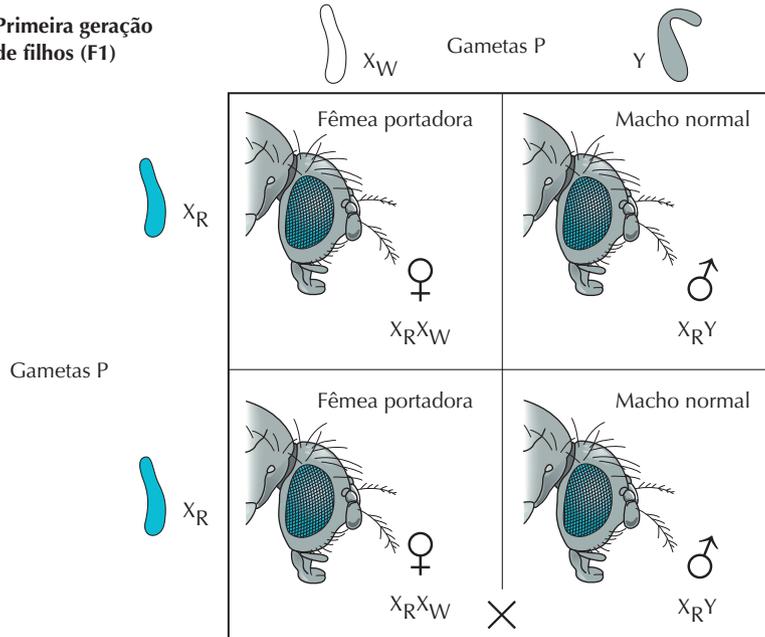
Calvin Bridges, ca. 1926

(Cortesia da American Society of Zoologists.)

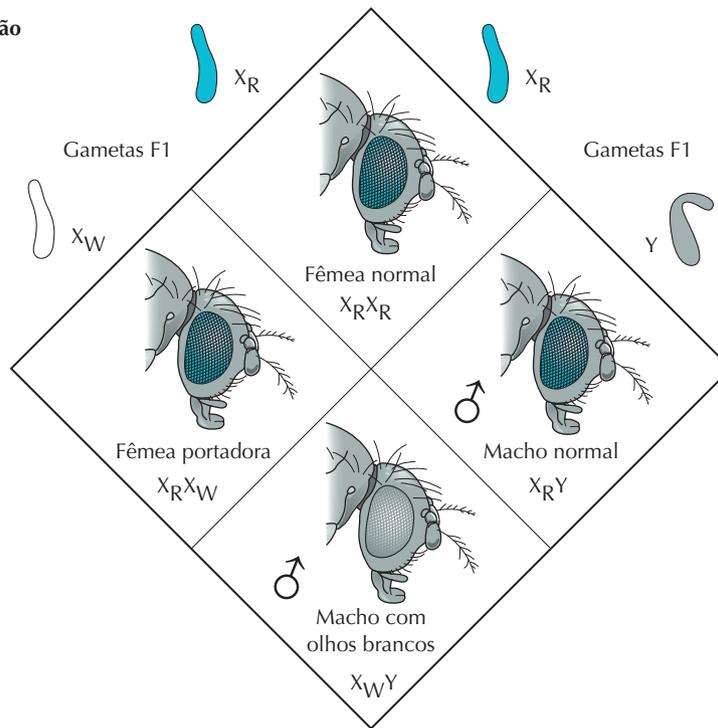
Geração paternal (P)



Primeira geração de filhos (F1)



Segunda geração de filhos (F2)



Herança dos olhos brancos ligada ao sexo em *Drosophila*



Alfred Sturtevant

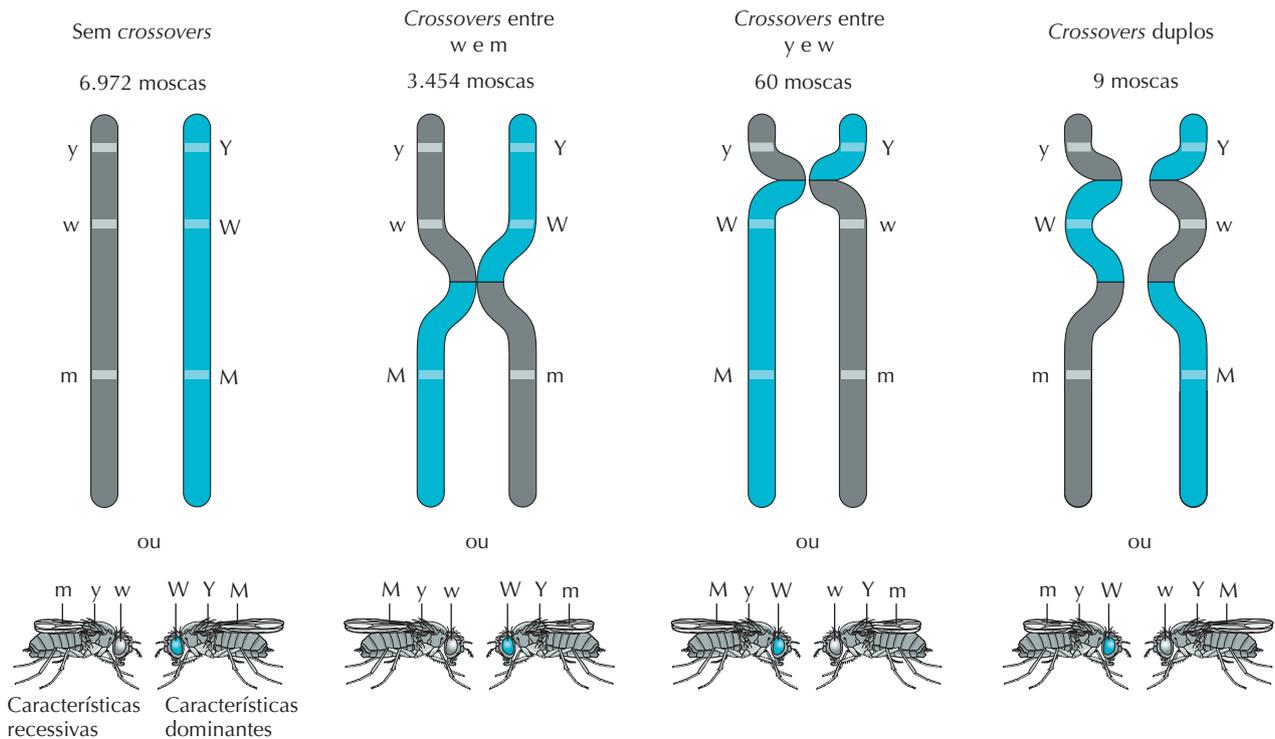
(Cortesia da American Philosophical Society, Curt Stern Papers.)

Não foi antes de 1931, entretanto, que Barbara McClintock e Harriet Creighton obtiveram provas citológicas de que a herança de uma nova combinação de genes durante o *crossing over* é devido a um intercâmbio físico de um segmento cromossômico específico. A chave para os seus experimentos foi uma linhagem de milho, cujo cromossomo 9 continha uma protuberância arredondada peculiar, composta de uma



Barbara McClintock (esquerda) e Harriet Creighton (direita) em um encontro no Cold Spring Harbor

(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)



Experimento de *linkage* de Sturtevant em *Drosophila*, em 1913

Sturtevant examinou a herança ligada ao X de três características recessivas: corpo amarelo (*y*), olhos brancos (*w*) e asas em miniatura (*m*). Ele cruzou machos recessivos (*y,w,m*) com fêmeas heterozigóticas que têm os genes recessivos em um dos cromossomo X (*y,w,m*) e os genes dominantes no outro (*Y,X,M*). Como um pai macho pode apenas passar adiante genes recessivos do seu único cromossomo X, os fenótipos tanto dos descendentes machos quanto das fêmeas são completamente decorrentes da herança dos cromossomos X maternos. A análise mendeliana prediz que todos dos 10.495 descendentes do experimento de Sturtevant iriam apresentar um fenótipo puramente dominante, corpo/cor dos olhos/asas normais, ou um fenótipo puramente recessivo, corpo amarelo/olhos vermelhos/asas em miniatura. Entretanto, os descendentes herdaram várias misturas de características dominantes e recessivas. Sturtevant deduziu que os fenótipos misturados eram causados por alterações genéticas entre os dois cromossomos X de uma fêmea durante a formação dos gametas. A frequência de alterações é uma medida da distância entre dois genes localizados no mesmo cromossomo.

heterocromatina tipo a do centrômero, que tornava fácil distingui-la no microscópio óptico. Essa linhagem foi construída para carregar os alelos dominantes de diversas características visíveis e então cruzá-los contra um estoque de cromossomos não-marcados, dotados unicamente de alelos recessivos. Os *crossovers* entre cromossomos marcados e não-marcados produziram prole com fenótipos mistos, dominante e recessivo. O exame microscópico mostrou que a protuberância marcada sempre acompanhou os fenótipos dominantes. Nesse mesmo ano, Curt Stern, na Universidade de Berlim, relatou o uso de uma abordagem semelhante para estudar o cromossomo X da *Drosophila*.

QUAL É A TAREFA DE UM GENE?

Durante os primeiros 40 anos da genética, o gene foi apenas um conceito, cuja verdadeira identidade foi envolvida em mistério. Genes eram conhecidos por sua manifestação externa como características visíveis. Nada era conhecido acerca da sua função na vida bioquímica de um organismo.



Archibald Garrod, ca. 1910
(De *Genetics: a periodical record of investigations bearing on heredity and variation* 56: frontispiece, 1967.)



Edward Tatum, 1965
(Cortesia de Rockefeller Archive Center.)



George W. Beadle, ca. 1940
(Cortesia da Stanford University News Service.)

O médico britânico Sir Archibald Garrod propôs, em 1908, que algumas doenças humanas eram “erros inatos do metabolismo” que resultam da falta de uma enzima específica necessária para realizar uma reação bioquímica. Ele especulou que a falta de uma função enzimática resultava de um gene defeituoso, herdado no nascimento. Levaria mais de 30 anos para provar-se tal hipótese profética, pois ela não podia ser testada com seriedade pelos geneticistas da época. Os sistemas experimentais que eles usavam – sobretudo moscas-de-frutas, camundongos, plantas e animais domésticos – eram todos muito evoluídos, organismos multicelulares. Eles eram complexos em demasia, como modelos, para lançar luz na conexão entre os genes e a bioquímica celular.

Foram George Beadle e Edward Tatum, na Universidade de Stanford, que por fim introduziram um fungo como o primeiro modelo genético no qual foi possível estudar o metabolismo. O mofo vermelho do pão, *Neurospora*, pode sobreviver em meio mínimo, contendo apenas sacarose, sais inorgânicos e a vitamina biotina. Beadle e Tatum raciocinaram que ele deveria, portanto, possuir um número de enzimas específicas que convertem metabolicamente tais nutrientes (mais água e oxigênio) em aminoácidos, vitaminas e em todas as outras moléculas complexas necessárias para a vida.

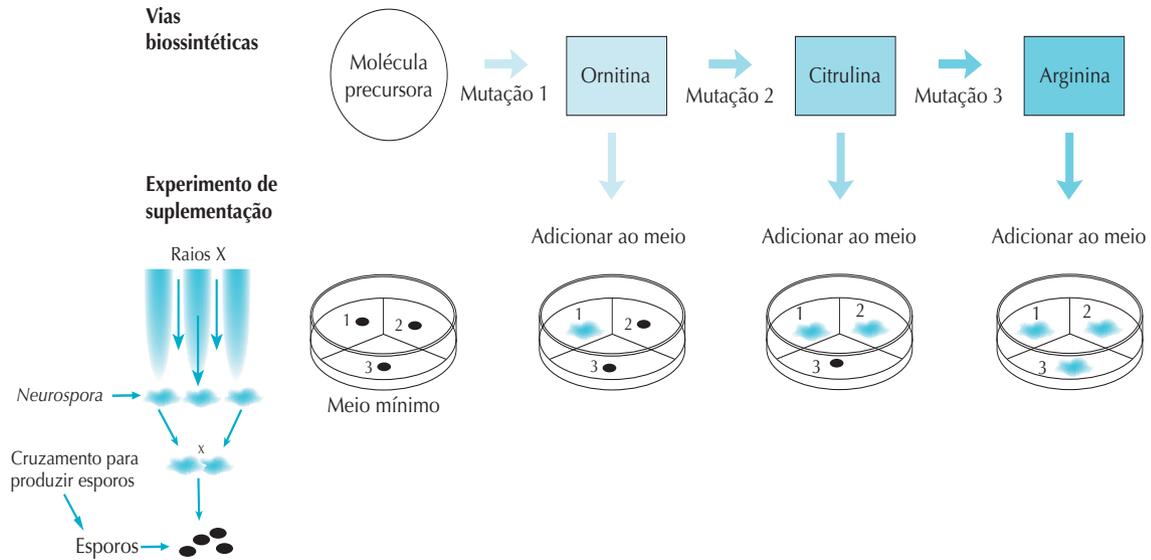
Eles formularam a hipótese de que se pudessem induzir uma mutação em um gene que produz uma dessas enzimas, isso seria letal para o mofo. Então, empregaram a poderosa ferramenta genética que tinha sido introduzida em 1927, quando Hermann Muller (então na Universidade do Texas) mostrou que mutações podem ser geradas à vontade por meio da irradiação de organismos com raios X. O desenho experimental engenhoso de Beadle e Tatum os permitiu selecionar mutações induzidas por raios X que seriam letais em circunstâncias normais.

Primeiro, irradiaram *Neurospora* com raios X e os cruzaram para produzir esporos; então, examinaram o crescimento dos esporos em meio mínimo. Os esporos que não cresceram em meio mínimo eram, por sua vez, testados em vários tipos de meios, cada um contendo um único suplemento nutricional. Depois de 298 esporos examinados, um cresceu apenas quando suplementado com vitamina B6. Assim, a irradiação mudou um gene que produz uma enzima necessária para a sua síntese. Inúmeras mutações metabólicas para outras vitaminas e aminoácidos essenciais foram encontradas. Além disso, foram isoladas múltiplas cepas mutantes que falharam em produzir o aminoácido arginina. Beadle e Tatum observaram que cada cepa mutante não tinha uma determinada enzima em diferentes pontos ao longo da via de síntese da arginina.

O trabalho de Beadle e Tatum publicado em 1941 introduziu o conceito que os genes medeiam a química celular pela produção de enzimas específicas. A hipótese essencial de Garrod, agora diretamente estabelecida como “um gene/uma enzima”, foi confirmada. (É melhor ampliar esse provérbio lendo “um gene/uma proteína”.) Seus experimentos também apontaram para as vantagens dos microrganismos como sistemas modelo. Utilizando seu método de semeadura sobre meio seletivo, tornou-se possível identificar os eventos genéticos extremamente raros, como um mutante bioquímico em um milhão.

QUE MOLÉCULA É O MATERIAL GENÉTICO?

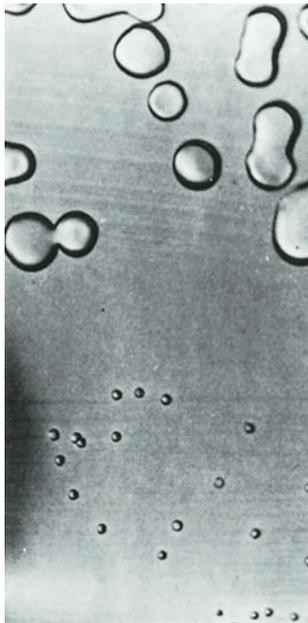
Em uma série de experimentos com *Diplococcus pneumoniae*, a bactéria com forma de bola que causa a pneumonia, o microbiologista inglês Fred Griffith descobriu o sistema-modelo que forneceu a chave para responder a próxima questão no desenvolvimento da biologia molecular. Duas cepas da bactéria pneumococos que ocor-



Experimento “um gene/uma enzima” de Beadle e Tatum, em 1941

Depois da irradiação, os esporos de *Neurospora* que não germinaram no meio mínimo são selecionados, seqüencialmente, pelo crescimento em meio suplementado com três nutrientes na via da biossíntese da arginina. O padrão de suplementação para os esporos 1, 2 e 3 indica mutações nos genes para enzimas em pontos correspondentes na via.

rem naturalmente têm propriedades diferentes marcantes. A cepa lisa (S) virulenta possui uma cápsula polissacarídica lisa que é essencial para infecção. A cepa rugosa (R) não-virulenta não tem essa cápsula externa, dando à sua superfície a aparência rugosa.



Colônias do pneumococo rugoso (embaixo) e liso

(Reimpresa, com permissão, de Avery et al. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal type. *J. Exp. Med.* 79: 137-158; ©The Rockefeller University Press.)

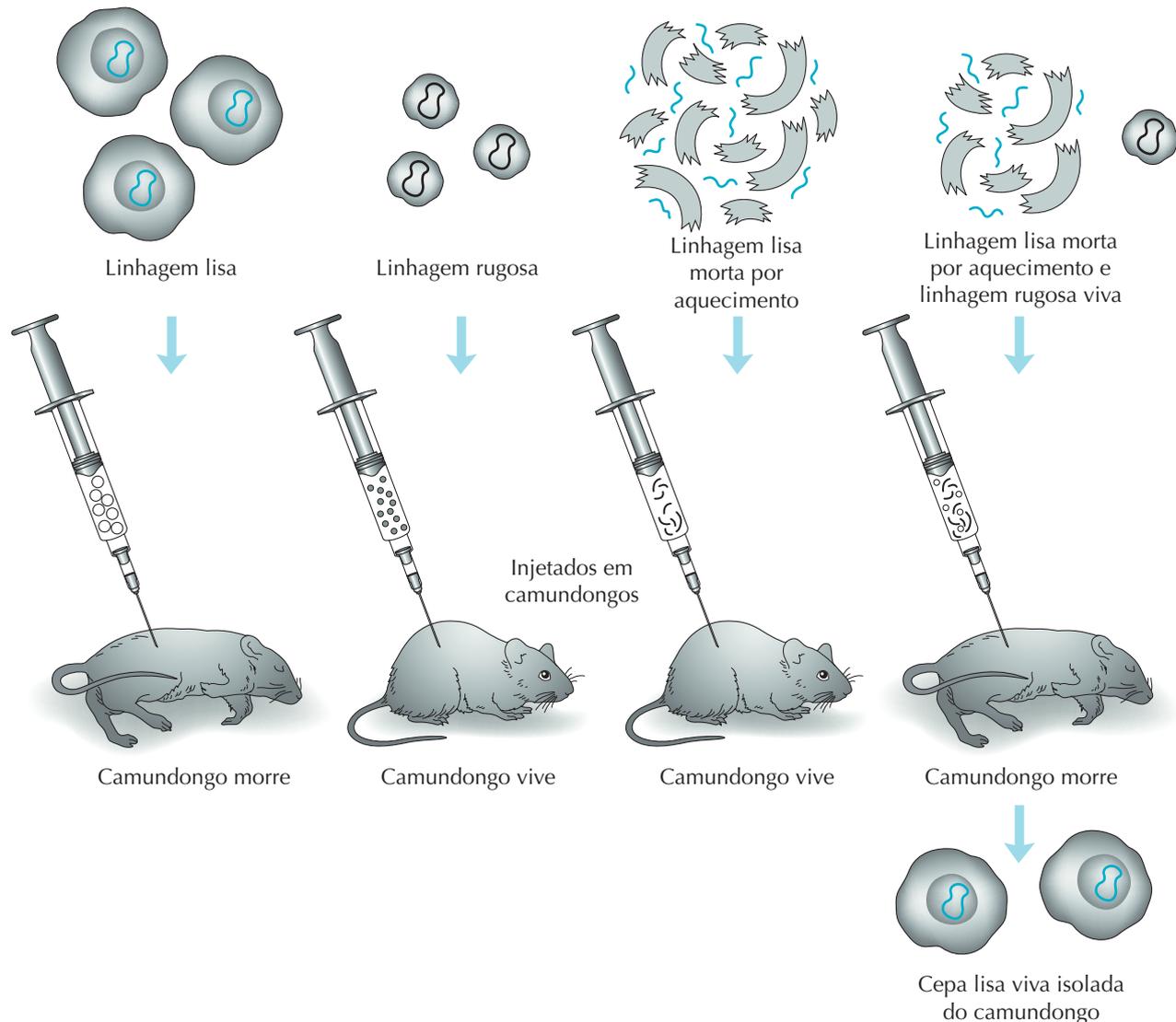


Oswald Avery (no centro à frente) e associados, 1932

(Cortesia do Rockefeller Archive Center.)

Após a injeção com a cepa S, o camundongo morre de pneumonia em alguns dias. Embora nem a cepa R viva nem a cepa S morta por calor causem a doença quando injetadas sozinhas, Griffith ficou surpreso ao observar que a co-injeção das duas produzia uma infecção letal. Além disso, ele foi capaz de resgatar a bactéria da cepa S virulenta a partir do camundongo infectado com essa mistura de bactérias. Por meio de alguns processos desconhecidos, a cepa R inócua transformou-se em uma cepa S infectiva. Griffith apresentou tal hipótese em 1928: algum “princípio” transferido da cepa S morta converteu a cepa R em virulenta, pela sua capacidade de sintetizar uma nova cobertura polissacarídica.

Durante a próxima década e meia, o “princípio transformante” foi seriamente perseguido por um time de pesquisadores encabeçado por Oswald T. Avery no Rockefeller Institute. Entre 1930 e 1933, eles conseguiram realizar a transformação fora do corpo de um camundongo com vida. Eles observaram microscopicamente a formação de coberturas polissacarídicas no pneumococo R quando a bactéria cultivada era tratada com extratos purificados a partir da cepa S morta por calor. Col-



Experimento de transformação de Griffith com cepas de pneumococo liso e rugoso, 1928



Maclyn McCarty, ca. 1936
(Cortesia do Rockefeller Archive Center.)



Phoebus Levene, ca. 1915
(Cortesia do Rockefeller Archive Center.)

lin MacLeod, recém-chegado ao laboratório de Avery, mostrou que um extrato contendo apenas a cobertura de polissacarídeos não podia transformar as cepas R, refutando a crença de que a cobertura por si só era passada entre as cepas durante a transformação.

Em 1944, Avery, MacLeod e Maclyn McCarty reportaram que eles haviam purificado o princípio transformante. A análise da sua composição molecular e de peso indicaram que a sua fração altamente ativa era principalmente DNA. Vários testes com enzimas foram conclusivos. A atividade transformante não foi afetada pelo tratamento com tripsina e quimiotripsina (que digerem proteína) e ribonucleases (Rnase, que digere RNA). No entanto, a deoxirribonuclease (Dnase) destruiu toda a atividade transformante. O trabalho foi meticuloso e a interpretação de Avery clara: “a substância indutora foi comparada a um gene e o antígeno da cápsula que é produzido em resposta a ele foi considerado como um produto do gene”. Assim, o gene é composto de DNA. (Em retrospecto, sabe-se agora que a síntese do antígeno capsular requer vários genes, não apenas um, como originalmente implícito por Avery).

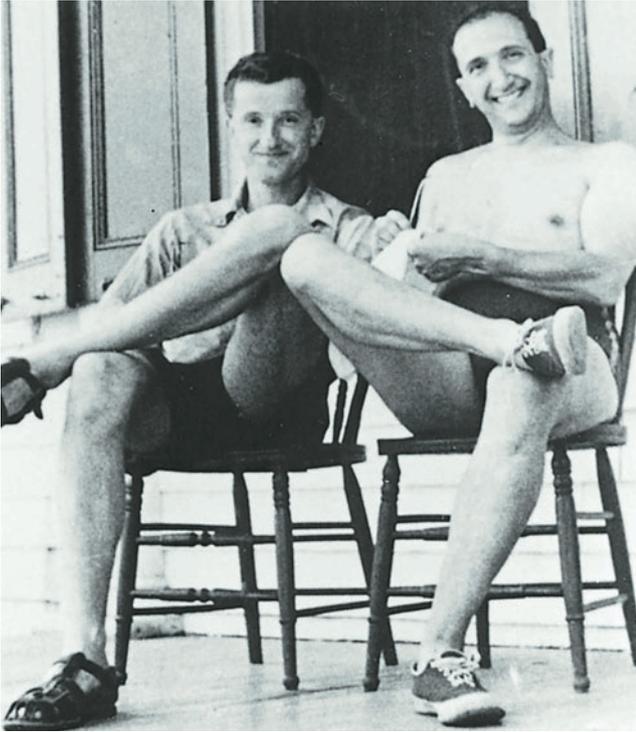
O trabalho de Avery deveria ter focalizado a atenção imediatamente no DNA, como a molécula da hereditariedade, mas ele não o fez. Conforme vários avanços científicos, tais conclusões não combinaram facilmente com o dogma predominante – no caso, a crença sobre a “inteligência” relativa de uma proteína *versus* a molécula de DNA. Concordeu-se que a molécula que funciona como o carregador da hereditariedade deve ter a capacidade para armazenar, presumivelmente na sua estrutura molecular, imensas quantidades de informação genética. Quando comparado com proteína, o DNA não parecia ser uma molécula muito inteligente.

Se a informação genética estava ligada a uma linguagem, então a linguagem do DNA parecia pobre quando comparada a da proteína. Em um nível básico, o alfabeto das proteínas possui 20 letras (os aminoácidos), enquanto que o DNA tem apenas quatro (os nucleotídeos). Em vista disso, o DNA tem um poder de combinação mais limitado – sua linguagem tem menos palavras possíveis. (É claro que isso foi antes de se saber o quão bem um computador pode funcionar com uma linguagem de duas letras.) Ademais, os aminoácidos eram conhecidos por se articularem em uma diversidade inacreditável de moléculas protéicas grandes e complexas que realizavam inúmeras funções celulares importantes, tanto como enzimas quanto como elementos estruturais. Nenhuma função óbvia para o DNA tinha ainda sido descoberta.

Embora se soubesse que o DNA era uma molécula muito grande, pensava-se que ele era um polímero repetitivo incapaz de codificar para informações. Essa interpretação foi em grande parte o legado da “hipótese do tetranucleotídeo”, proposta por Phoebus Levene no Rockefeller Institute. Como químico, Levene foi influenciado pelo triunfo da química dos polímeros, que produziu materiais maravilhosos como o poliacetato e o poliestireno. Conforme o DNA, esses polímeros sintéticos eram compostos de pequenas subunidades montadas em cadeias muito longas. Assim, não é difícil de ver porque Levene assumiu que o DNA também era um polímero normal no qual cada nucleotídeo seguia um outro em um padrão monótono, que não se altera.

O senso comum e a influência lenta de Levene preveniram, assim, vários cientistas de adotar a conclusão de Avery durante a melhor parte de uma década. Eles não podiam acreditar que esse princípio transformante purificado tinha sido completamente limpo de proteínas. O DNA poderia ser apenas o tablado ao qual estão ligados traços do verdadeiro princípio transformante – uma pequena quantidade de proteína que escapou da digestão enzimática.

Quando a Segunda Guerra Mundial aproximava-se do fim, um grupo de cientistas extraordinários uniu-se em torno de três homens que foram os principais responsáveis por buscarem até a essência as bases físicas da hereditariedade: Max Delbrück,



Max Delbrück (esquerda) e Salvador Luria

Com a pesquisa, em 1953, a camaradagem entre os membros do American Phage Group, que se reuniam a cada verão no Cold Spring Harbor, em Nova York. (Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)



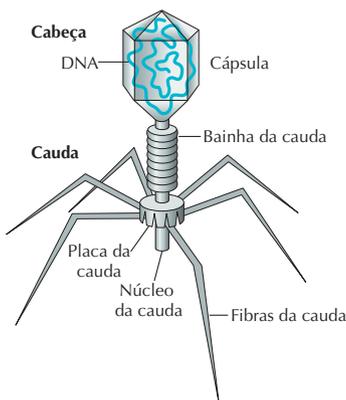
Seymour Benzer corta o cabelo de Max Delbrück

um alemão que trabalhara na Universidade de Vanderbilt; Salvador Luria, um italiano que trabalhara na Universidade de Indiana (ambos escaparam da Europa nazista para os Estados Unidos) e Alfred Hershey, um americano que trabalhava no Carnegie Institution's Department of Genetics at Cold Spring Harbor, em Nova York.

O objeto de pesquisa constituía-se um grupo de minúsculos vírus bacterianos, chamados de bacteriófagos (ou simplesmente, fagos). Era sabido que durante a infecção, partículas de fagos reproduziam-se dentro da célula bacteriana, que se rompe para liberar uma nova geração de vírus. Delbrück, Luria e Hershey argumentaram que a interação genética entre a bactéria e os parasitas virais poderia fornecer um modelo idêntico para estudar o mecanismo de hereditariedade.

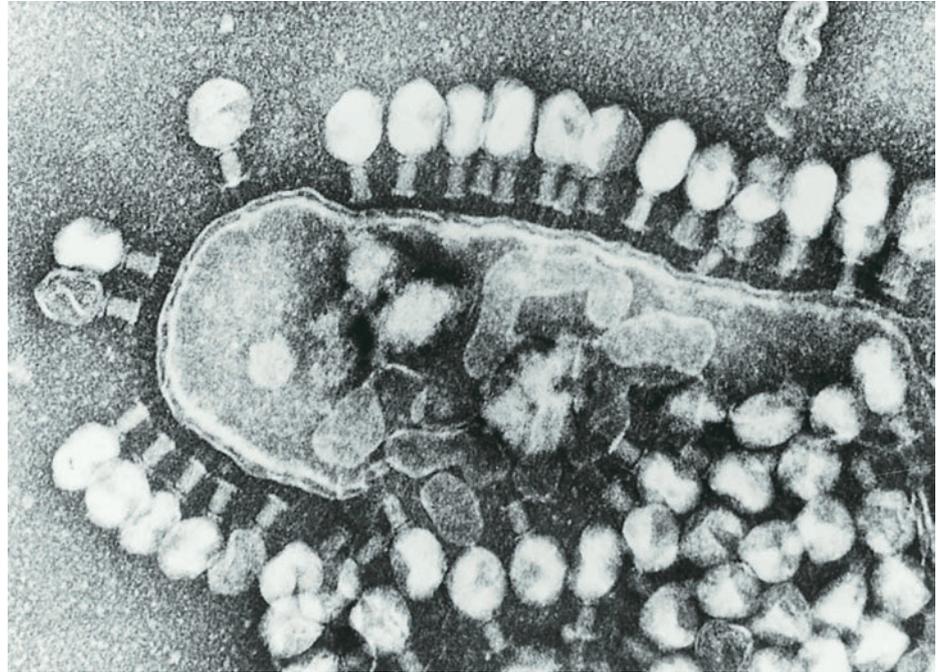
Embora os bacteriófagos tenham sido descobertos em 1917 por um canadense, Felix d'Hérelle, Delbrück e Luria foram os primeiros a planejar métodos quantitativos para estudar o ciclo de vida do fago. A chave entre eles foi o "crescimento em uma etapa" assegurando que todas as viroses iniciam o ciclo de infecção ao mesmo tempo. Essa sincronia foi essencial para estudar organismos tão pequenos, que não podiam ser estudados individualmente.

Em 1945, Delbrück organizou um curso no Cold Spring Harbor Laboratory para introduzir pesquisadores nos métodos que ele e Luria haviam desenvolvido. Vários historiadores consideram o curso dos fagos como a vertente intelectual da biologia molecular, por colocar em contato um grupo cada vez maior de cientistas, tanto das ciências biológicas quanto das físicas, que iriam elaborar com muito esforço os mecanismos moleculares da hereditariedade. O curso dos fagos, ensinado no Cold Spring Harbor durante 26 anos consecutivos, era uma base de treinamento para as primeiras duas gerações de biólogos moleculares.



Bacteriófago

A partícula do fago é basicamente uma cápsula de proteína envolvendo um centro de DNA.



O bacteriófago T4 infectando uma única célula de *E. coli*

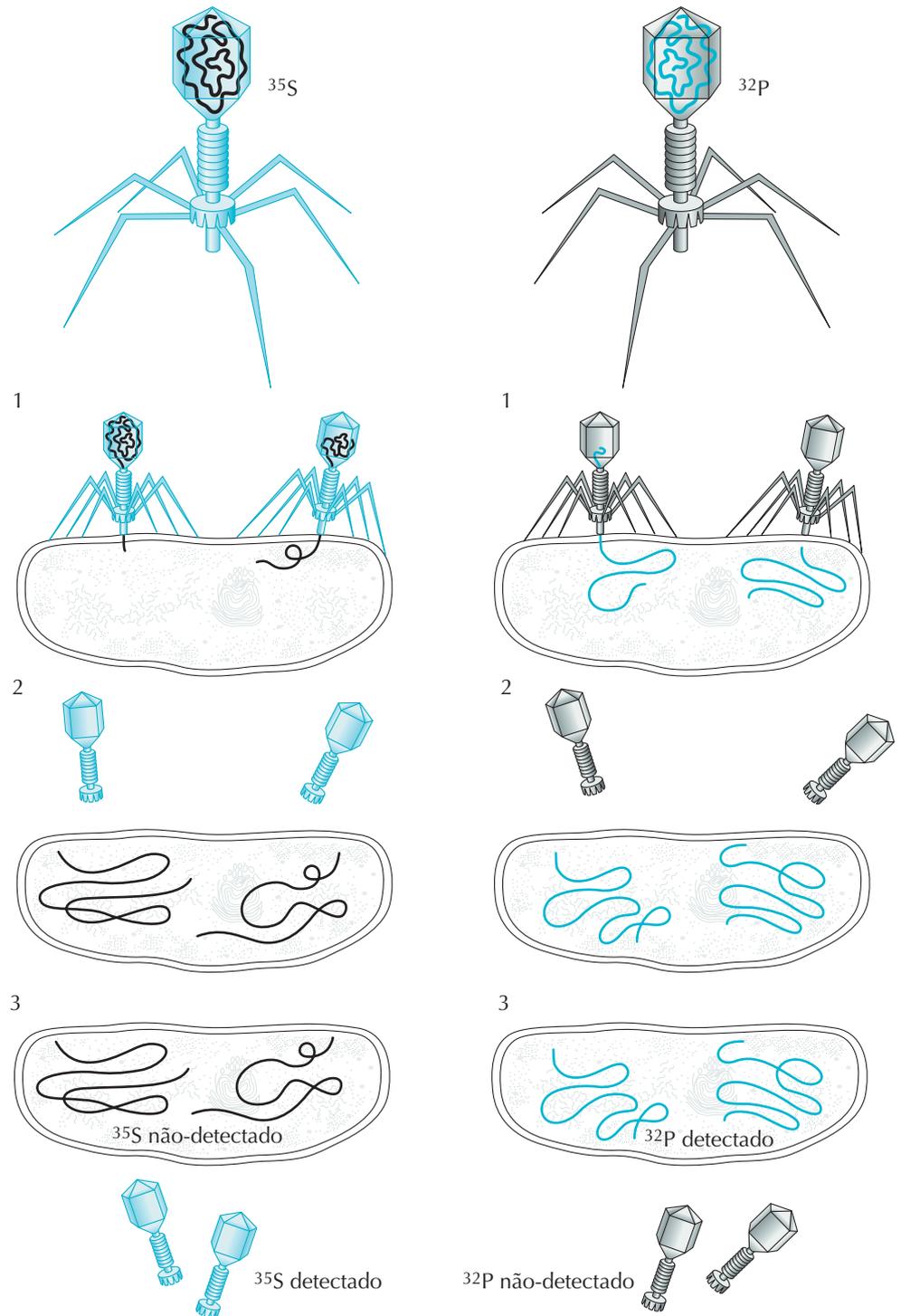
A reprodução de vírus bacterianas dentro de *E. coli* forneceu um modelo simples para estudar a base molecular da hereditariedade. (Cortesia de Lee D. Simon, Photo Researchers, Inc.)

Fora da pesquisa com os fagos, veio a prova final de que o DNA é a molécula da hereditariedade. O experimento do liquidificador, realizado por Alfred Hershey e sua assistente Martha Chase, em 1952, focalizou a atenção no DNA de uma maneira que os experimentos de Avery não haviam feito. Seu experimento, embora considerado como bioquimicamente sujo, tornou mais clara a conexão entre o DNA e a hereditariedade.



Martha Chase e Alfred Hershey, 1953

(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)



O experimento do liquidificador de Hershey-Chase, 1952

Foram realizados experimentos lado a lado com culturas separadas de fagos nos quais ou a cápsula protéica era marcada com enxofre radioativo (^{35}S) ou o centro de DNA era marcado com fósforo radioativo (^{32}P). (1) Foi permitido que os fagos marcados radioativamente infectassem as bactérias. (2) A agitação em um liquidificador desalojou as partículas de fagos das células bacterianas. (3) A centrifugação sedimentou as células, separando-as das partículas dos fagos deixadas no sobrenadante. O enxofre radioativo ficou predominantemente no sobrenadante. O fósforo radioativo foi encontrado em maior quantidade na fração da célula, da qual se origina uma nova geração de fagos infectivos.



Liquidificador WARING utilizado no experimento de Hershey-Chase

O projeto experimental tomou vantagem da única estrutura do bacteriófago, na qual uma cápsula externa de proteína envolve um centro interno de DNA. Nenhum outro organismo até agora descoberto foi tão perfeitamente projetado para assentar o debate proteína *versus* DNA. Também chave para o experimento foram os isótopos radioativos, que estavam recém disponíveis após a Segunda Guerra Mundial. “Marcadores” radioativos permitiram seguir o destino da proteína e do DNA durante a replicação do bacteriófago.

Hershey e Chase executaram experimentos paralelos com duas populações de fagos – uma na qual a cápsula de proteína foi marcada com enxofre radioativo (^{35}S) e a outra na qual o DNA foi marcado com fósforo radioativo (^{32}P). Foi permitido que os fagos marcados radioativamente infectassem culturas de bactérias. As culturas foram então resfriadas para interromper o crescimento e agitadas durante vários minutos em um liquidificador que desprendia as partículas do fago das células bacterianas. As culturas foram centrifugadas a uma velocidade rápida o suficiente para sedimentar as células bacterianas no fundo do tubo, deixando as partículas menores do fago no sobrenadante. O sedimento de células e o sobrenadante foram, então, analisados para a presença de proteínas ou DNA do fago, marcados radioativamente. Hershey forneceu a seguinte sinopse dos resultados em uma publicação, mais tarde:

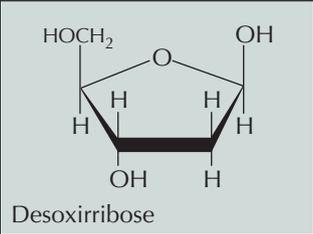
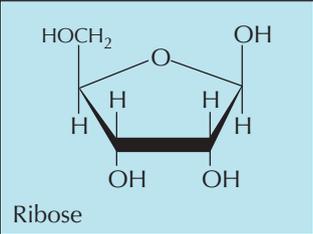
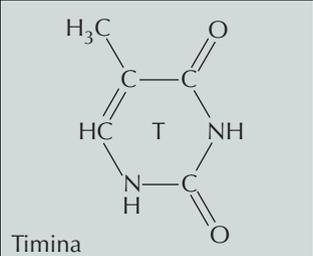
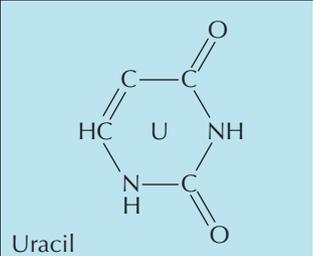
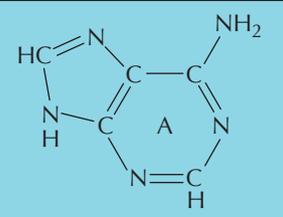
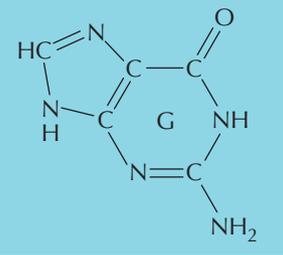
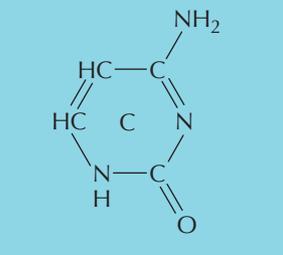
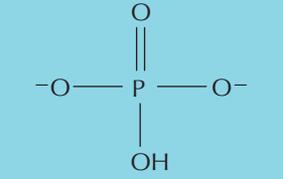
- a maioria do DNA do fago permanece com as células bacterianas;
- a maioria da proteína do fago é encontrada no fluido sobrenadante;
- a maioria das bactérias infectadas (no sedimento de células) permanece, no início, competente para produzir fagos;
- se a agitação mecânica é omitida, tanto a proteína quanto o DNA sedimentam com as bactérias;
- a proteína do fago removida das células por agitação consiste de cápsulas vazias de fagos mais ou menos intactas que, assim, poderia se supor que fossem veículos passivos para o transporte de DNA de célula para célula e que, tendo realizado essa tarefa, não têm mais função no crescimento do fago.

QUAL É A ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE DNA?

A resolução da estrutura do DNA foi, com certeza, a descoberta mais importante do século XX. James Watson, treinado no Grupo do Fago como geneticista, e Francis Crick, um médico especialista em cristalografia de raio X, foram a materialização da confluência da genética e da física, o que levou a uma compreensão detalhada sobre a base física da hereditariedade. Em sua sua 1953^a carta para a *Nature*, eles agregaram partes de um quebra-cabeça químico que foi se acumulando por mais de 80 anos.

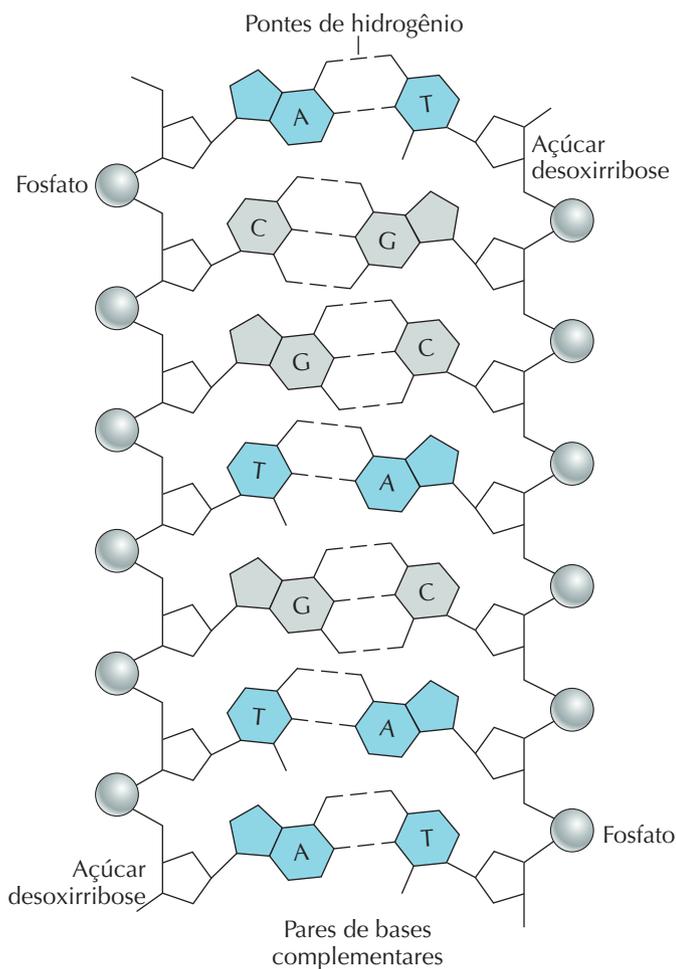
De maneira irônica, o DNA foi descoberto em 1869, apenas 10 anos após a publicação de *Origin of Species* (Origem das Espécies) de Darwin e quatro anos após o “Experimento com Híbridização de Plantas” de Mendel. Um médico alemão arrojado, Friedrich Miescher, isolou uma substância que chamou de “nucleína”, a partir do grande núcleo das células brancas do sangue. A sua fonte de células era o pus de bandagens cirúrgicas sujas.

Por 1900, a química básica da nucleína foi resolvida. Sabia-se que era uma molécula longa composta de três subunidades químicas distintas: um açúcar de cinco carbonos, um fosfato ácido e cinco tipos de bases ricas em nitrogênio (adenina, timina, guanina, citosina e uracila). Em torno de 1920, duas formas de ácidos nucleicos foram diferenciadas em virtude da sua composição de açúcar: ácido ribonucleico (RNA) e ácido deoxirribonucleico (DNA). Observou-se também que essas formas diferenciavam-se ligeiramente na composição da base; a timina é encontrada com exclusividade no DNA, enquanto a uracila é encontrada apenas no RNA.

DNA		RNA	
			
			
Adenina		Adenina	
Guanina		Guanina	
Citosina		Citosina	
Fosfato		Fosfato	

Componentes das moléculas de DNA e de RNA

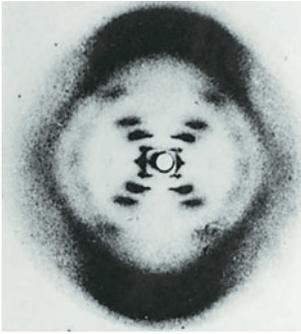
(Concepção artística desenvolvida por Lisa Shoemaker.)



Estrutura química do DNA

O conhecimento sobre o arranjo físico dos átomos dentro da molécula de DNA foi possível por dois feitos que ocorreram antes da Segunda Guerra Mundial – a codificação da físico-química e o desenvolvimento da cristalografia de raio X. As leis das ligações químicas que governam o arranjo dos átomos dentro das moléculas foram rigorosamente formuladas por Linus Pauling em *The Nature of the Chemical Bond* (A Natureza das Ligações Químicas), uma série de monografias que ele escreveu entre 1928 e 1935, enquanto estava trabalhando no California Institute of Technology. Na época em que Watson e Crick interessaram-se pelo DNA, as estruturas moleculares de todas as suas subunidades individuais eram conhecidas – açúcar deoxirribose, fosfato e cada um dos quatro nucleotídeos.

A determinação do arranjo tridimensional das subunidades dentro da imensa macromolécula de DNA estava além da capacidade das leis de Pauling. Isso necessitava do uso de cristalografia de raio X. Em 1912, o médico alemão Max von Laue descobriu que os raios X são refratados pelos átomos regularmente arranjados de um simples cristal. No mesmo ano, o médico australiano William Henry Bragg e seu filho, William Lawrence, planejaram as equações matemáticas necessárias para interpretar os padrões de difração e as utilizaram para determinar a estrutura da molécula do sal de mesa (cloreto de sódio). Porém não foi até 1934 que John Desmond Bernal, na Universidade de Cambridge, obteve a primeira fotografia de raio X de uma



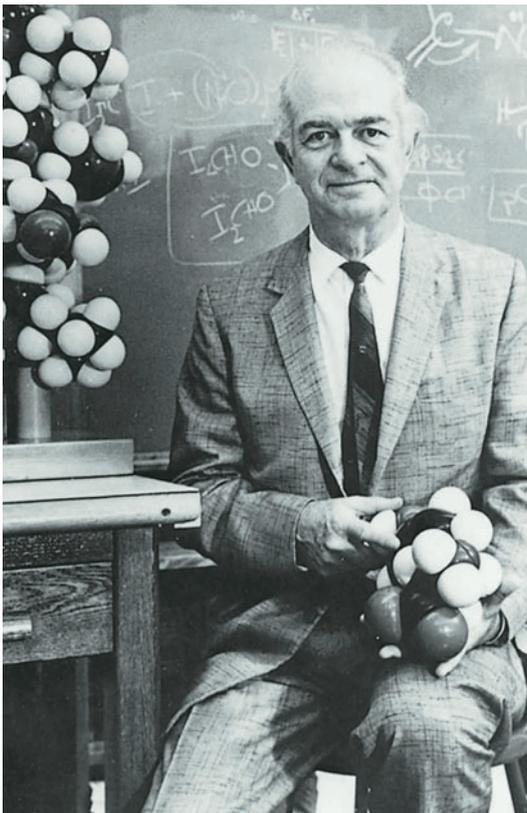
Fotografia, de Rosalind Franklin, da difração por raio X do DNA, 1953

(Reimpressa, com permissão, de R.E. Franklin e R.G. Gosling 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171:740-741; ©Macmillan Magazines, Ltd. – Fotografia cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)

molécula biologicamente importante – a proteína pepsina. Isso mostrou que as estruturas cristalinas de moléculas orgânicas gigantes, incluindo o DNA, podem ser estudadas utilizando a difração de raio X.

As três últimas peças do quebra-cabeça de DNA foram descobertas apenas vários anos antes da publicação do artigo de Watson-Crick na *Nature*. Em 1950, Erwin Chargaff, da Universidade de Columbia, descobriu uma proporção consistente de um para um de adenina-timina e guanina-citosina em amostras de DNA a partir de uma variedade de organismos. Em 1951, Linus Pauling e R.B. Corey obtiveram medidas atômicas precisas da estrutura polipeptídica helical, a α -hélice. Na mesma época, Maurice Wilkins e Rosalind Franklin obtiveram fotografias nítidas da difração de raio X do DNA. Os padrões de difração sugeriram fortemente uma molécula helical com uma repetição de 34 Ângstroms (Å) e uma largura de 20 Å.

Watson e Crick estavam, então, diante do problema de tentar conseguir combinar as subunidades de DNA em uma estrutura que se adequasse aos dados bioquímicos conhecidos e às leis da físico-química que funcionassem, ao mesmo tempo, como carregadoras da hereditariedade. A estrutura que eles chegaram, pela manipulação de papel e depois de modelos de metal, era perfeita na sua simplicidade. A molécula de DNA que eles propuseram é uma α -hélice e assemelha-se a uma escada suavemente torcida. Os corrimãos da escada, que seguem em direções opostas (antiparalelas), contêm unidades alternadas do açúcar deoxirribose e fosfato. Os nucleotídeos achatados empilham-se fortemente no topo um do outro, formando os degraus da escada helicoidal. Cada degrau é composto de um par de nucleotídeos (um par de bases) mantido unido por pontes de hidrogênio relativamente fracas. Consistente com a repetição de 34 Å, calculada a partir dos dados de difração por raio X, existem 10 pares



Linus Pauling, ca. 1950

(Cortesia dos Archives, California Institute of Technology.)



Rosalind Franklin, 1948

(Cortesia de Anne Sayre.)



Erwin Chargaff, 1947
(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)

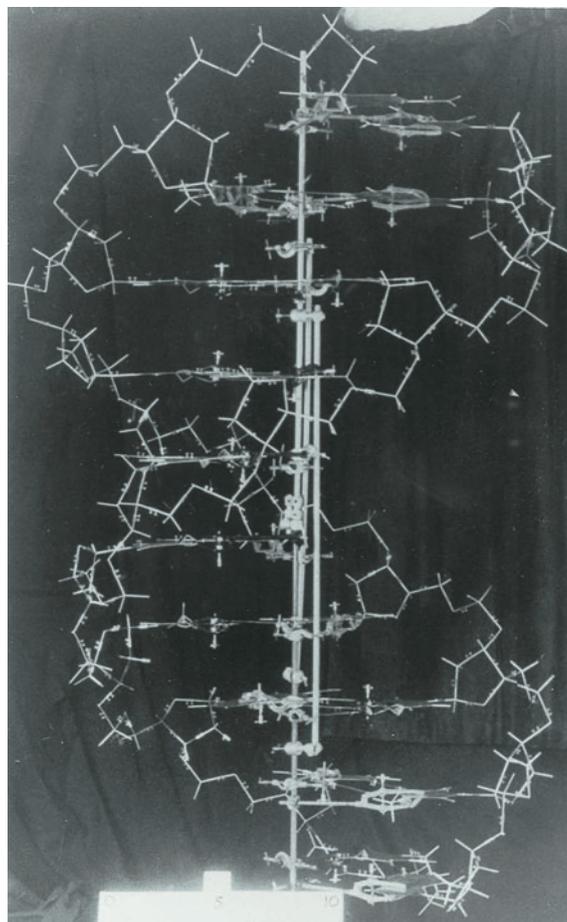


Maurice Wilkins, ca. 1955
(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)

de bases em cada volta da hélice, com 3,4 Å entre os pares de bases adjacentes. De grande importância é a relação de complementaridade entre os nucleotídeos em cada par. De acordo com a observação de Chargaff, a adenina sempre faz par com a timina e a citosina, por sua vez, sempre faz par com a guanina. Dessa forma, o alfabeto de nucleotídeos de uma metade da hélice de DNA determina o alfabeto da outra metade.

Apenas algumas semanas antes que Watson e Crick resolverem a estrutura, Linus Pauling publicou a sua própria estrutura de DNA – uma tripla hélice com os fosfatos posicionados no interior da molécula. Na construção desse modelo, para o espanto de todos, Pauling violou os princípios básicos da físico-química colocando os fosfatos no centro da molécula, requeria que ele os utilizasse na forma não-ionizada, o que é incompatível com o funcionamento do DNA, como um ácido orgânico, no qual os fosfatos liberam íons de hidrogênio na solução. Em seu estado ionizado, os fosfatos carregados negativamente iriam se repelir de modo denso, separando as estruturas.

Por que o maior físico-químico daqueles dias, e talvez de todos os tempos, obteve a estrutura errada? Por que Watson e Crick resolveram a estrutura antes de Rosalind Franklin, mesmo que seus dados de difração de raio X forneceram as coordenadas-chave? A resposta mais simples pode ser o fato de que Watson, como o único biólogo do grupo, tinha uma percepção mais clara de o que uma molécula deve ser para funcionar como um gene. Para os outros, o DNA era antes de tudo um desafio intelectual – uma grande biomolécula cuja estrutura necessitava ser resolvida. Todavia, para Watson, o DNA era a molécula da vida.



O modelo de metal com 182 cm de altura feito por Watson e Crick, em 1953

(Cortesia de James D. Watson Special Collection. Cold Spring Harbor Laboratory Archives, de Watson J.D. 1968. *The double helix*. Atheneum Press, Nova York.)

REFERÊNCIAS

- Garland A. 1978. *Thomas Hunt Morgan: The man and his science*. Princeton University Press, New Jersey.
- Cairns J., Stent G.S., and Watson J.D., eds. 1992. *Phage and the origins of molecular biology*, expanded edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Carlson E.A. 1981. *Genes, radiation, and society: The life and work of H.J. Muller*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Comfort N. 2001. *The tangled field: Barbara McClintock's search for the patterns of genetic control*. Harvard University Press, Cambridge.
- Crick F. 1988. *What mad pursuit*. Basic Books, New York.
- Fischer E.P. and Lipson C. 1988. *Thinking about science: Max Delbrück and the origins of molecular biology*. W.W. Norton, New York.
- Judson H.F. 1979. *The eighth day of creation*. Simon and Schuster, New York.
- Korey K., ed. 1984. *The essential Darwin*. Little, Brown and Company, Boston.
- McCarty M. 1985. *The transforming principle: Discovering that genes are made of DNA*. W.W. Norton, New York.
- Micklos D., ed. 1999. *DNA from the beginning* (<http://www.dnafb.org>). Dolan DNA Learning Center, Cold Spring Harbor, New York.
- Perutz M. 1998. *I wish I'd made you angry earlier*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sayre A. 1975. *Rosalind Franklin and DNA*. W.W. Norton, New York.
- Schrödinger E. 1992. *What is Life? The physical aspect of the living cell with mind and matter & autobiographical sketches*, reprint edition. Cambridge University Press, New York.
- Sturtevant A.H. 2001. *A history of genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Watson J.D. 1980. *The double helix: A personal account of the discovery of the structure of DNA*. W.W. Norton, New York.