

# Revista da Biologia

Volume 14(1)

Julho 2015

[ib.usp.br/revista](http://ib.usp.br/revista)

Variabilidade genética de bactérias  
Respostas a danos no DNA  
Isolamento reprodutivo e  
cruzamentos manuais  
Visão em Mollusca  
Biologia sintética



## Revista da Biologia

Publica textos de todas as áreas da Biologia, abordando questões gerais (ensaios, revisões e comentários) e específicas (artigos experimentais originais, descrição de técnicas e resumos expandidos).

Há espaço também para perspectivas pessoais sobre questões biológicas com relevância social e política (opinião).

A Revista da Biologia é gratuita e exclusivamente on-line. Sua reprodução é permitida para fins não comerciais.

**ISSN1984-5154**

**[www.ib.usp.br/revista](http://www.ib.usp.br/revista)**

## Contato

[revistadabiologia@gmail.com](mailto:revistadabiologia@gmail.com)

### Revista da Biologia

Rua do Matão, trav. 14, 321  
Cidade Universitária, São Paulo  
São Paulo, SP Brasil  
CEP 05508-090

### Volume 14(1)

Publicado em junho de 2015

## Expediente

### Editor Executivo

Gilberto Xavier

### Coordenadores

Bryan Souza  
Daniela Soltys  
Eduardo Moretti  
Pedro Ribeiro  
Rodrigo Pavão

### Editores científicos

Carlos Ribeiro Vilela  
Daniel Lahr  
Déborah Yara Alves Cursino dos Santos  
Fabricio Beggiato Baccaro  
Fernando Ribeiro Gomes  
Marcelo Luiz Martins Pompêo

### Consultores científicos

Aline Bertinatto Cruz  
Bruna Trevisan Souza  
Carolina de Oliveira Rodini  
Carolini Kaid Dávila  
Fernando O. G. de Figueiredo  
Isabel Casillas Barragán  
Leandro Cardoso de Moraes  
Lilian Cristina da Silveira  
Lucas Garbini Cespedes  
Marcelo Fernando Devecchi  
Paula Gonçalves Cerqueira  
Rodrigo Koblitz



# Volume 14(1)

## Índice

- Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial** 1  
Analysis of genetic variability by RAPD of strains isolated from soil and sludge impacted with industrial effluent  
*Ramon Gomes da Silva, Fernanda Romanholi Pinhati, Joab Trajano Silva*
- Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular** 6  
DNA damage response following UV-light exposure: putting out the fire before cell collapse  
*Leonardo Carmo de Andrade Lima*
- Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss.** 17  
Reciprocal crosses as a tool to evaluate the reproductive isolation in a Orchidaceae hybrid zone  
*Tiago Manuel Zanfra de Melo e Gouveia, Fábio Pinheiro*
- Síntese do conhecimento sobre a diversidade de sistemas visuais em Mollusca, com ênfase em Bivalvia** 24  
Synthesis of the knowledge of visual systems diversity in Mollusca, with emphasis on Bivalvia  
*Jorge Alves Audino, José Eduardo Amoroso Rodriguez Marian e Sônia Godoy Bueno Carvalho Lopes*
- Biologia sintética: possibilidades e desafios** 39  
Synthetic Biology: possibilities and challenges  
*Jossan Borba Gomes Silva, Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo*

# Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial

Analysis of genetic variability by RAPD of strains isolated from soil and sludge impacted with industrial effluent

Ramon Gomes da Silva<sup>1</sup>, Fernanda Romanholi Pinhati<sup>2\*</sup>, Joab Trajano Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química e Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Tecnologia, Resende – RJ, Brasil.

Contato: fernandaromanholi@yahoo.com.br

**Resumo.** A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma das ferramentas utilizadas para análise dos micro-organismos em ambientes e se destaca por sua alta praticidade e baixo custo. Entretanto, a otimização das condições de reação torna-se fundamental na busca do perfil polimórfico. Nesse trabalho, bactérias provenientes de lodo ativado e solo impactados com efluente industrial foram analisadas por RAPD buscando relações de similaridade genética. Os níveis de similaridade entre os isolados de lodo e de solo variaram entre 91,9% a 56%. Através da otimização das condições de reação da RAPD, um iniciador genético foi selecionado e permitiu gerar um perfil polimórfico de bandas características para o conjunto de micro-organismos isolados, que poderá ser utilizado como controle de presença/ausência destes isolados.

**Palavras-chave.** Comunidade bacteriana de lodo e solo; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; RAPD

**Abstract.** The RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) is an ease and inexpensive tool to analyze microorganism in the environment. However, the protocol optimization is a crucial step to provide a suitable polymorphic profile. In the present work, bacteria obtained from activated sludge system and soil impacted with industrial effluent were studied by RAPD technique to provide genetic similarities relationships. A similarity level of 91.9% to 56%, between isolated sludge and soil were observed. A genetic starter was selected after protocol optimization and a characteristic polymorphic bands profile generated to isolated microorganisms. The presence or absence of the isolated microorganisms in samples can be controlled by using the obtained polymorphic profile.

**Keywords.** Sludge and soil bacterial community; polycyclic aromatic hydrocarbons; RAPD

## Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. O metabolismo dos HPAs gera epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer em pulmão, intestino, fígado, pâncreas e pele, devido à presença destes compostos (Azevedo et al., 2013).

Dentre as fontes antropogênicas destes compostos pode-se destacar os processos industriais, aquecimento doméstico, emissões automéveis, incineração, extração, transporte, refino e transformação do petróleo e seus derivados (Ravindra et al., 2008). Muitos destes compostos são descartados no ambiente através dos efluentes e sua degradação pode ocorrer abioticamente no ambiente através de processos químicos e físicos. No entanto, estes processos são lentos, incompletos

e podem gerar intermediários mais tóxicos que as moléculas originais (Motelay-Massei et al., 2003). Uma estratégia para possível eliminação/redução na concentração dos HPAs de ambientes contaminados é através da biorremediação em que micro-organismos são capazes de metabolizar estes compostos (Pereira e Freitas, 2012).

Um ambiente propício para o isolamento de micro-organismos com esta capacidade são os lodos ativados (estruturas em forma de flocos contendo fragmentos orgânicos, inorgânica, células mortas e, principalmente, uma grande variedade de bactérias) e solo contaminado por petróleo/ efluentes industriais.

A introdução de técnicas de genética molecular, no início da década de 80, permitiu que os estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético passassem a ser realizados com maior segurança, rapidez e eficiência. A descoberta de novas gerações de marcadores moleculares,

Recebido: 17mar14

Aceito: 15dez14

Publicado: 02fev15

Revisado por

Marcelo Pompêo e

Anônimo

baseados na sequência do DNA, tem possibilitado maior detecção de polimorfismo, em comparação com marcadores morfológicos ou baseados na análise de proteínas. A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica molecular rápida, barata e informativa, que dispensa o conhecimento prévio da sequência de DNA alvo. A técnica é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, utilizando um único oligonucleotídeo de 10-15 bases de sequência arbitrária como iniciador através da PCR (reação em cadeia da polimerase) (Lacerda et al., 2002). A amplificação ocorre quando este iniciador reconhece o sítio de homologia em ambas as fitas de DNA molde e cada banda referente ao produto de amplificação é o resultado da interação entre o iniciador e o DNA molde. O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento no outro genótipo, os quais são devido a diversos fatores como deleção, duplicação ou mutação no sítio de anelamento do iniciador (Lupchinski et al., 2006).

Assim, o presente trabalho visou padronizar a técnica de RAPD, estabelecendo uma metodologia de análise de variabilidade genética para bactérias isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial.

## Materiais e métodos

**Coleta de amostras de solo e lodo ativado.** Nove pontos de coleta de solo foram selecionados em uma área industrial situada em Rosário, Argentina, contaminada com efluente industrial e uma amostra de lodo ativado foi obtida na refinaria de petróleo Gabriel Passos, Betim-MG, Brasil. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transferidas para o laboratório, mantidos a -20°C.

**Extração do DNA.** As amostras de solo de cada ponto de coleta foram homogenizadas e peneiradas em malha de 2 mm. Porções de um grama de solo de cada ponto de coleta foram misturadas a 100 mL de solução salina estéril (0,85%) por meio de shaker (120 rpm - 30 min). A partir de uma alíquota (100 µL) do sobrenadante foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ ). De cada diluição, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em triplicatas em placas de petri com meio de cultura LB (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5% e 2% agar). As placas foram incubadas a 37°C por 5 dias. Quinze colônias com aspectos morfológicos distintos, tais como: tamanho, cor, textura, forma e borda da colônia, foram isoladas das amostras de solo, e nomeadas: 1A, 1B, 1C, 2C, 3C, 4A, 4B, 4N, 5T, 5N, 6N, 6V, 7T, 9B e 9C. Três colônias foram isoladas do lodo ativado, conforme descrito em Pinhati et al. (2014), e nomeadas: A, F, N. Todos os micro-organismos isolados foram cultivados em 10 mL de meio LB a 37°C, 250 rpm por 18h. A extração de DNA procedeu-se conforme protocolo proposto por Leão (2004).

**Otimização da técnica de RAPD.** Para verificar a condição ótima de reação, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de  $MgCl_2$  (1,5; 2,0 e 3,0 mM), Taq DNA polimerase (1, 2 e 3U/reação) e DNA (10, 20 e 30 ng). Para a RAPD foram selecionados dez iniciadores e suas características estão listadas na Tabela 1.

O protocolo de reação de RAPD foi constituído por 5 µL do tampão 10X (Fermentas), 2 µL de cada dNTP (5 mM;

Tabela 1. Iniciadores aleatórios selecionados para amplificação de DNA de isolados de solo e lodo através da reação em cadeia da polimerase (RAPD)

Iniciadores	Sequência 5'- 3'	Conteúdo GC (%)
OPA-02	TGCCGAGCTG	70
OPA-05	AGGGGTCTTG	60
OPA-10	GTGATCGCAG	60
OPA-13	CAGCACCCAC	70
OPA-20	TTCCGAACCC	60
OPD-02	GTTGCGATCC	60
OPD-05	GGACCCAACC	70
OPD-10	GGTCTACACC	70
OPD-13	GGGGTGACGA	70
OPD-20	CATCCGTGCT	60

Pharmacia Biotech) e 2 µL (25 pmol) de cada iniciador separadamente, e água MilliQ® até o volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer Gene Amp® PCR System 2400-Perkin Elmer, USA). Os ciclos constaram de uma desnaturação inicial de 94°C/5 min, seguida por 45 ciclos de desnaturação (94°C/1 min), anelamento (35°C/1 min) e extensão (72°C/2 min), com uma extensão final de 72°C/10 min. O resultado da reação foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com Gel Red (10X diluído DMSO) em tampão TBE (45 mM Tris borato, 1 mM EDTA pH 8,0). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e documentados utilizando-se sistema de fotodocumentação MiniBisPro (BioAmerica Inc.). Os produtos de amplificação foram comparados com padrões de peso molecular fago lambda digerido com Hind III (Promega).

**Análise da variabilidade genética.** As análises de similaridade e de agrupamento entre os micro-organismos foram realizadas utilizando o programa Gel Compar v. 5.0 (Applied Maths, Belgium) empregando-se o coeficiente de Jaccard e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), estabelecendo as relações genéticas entre os diferentes isolados.

## Resultados e discussão

Com base na otimização da reação de RAPD, foram avaliadas diferentes concentrações de DNA, sendo que a concentração de 30 ng foi a que apresentou a melhor definição e intensidade das bandas de DNA no gel de agarose. Foi estabelecido como condição ótima para a reação de RAPD, a concentração de 3,0 mM/reação de  $MgCl_2$  e 2U/reação de Taq polimerase, conforme mostra a Figura 1.

A utilização de pequena quantidade de  $Mg^{+2}$  ou mesmo sua ausência durante as reações de amplificação pode resultar na inatividade da DNA polimerase. Enquanto que o excesso de  $Mg^{+2}$  pode provocar a redução da fidelidade enzimática e aumentar a formação de produtos não específicos (Kinsuat e Kumar, 2007). Analisando a Figura 1, linhas 1-3, 10-12 e 19-21, observa-se quatro bandas na presença da menor concentração de  $Mg^{+2}$  (1,5 mM). No entanto, quando a reação ocorreu nas demais concentrações (2,0 ou 3,0 mM de  $Mg^{+2}$ ), constata-se cinco bandas, conforme pode ser observado nas linhas 4-6, 7-9, 13-15, 16-18, 22-24 e 25-27, alcançando-se assim com estes valores um maior número de

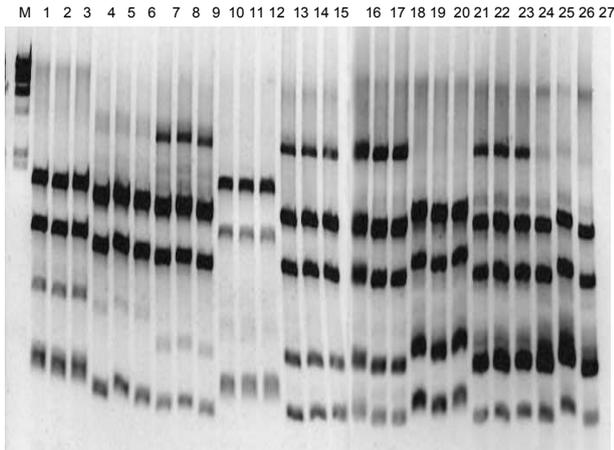


Figura 1. Amplificação de DNA de isolado de solo (4A) com o primer OPA-02, para verificar a condição ótima de reação, em função da concentração de íons  $Mg^{+2}$  e Taq. M: Marcador de peso molecular fago lambda digerido com Hind III (Promega); Linhas 1-3: 1,5mM  $Mg^{+2}$  e 1U Taq; Linhas 4-6: 2,0mM  $Mg^{+2}$  e 1U Taq; Linhas 7-9: 3,0mM  $Mg^{+2}$  e 1U Taq; Linhas 10-12: 1,5mM  $Mg^{+2}$  e 2U Taq; Linhas 13-15: 2,0mM  $Mg^{+2}$  e 2U Taq; Linhas 16-18: 3,0mM  $Mg^{+2}$  e 2U Taq; Linhas 19-21: 1,5mM  $Mg^{+2}$  e 3U Taq; Linhas 22-24: 2,0mM  $Mg^{+2}$  e 3U Taq; Linhas 25-27: 3,0mM  $Mg^{+2}$  e 3U Taq

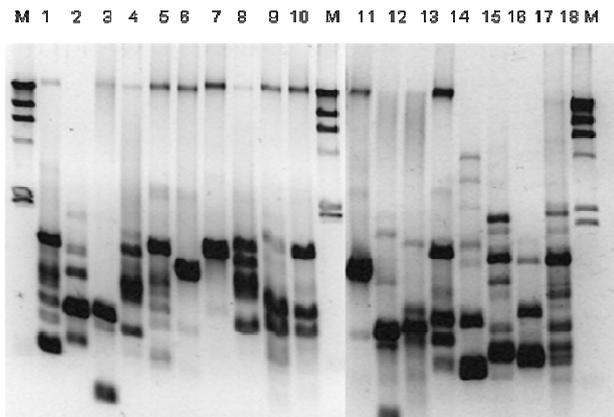


Figura 2. Perfil de RAPD dos isolados de solo com o iniciador OPA-02. M) Marcador de peso molecular fago lambda digerido com Hind III (Promega); 1) A; 2) F; 3) N; 4) 1A; 5) 1B; 6) 4A; 7) 4B; 8) 9B; 9) 9C; 10) 6V; 11) 1C; 12) 2C; 13) 3C; 14) 4B; 15) 5T; 16) 6V; 17) 5B; 18) 7B

bandas. Porém, estes perfis de bandas amplificados com 2,0 ou 3,0mM de  $Mg^{+2}$  permaneceram-se inalterados entre si. Quanto à otimização do efeito da concentração de Taq polimerase na reação, o melhor resultado foi obtido com a utilização de 2U/reação, que pode ser observado nas linhas 13-15 e 16-18, onde as cinco bandas detectadas são bem nítidas e o perfil eletroforético revela uma menor intensidade de bandas inespecíficas.

As condições ótimas de reação alcançadas neste protocolo de otimização da técnica de RAPD são corroboradas por resultados obtidos por Martins (2005), que avaliaram a variabilidade genética de 83 isolados de *Fusarium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros (soja, cacau, tomate, entre outros), bem como isolados do solo em Piracicaba, SP. Dentre as concentrações de  $Mg^{+2}$  testadas por Martins (3,0; 4,0 e 5,0 mM), este observou que os perfis genéticos também não se alteraram em função das diferentes concentrações testadas e

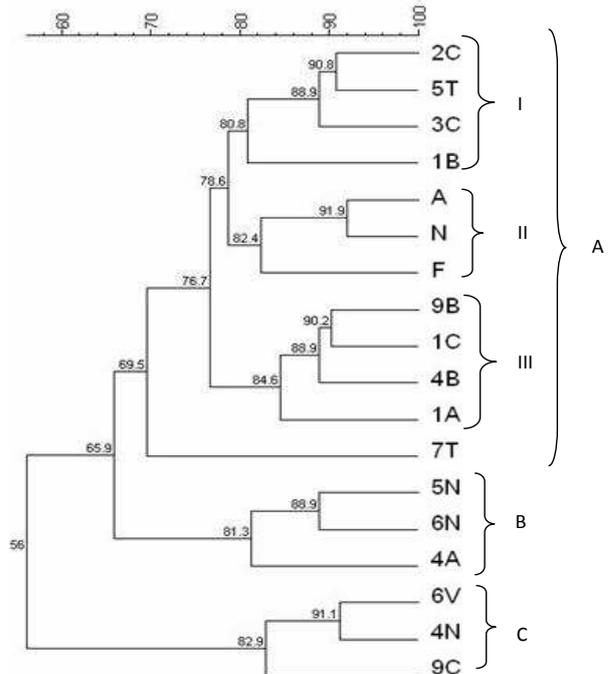


Figura 3. Dendrograma obtido através da matriz de similaridade genética entre os isolados provenientes de solo e lodo impactados com efluente industrial a partir de dados obtidos pela técnica de RAPD utilizando o método UPGMA. O dendrograma apresenta três clusters (A, B e C), sendo o cluster A subdividido em três subclusters (I, II e III)

sendo a menor concentração (3,0 mM) considerada para a reação. O mesmo autor também obteve os melhores resultados utilizando 2U/reação de Taq polimerase. Quanto à concentração de DNA, o autor avaliou um espectro de 5 a 100 ng de DNA, sendo o melhor resultado obtido dentro da faixa de 20 a 30 ng. A concentração de 30 ng/reação foi adotada como ideal, segundo Martins.

No presente trabalho, foram testados 10 iniciadores, dos quais apenas um (OPA-02) forneceu produtos nítidos para a amplificação. O iniciador foi utilizado em todas as bactérias isoladas, gerando 11 marcas polimórficas e 6 monomórficas, resultando em uma média de 4,4 bandas polimórficas por iniciador. O número de marcas polimórficas por iniciador variou de dois a nove, totalizando 65% de polimorfismo (Figura 2).

A análise combinada dos 17 marcadores permitiu a construção de uma matriz de similaridade segundo o coeficiente de Jaccard. O método de UPGMA gerou um dendrograma, onde foram observados diferentes níveis de similaridade (91,9% a 56%). De acordo com o dendrograma foi possível verificar a formação de três clusters (A, B e C), cujas semelhanças globais foram de 56% (Figura 3).

O cluster A, composto pelos isolados 2C, 5T, 3C, 1B, A, F, N, 9B, 1C, 4B, 1A e 7T, apresenta 69,5% de similaridade entre estes, sendo possível subdividi-lo em três subclusters (I, II e III). Os subclusters possuem índices de similaridades de 80,8% (2C, 5T, 3C e 1B), 82,4% (A, F e N) e 84,6% (9B, 1C, 4B e 1A), respectivamente. O isolado 7T associa-se aos demais isolados desse cluster com 69,5% de similaridade. O cluster B apresenta 81,3% de similaridade entre os isolados 5N, 6N e 4A, enquanto o cluster C apresenta o maior índice de similaridade entre grupos, com 82,9%, entre os isolados 6V, 4N e 9C.

Os isolados de lodo ativado revelaram uma alta afinidade genética (82,4%) e foram agrupados em um único sub-cluster (II). Os isolados A e N apresentaram o maior índice de similaridade obtido entre todos os micro-organismos estudados (91,9%). Este alto índice de similaridade pode ser atribuído ao fato destas bactérias terem sido isoladas no mesmo ambiente e estarem submetidas a condições ambientais similares, no entanto, indicam claramente também que estes micro-organismos isolados são geneticamente distintos e podem representar diferentes estirpes da mesma espécie ou mesmo pertencerem a diferentes espécies, apesar de terem alto grau de similaridade. Segundo Fungaro e Vieira (1996), se várias espécies pertencentes a um mesmo gênero forem analisadas e uma das bandas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador específico do gênero.

O maior e o menor índice de similaridade obtido entre os micro-organismos do lodo (A, F e N) em relação aos micro-organismos do solo foi de 78,6% (2C, 5T, 3C e 1B - cluster A) e 56% (cluster B e C), respectivamente. Considerando que tais isolados foram obtidos de ambientes distintos (solo e lodo ativado), onde estão expostos a diferentes tipos e concentrações de poluentes, a alta variabilidade genética observada entre os isolados é condizente com a diversidade de espécies, que se espera encontrar nestes ambientes. De acordo com Riser-Roberts (1992), em ecossistemas não poluídos, estes micro-organismos com capacidade de degradação dos HPAs constituem menos de 1% da comunidade microbiana e em ecossistemas contaminados podem chegar a constituir quase 100% da comunidade.

Embora muitas bactérias sejam capazes de metabolizar diferentes poluentes orgânicos, uma única bactéria pode não possuir a capacidade enzimática para degradar todos, ou mesmo a maioria dos compostos orgânicos em um ambiente poluído. Comunidades microbianas mistas apresentam maior potencial de degradação, porque a informação genética de mais de um organismo pode ser necessária para degradar o complexo de misturas de compostos orgânicos presentes em áreas contaminadas (Jacques et al., 2005).

Em virtude da diversidade de espécies que se espera encontrar nestes ambientes e a potencial capacidade destes isolados em degradar os compostos poluentes, os marcadores observados para estes isolados podem ser utilizados como ferramenta para monitorar a presença destes nos ambientes em estudo. Considerando-se as condições ótimas de reação, o "perfil RAPD" dos isolados obtido pode ser definido como modelo para a confirmação da presença destes isolados no ambiente. A ausência de algum marcador no perfil de RAPD poderá ser indicador de alterações nas condições padrão do efluente, que possivelmente pode resultar na redução da taxa de crescimento e/ou eliminação de alguma espécie. A técnica de RAPD pode se tornar uma ferramenta muito importante no conhecimento da diversidade e da estrutura genética de populações de fragmentos de DNA, auxiliando no monitoramento e permitindo que tais micro-organismos potencialmente degradadores de compostos recalcitrantes possam ser utilizados como sementes em áreas impactadas (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

O uso de um iniciador aleatório foi fundamental para

superar a limitação do conhecimento prévio da sequência de DNA para a análise de PCR, no entanto, para que o perfil de bandas obtido possa ser utilizado para fins de comparação, é fundamental que se realize ajustes nas condições ótimas de reação. A otimização da reação de RAPD visa diminuir os custos e principalmente, melhorar a qualidade das informações geradas, possibilitando assim o desenvolvimento de um perfil genético-molecular que melhor represente os exemplares analisados.

Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo nos conhecimentos de genética e evolução com o desenvolvimento de marcadores genéticos para uma variedade de propósitos. A RAPD é uma técnica que pode servir de ferramenta para aplicações que incluem: a obtenção de identificadores genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais; o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, estabelecimento de relações filogenéticas e diferenciação de espécies próximas, analisar a genética de espécies ameaçadas, podendo ser utilizada como ferramenta no delineamento de estratégias de conservação in situ ou ex situ de plantas, por exemplo (Lacerda et al., 2002).

A técnica se destaca ainda por sua simplicidade, o baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para a realização das análises, possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e a capacidade de conhecer a diversidade e a estrutura genética de populações. As principais desvantagens estão relacionadas principalmente a necessidade de otimização das condições ótimas de reação e também relacionado a possíveis variáveis entre laboratórios, como por exemplo, a temperatura do laboratório.

## Conclusões

A técnica de RAPD demonstrou ser uma ferramenta satisfatória para análise de variabilidade e similaridade entre os isolados de solo e lodo contaminados com efluentes industriais, revelando um perfil genético bem diversificado. Um perfil polimórfico, obtido a partir de um único iniciador, revelou a similaridade entre os isolados, destacando que entre os ambientes, há espécies com grande diversidade genética, enquanto observou-se alto grau de similaridade entre espécies do mesmo ambiente. As condições ótimas obtidas com a padronização da reação de RAPD foram de 3,0 mM de  $MgCl_2$ , 30 ng de DNA/reação, e 2U/reação de Taq polimerase. Esta condição de otimização de reação foi fundamental para a redução de gastos e a obtenção do perfil polimórfico que melhor representasse os micro-organismos em análise. A técnica permitiu gerar um perfil de marcadores genéticos que podem ser utilizados para monitorar a presença destes micro-organismos nos ambientes contaminados.

## Referências

- Azevedo JAH, Araújo RS, Silva, GMM. 2013. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos atmosféricos de fontes automotivas: uma breve revisão. *Holos* 29:102-114.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed.

Brasília: Embrapa Cenargen.

- Fungaro MHP, Vieira MLC, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 1996. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Letters in Applied Microbiology* 22:389-392.
- Jacques RJS, Santos EC, Bento FM, Peralba MCR, Selbach PA, Sá ELS, Camargo FAO. 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56:143-150.
- Kinsuat MJ e Kumar SV. 2007. Polymorphic microsatellite and cryptic simple repeat sequence markers in pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Molecular Ecology Notes*, 7:1032-1035.
- Lacerda DR, Acedo MDP, Filho JPL, Lovatto MB. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana* 3:87-92.
- Leão S, Martins A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, Portales F. 2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria p. 164.
- Lupchinski JRE, Vargas L, Ribeiro RP, Moreira HLM, Valentim M, Povh JA. 2006. A importância da utilização da técnica RAPD para a identificação de dactilogirídeos em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR* 1:49-57.
- Martins MK. 2005. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Motelay-Massei A, Ollivon D, Garban B, Chevreuil M. 2003. Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment. *Atmospheric Environment* 22:3135-3146.
- Pereira ARB, Freitas DAF. 2012. Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* 6:975-1006.
- Pinhati FR, Del Aguila EM, Tôrres, APR, Sousa, MP, Santiago, VMJ, Silva JT, Paschoalin VME. 2014. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Química Nova* 37:1269-1274.
- Ravindra K, Sokh R, Grieken R. 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 42:2895-2921.
- Riser-Roberts E. 1992. *Bioremediation of petroleum contaminated sites*. Boca Ratón, FL. CRC Press.

# Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular

DNA damage response following UV-light exposure: putting out the fire before cell collapse

**Leonardo Carmo de Andrade Lima\***

*Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo*

\*Contato: leolima11@gmail.com

**Resumo.** O DNA é uma molécula reativa e estima-se que mais de 20 mil lesões no DNA sejam induzidas de maneira endógena por dia por célula, além de outras induzidas por agentes exógenos como a luz ultravioleta, resultando em bloqueio físico das maquinarias de replicação e transcrição do DNA. Em resposta a lesões no DNA, células ativam respostas que promovem regulação do ciclo celular e reparo do DNA, evitando catástrofes durante a replicação ou na mitose. Caso a quantidade de danos ultrapasse a capacidade de reparo, as células podem induzir morte celular como último recurso. A importância das respostas ao dano no DNA é exemplificada por síndromes humanas, com fenótipo de envelhecimento precoce ou aumento de risco de câncer, e seu estudo poderá contribuir para o entendimento da tumorigênese e desenvolvimento de melhores terapias.

**Palavras-chave.** *Luz ultravioleta; Reatividade do DNA; Reparo do DNA; Xeroderma pigmentosum; Tumorigênese; Mutagênese.*

**Abstract.** DNA is a reactive molecule and it is estimated that more than 20 thousand lesions are induced endogenously per cell per day, besides other induced by exogenous agents such as ultraviolet light exposure, resulting in physical blockage of DNA replication and transcription machineries. In response to DNA damage, cells activate responses that promote cell cycle regulation and DNA repair, avoiding replication or mitosis catastrophe. If DNA damage exceeds DNA repair capacity, cells induce cell death as last resort. The importance of responses to DNA damage is exemplified by human syndromes with premature aging phenotype and increased risk of cancer, and their study could contribute to understanding of tumorigenesis and development of improved therapies.

**Keywords.** *Ultraviolet light, DNA reactivity, DNA repair; Xeroderma pigmentosum; Tumorigenesis; Mutagenesis.*

“Nós não consideramos o possível papel de... reparo [de DNA] embora... eu mais tarde vim a perceber que o DNA é tão precioso que provavelmente diversos mecanismos de reparo devam existir” – (Crick 1974)

## A reatividade do DNA e necessidade de reparo

Inicialmente, o DNA era percebido como uma macromolécula altamente estável, porém somente algum tempo depois que a estrutura da dupla-hélice foi desvendada por Watson e Crick é que foi compreendida a sua instabilidade natural, devido à sua estrutura química e reatividade com numerosa quantidade de agentes químicos e físicos. Curiosamente, muito antes da constatação de que DNA era o material hereditário das células, em 1944, já era conhecido que agentes ambientais como raios-X induziam mutações (Muller, 1927) e que células tinham habilidade inata de se recuperarem de irradiação com luz ultravioleta (UV), mesmo sem saber exatamente que tipo de dano era induzido em células (Hollander e Claus, 1936). O primeiro mecanismo de

recuperação celular – a fotorreativação – foi descrito em 1949 (Kelner, 1949), mas foi na década de 60 que foi desvendada a natureza da lesão no DNA provocada por luz UV e o mecanismo independente de luz – o reparo por excisão de nucleotídeos. Ao longo do tempo, outros tipos de danos no DNA, além dos induzidos por radiações, foram descritos reafirmando a alta reatividade da molécula de DNA e a necessidade de correção das lesões. A figura 1 resume trabalhos de destaque que contribuíram para o entendimento da resposta celular ao dano no DNA através de uma linha do tempo, adaptada da revisão de Ljungman, 2010.

Danos no DNA são alterações químicas da dupla-hélice que desafiam constantemente a estabilidade genômica, já que podem comprometer o metabolismo do DNA (replicação e transcrição) e resultarem em mutações pontuais, durante a fase S, ou em aberrações cromossômicas quando existem quebras no DNA. Assim, desempenham importante papel nos processos biológicos de tumorigênese e envelhecimento (Friedberg, 2003; Menck e Munford, 2014). Hoje

Recebido: 12jun14

Aceito: 16jan15

Publicado: 02fev15

Revisado por  
Carlos Ribeiro  
Vilela, Carolina de  
Oliveira Rodini e  
Anônimo

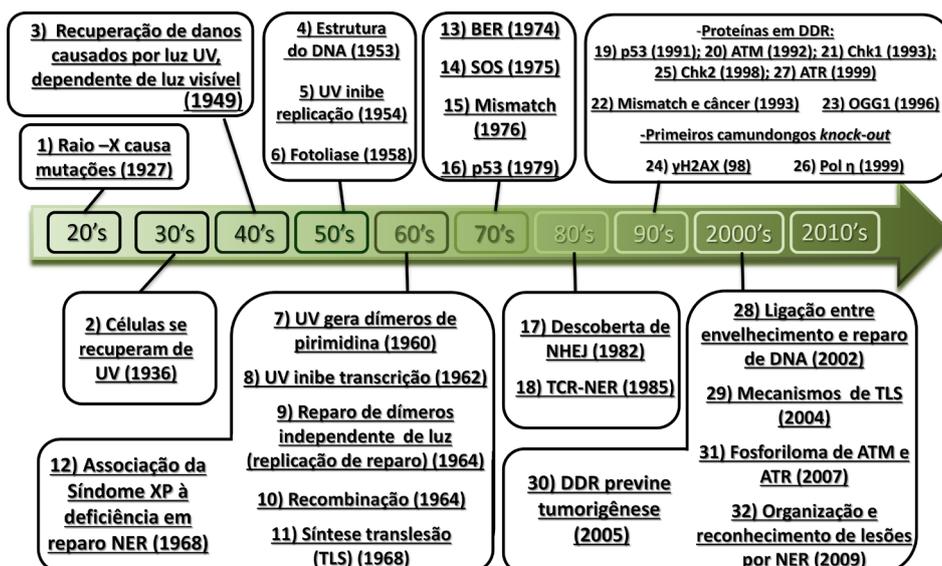


Figura 1. Linha do tempo com principais trabalhos e descobertas em relação à resposta ao dano no DNA. O número em parênteses corresponde ao ano de publicação do trabalho e foi adaptada da revisão de Ljungman, 2000. 1 - (Muller 1927); 2 - (Hollaender e Claus, 1936); 3 - (Kelner 1949); 4 - (Watson e Crick, 1953); 5 - (Kanazir e Errera, 1954); 6 - (RupertT et al., 1958); 7 - (Beukers e Berends, 1960); 8 - (Masters e Pardee, 1962); 9 - (Boyce e Howard-Flanders, 1964; Setlow e Carrier, 1964); 10 - (Holliday 1964); 11 - (Rupp e Howard-Flanders, 1968); 12 - (J E Cleaver 1968); 13 - (Lindahl 1974); 14 - (Witkin 1974); 15 - (Wagner e Meselson, 1976); 16 - (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979); 17 - (Wilson et al., 1982); 18 - (Mellon et al., 1987); 19 - (Kastan et al. 1991); 20 - (Kastan et al. 1992); 21 - (Walworth et al., 1993); 22 - (Fishel et al. 1993); 23 - (van der Kemp et al. 1996); 24 - (Rogakou et al. 1998); 25 - (Matsuoka et al., 1998); 26 - (Masutani et al. 1999); 27 - (Tibbetts et al. 1999); 28 - (de Boer et al. 2002); 29 - (Kannouche et al., 2004); 30 - (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005); 31 - (Matsuoka et al. 2007; Stokes et al. 2007); 32 - ( Sugasawa et al. 2009) .

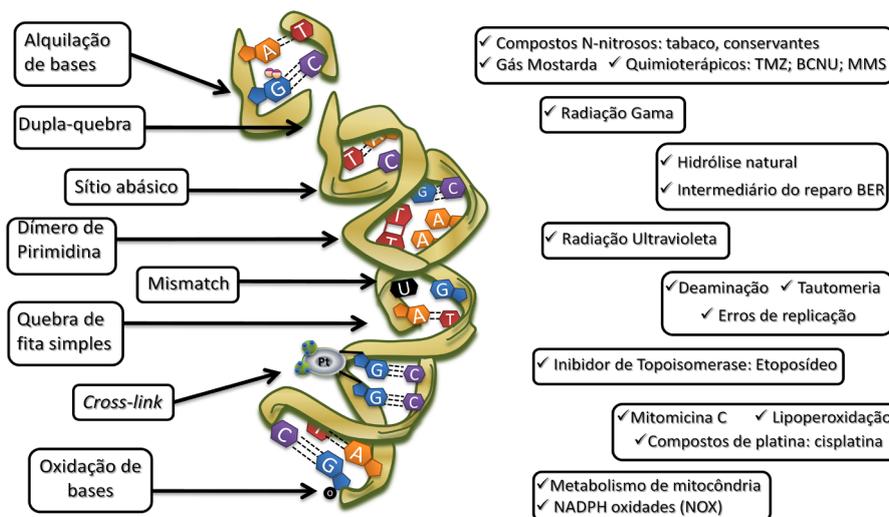


Figura 2. A reatividade da molécula do DNA. Representação da dupla hélice do DNA com principais tipos de lesão (à esquerda) e seus respectivos agentes causadores (à direita).

conhecemos diversas causas das modificações no DNA. Milhares de purinas são perdidas todos os dias, devido à depurinação espontânea do DNA, e as bases nitrogenadas são suscetíveis à deaminação (Lindahl, 1993). Agentes endógenos, como o metabolismo da mitocôndria e NADPH oxidases, geram espécies reativas de oxigênio como subproduto (Jaruga e Dizdaroglu, 1996) e afetam o DNA além de outras moléculas na célula, como lipídios de membrana. Esse processo de peroxidação lipídica da membrana é capaz de gerar outros compostos – aldeídos – também capazes de reagir com o DNA. Estima-se que mais de 20 mil lesões no DNA sejam induzidas de maneira endógena por dia em cada célula (Friedberg, 2006). Além disso, diferentes agentes exógenos, físicos e químicos, podem interagir e causar alterações na estrutura

do DNA, dentre os quais: luz UV, radiação ionizante, conservantes de alimentos, poluição atmosférica, fumaça de cigarro e quimioterápicos (Fig. 2).

### Luz UV e consequências dos fotoprodutos

A luz ultravioleta, por ser parte integrante da radiação solar, é o agente físico capaz de lesionar o DNA a que estamos mais expostos. A luz UV representa 45% do espectro solar, situa-se abaixo do comprimento de onda da luz visível e é subdividida didaticamente em três faixas de acordo com o comprimento de onda: UVA, com comprimento entre 320 e 400 nm; UVB, entre 280 e 320 nm e UVC, entre 100 e 280 nm. A camada de ozônio e a atmosfera terrestre absorvem toda luz UVC e grande parte de luz UVB (Rowland, 2006)

e, assim, o que atinge a superfície terrestre é luz UVA e uma fração de luz UVB. Por apresentar maior comprimento de onda, a luz UVA é menos energética e possui maior penetração na pele quando comparado com luz UVB (Fig. 3A). Porém, mesmo atingindo somente a epiderme, a luz UVB é a maior responsável pelo efeito biológico nocivo de luz UV sobre as células por ser mais absorvida pelas moléculas de DNA (absorção máxima em 260 nm – na faixa de UVC), causando 90% dos danos provocados pela luz solar (Woollons et al., 1997). Uma vez absorvida, a luz UV induz reações nas bases do DNA, gerando lesões conhecidas como fotoprodutos de DNA. Estes promovem grandes distorções na estrutura do DNA, o que compromete mecanismos vitais para a célula por promover um bloqueio físico das maquinarias de replicação e transcrição do DNA (Tornaletti, 2009).

Os fotoprodutos formados mais comuns são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Os CPDs resultam de ligação covalente entre pirimidinas adjacentes da mesma cadeia de DNA pela formação de um anel de ciclobutano nas posições C-5 e C-6, enquanto os 6-4PPs são resultado da ligação covalente não cíclica entre duas pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA, entre as posições C-6 e C-4, sem formação de anel (Rastogi et al., 2010) (Fig. 3B). A proporção de fotoprodutos de DNA formados, tanto por luz UVC e UVB, é de 75% de CPD e 25% de 6-4PPs (Kobayashi et al., 2001; Schuch et al., 2009). Porém, enquanto CPD é formado de maneira aleatória na cromatina, 6-4PP apresentam diferente distribuição com formação preferencial em regiões entre nucleossomos (Mitchell et al., 1990). Os 6-4PP apresentam maior distorção na dupla-hélice e, apesar de serem menos abundantes, são removidos mais rapidamente do que CPDs

por mecanismos de reparo do DNA (Costa et al., 2003). O fotoproduto 6-4PP é praticamente todo removido em 6 h, enquanto que 50% de CPD ainda persiste 24 h após a irradiação com luz UV (Kobayashi et al., 2001). Assim, as duas lesões podem contribuir para induzir a morte celular, porém em células proficientes em reparo de DNA, o reparo rápido de 6-4PP faz com que CPDs contribuam mais com as complicações celulares (Lima-Bessa et al., 2008).

A replicação do DNA lesionado pode resultar em mutação pontual por substituição de bases. A luz UV induz um padrão de mutações, conhecido como assinatura mutacional da luz UV, com a conversão de uma citosina (C) em uma timina (T) em sítios dipirimídicos (Brash et al., 1991). Existem diferentes explicações para esse fenômeno, revisados por Ikehata e Ono, 2011. Polimerases com alta fidelidade são bloqueadas pelas lesões, mas as células dispõem de polimerases especializadas que conseguem transpor essas lesões, porém com tendência maior de incorporar erros. Essas polimerases tendem a adicionar adenina, independente da base na fita molde e assim, após duas rodadas de replicação, uma citosina pode ser convertida em uma timina (Fig. 3C). Foi observado também que CPD são induzidos em maior quantidade em 5-metilcitosina de sítios dipirimídicos. A citosina em um CPD é instável e facilmente sofre deaminação, se transformando em uracila (U). Porém, se uma 5-metilcitosina desaminar, esta será transformada em timina e mesmo uma replicação sem erros resultará em mutação pontual por substituição de base (Fig. 3C). Dessa forma, se as lesões não forem removidas antes do início da replicação, mutações pontuais poderão ser formadas e contribuir para o processo de carcinogênese, aumentando o risco de câncer de pele após exposição à luz UV.

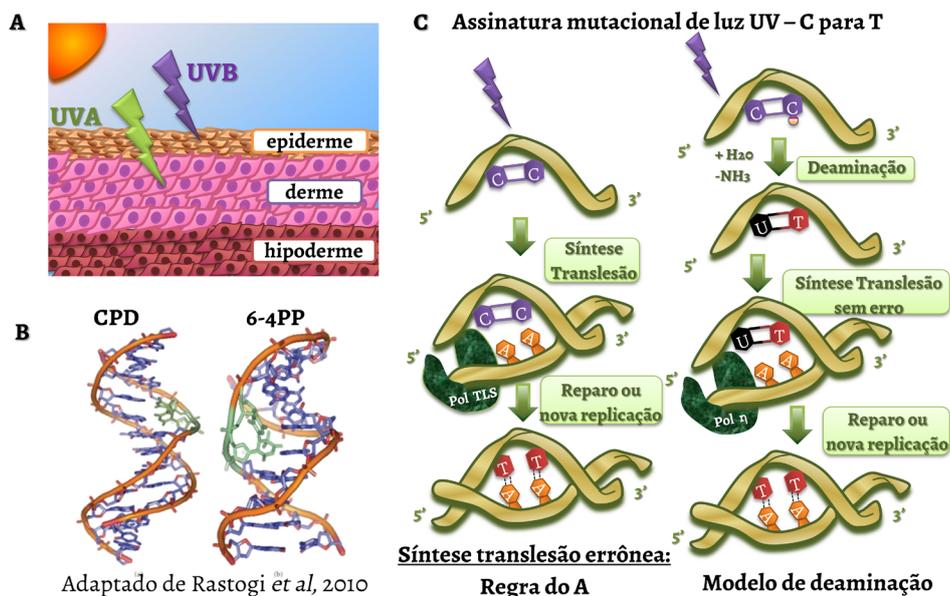


Figura 3. Luz UV: indução de danos no DNA e sua transformação em mutações pontuais. A) A Luz UVC é absorvida pela camada de ozônio de atmosfera terrestre. Da radiação solar que atinge a superfície, a porção de luz UVB possui menor penetração em relação à luz UVA, devido ao menor comprimento de onda e maior energia. B) Os dois principais fotoprodutos induzidos pela absorção de luz UV pela molécula de DNA são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Estruturas moleculares foram adaptadas da revisão de Rastogi, et al 2010. C) A replicação de dímeros pode resultar em mutações pontuais. A mutação de citosina para timina é a mais comum após irradiação com luz UV e é chamada de assinatura de UV. Dois modelos explicam como isso poderia acontecer: A inserção sempre de adenina oposta a um dímero por polimerases síntese translesão ou a replicação de uracila, resultado da desaminação da citosina em um dímero de pirimidina.

### Dímeros de pirimidina durante a transcrição

A transcrição da informação do DNA é responsável pela síntese de RNA e subsequentemente de proteína que coordenam o metabolismo, sendo essencial para o funcionamento e sobrevivência celular. Diferente da replicação do DNA, nenhuma RNA polimerase especializada em transpor o bloqueio gerado pelos fotoprodutos foi descoberta e, dessa forma, outras estratégias são usadas para continuar a transcrição durante todo o ciclo celular.

Foi visto na década de 80, em células de hamster, que o reparo de CPD é muito mais eficiente na fita transcrita do gene da diidrofolato redutase (DHFR) quando comparado a sequências de DNA ou genes não transcritos, levando à descoberta do reparo acoplado à transcrição (TCR – transcription coupled repair) (Bohr et al. 1985). Dessa forma, durante as fases em que não ocorre a duplicação do genoma - G0/G1 e G2/M - o reparo de DNA é focado na porção do genoma em que possam existir bloqueios de polimerase: nos genes ativos. Assim, a função do TCR é provavelmente remover obstruções para a RNA polimerase de maneira mais rápida, já que sinalização de morte por apoptose é induzida em células deficientes, onde o bloqueio da transcrição é persistente (Ljungman e Zhang, 1996).

### Dímeros durante a replicação – Síntese Translesão e mecanismos alternativos

Apesar de que mutações no DNA possam ser vantajosas ou neutras para a sobrevivência, a maior parte será deletéria e poderá comprometer controle da divisão celular, resultando em tumorigênese. Durante a fase S, todo o genoma está vulnerável a bloqueios e complicações decorrentes de lesões no DNA. Bloqueio da replicação pode levar ao colapso da forquilha, quebras no DNA e instabilidade genômica através de aberrações cromossômicas, como translocações e aneuploidias. Dessa forma, a estabilização e recuperação de forquilhas de replicação bloqueadas – mesmo sem a remoção das lesões no DNA – são essenciais para a integridade genômica e, assim, as vias de tolerância ao dano no DNA podem ser divididas em síntese translesão (TLS – translesion synthesis) e troca de fita molde (Template Switch) (Chang e Cimprich, 2009).

As polimerases replicativas com alta fidelidade, como Pol  $\alpha$ , Pol  $\delta$  e Pol  $\epsilon$ , pertencem à família B de DNA, mas são encontradas em células de mamíferos 8 polimerases com sítios catalíticos mais abertos e capazes de realizar a síntese translesão. Quatro delas pertencem à da família Y de DNA polimerases: Pol  $\eta$  (POLH), Pol  $\iota$  (POLI), Pol  $\kappa$  (POLK) e REV1; uma à família B de DNA polimerases: Pol  $\zeta$ , cuja subunidade catalítica é REV3L e duas à família A, com Pol  $\theta$  (POLQ) e Pol  $\nu$  (POLN) (Ghosal and Chen 2013), além da recém-descoberta DNA primase e polimerase TLS designada de PrimPol (Bianchi et al., 2013). As polimerases TLS possuem especificidade diferente para distintos danos no DNA. Por exemplo, Pol  $\eta$  insere preferencialmente duas adeninas opostas a um CPD de timinas (T<sup>A</sup>T), enquanto que Pol  $\kappa$  consegue transpor sem erros lesões em guanina induzidas por benzopireno. Polimerases TLS são consideradas propensas a erro de incorporação devido à maior frequência de erros em replicação do DNA não lesionado quando

comparado às polimerases clássicas da família B (McCulloch e Kunkel, 2008), entretanto, dependendo da polimerase TLS recrutada, a lesão pode ser replicada praticamente sem erro como Pol  $\eta$  tendo CPD de timinas (T<sup>A</sup>T) como molde (Johnson et al., 2000). A outra lesão gerada por luz UV, o dímero 6-4PP, possui uma distorção muito maior e não pode ser replicada por Pol  $\eta$  e estudos indicam que Pol  $\zeta$  e REV1 são necessárias para transpor essa lesão, porém com maior taxa de mutagênese (Nakajima et al., 2004).

Já a troca de fita molde utiliza proteínas de recombinação homóloga para temporariamente usar a cromátide-irmã não lesionada como molde de modo que seja possível transpor a lesão e continuar a replicação (Chang e Cimprich, 2009).

### Removendo dímeros – Reparo por Excisão de Nucleotídeos

A remoção dos fotoprodutos, nos humanos, é realizada somente pela via de reparo do DNA denominada de reparo por excisão de nucleotídeos (nucleotide excision repair - NER). Esta via é flexível e versátil, pois reconhece diferentes lesões que promovem distorções na dupla hélice do DNA (Nousspikel, 2009). Podemos dividir o NER em duas subvias pela diferença no reconhecimento da lesão. O primeiro é o reparo acoplado à transcrição, o qual se restringe a danos em fitas ativamente transcritas, com reconhecimento iniciado pelo bloqueio da RNA polimerase II e envolve as proteínas CSA, CSB, além da recém-descoberta UVSSA. O segundo é o reparo do genoma global, responsável pela remoção das lesões em regiões não transcritas do genoma, sendo o reconhecimento feito pelo complexo XPC-hHR23B e por DDB1-DDB2-CUL4A.

O caminho subsequente ao reconhecimento é igual para as duas vias e começa com a abertura da dupla hélice pelas helicases XPB e XPD, que fazem parte do complexo de transcrição TFIIH. Em seguida, as proteínas XPA e RPA se juntam e estabilizam o complexo e, no próximo passo, as endonucleases XPF cliva na extremidade 5' e a lacuna é preenchida pela polimerase replicativa, que utiliza como molde a fita complementar. Por fim, a endonuclease XPG cliva na extremidade 3', excisando o fragmento de 30 nucleotídeos e uma DNA ligase completa o reparo da lesão (Fig. 4) (Hana-walt e Spivak, 2008; Kamileri et al., 2012).

O reparo por excisão de nucleotídeos depende de mudanças na configuração da cromatina de tal forma que o reconhecimento e a excisão dos danos no DNA ocorrem de maneira eficiente. O complexo DDB1-DDB2-CUL4A representa um dos elos descobertos entre o reparo global e modificações pós-traducionais de histonas. A via de NER é mais eficiente em DNA nu em comparação com DNA em cromatina (Sugasawa et al., 1993) e é mais lenta em regiões de heterocromatina (Araki et al., 2000), mostrando que, além de regiões transcritas, outras porções do genoma podem ter diferença na remoção de danos no DNA, o que demonstra a importância do remodelamento da cromatina para o funcionamento do reparo de DNA.

Muitas proteínas de NER foram descobertas pela associação com algumas síndromes humanas raras com herança autossômica recessiva, dentre as quais se encontra o xero-

derma pigmentosum (XP). Pacientes com XP apresentam elevada fotossensibilidade, um aumento de quase 1000 vezes na frequência de tumores de pele em regiões expostas à luz solar e nos olhos, além disso, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem anormalidades neurológicas. São descritos oito grupos de complementação para a síndrome XP: sete deles com mutações em genes cujos produtos proteicos estão diretamente envolvidos na cascata de NER (XP-A a XP-G) e um grupo variante (XP-V) com deficiência na polimerase de síntese translesão pol  $\eta$  (Cleaver et al., 1999a). A sensibilidade de células de pacientes XP correlaciona com a participação de diferentes proteínas na via de NER: célula de paciente XP-A (deficiente na proteína XPA) é a mais sensível à luz UVB, pois apresenta deficiência tanto da via global quanto da acoplada à transcrição, enquanto que células de paciente XP-C apresentam sensibilidade menor, já que a deficiência é só na via de reparo global. Célula de paciente XP-V não apresenta deficiência em NER, porém a deficiência na síntese translesão de pol  $\eta$  acarreta em uma ligeira sensibilidade (Fig. 5).

### Diante de tantas ameaças: Sinalização e controle do Ciclo Celular

Células em proliferação são em geral mais susceptíveis aos efeitos tóxicos de danos no DNA do que células quiescentes. Isso se deve às complicações dramáticas que podem acontecer com a replicação do DNA lesionado e durante a segregação cromossômica com quebras no DNA (Ljungman, 2010). As células ativam vias de resposta ao dano no DNA que promovem parada no ciclo celular, o qual resulta em mais tempo para que as enzimas de reparo de DNA limpem o genoma antes da síntese do DNA ou da segregação cromossômica (Harrison e Haber, 2006).

Em resposta a danos causados por luz UV, a quinase ATR (ataxia telangectasia and Rad3 related) é ativada e catalisa a fosforilação de centenas de proteínas-alvo. Uma estrutura no DNA é comum a diversos processos induzidos por danos no DNA e o responsável por estimular a atividade de ATR: DNA simples-fita (ssDNA – single stranded DNA) recoberto pelo heterotrímero RPA (replication protein A) (Cimprich e Cortez, 2008; Zou e Elledge, 2003). Células em fase G1 do ciclo celular geram ssDNA de 30 nucleotídeos como intermediário do processamento de NER e esta lacuna é estendida pela exonuclease Exo1 gerando ativação de ATR (Giannattasio et al., 2010; Hanasoge e Ljungman, 2007). Uma vez que o complexo com ATR estiver ativo na lesão do DNA, uma ampla variedade de substratos serão fosforilados, incluindo a Chk1 (checkpoint kinase 1 - Chk1). Uma vez ativada, esta proteína efetora induz uma rápida degradação de Cdc25A (Mailand, 2000), a qual inibe o complexo da Ciclina E/CDK2 (CDK2 - cyclin-dependent kinase 2) e é responsável pela transição entre G1/S. Além disso, o fator de transcrição p53 é fosforilado por ATR na serina 15, o que resulta em estabilização de p53 e aumento da transcrição de seus genes-alvo. Um alvo chave de p53 é a proteína p21, que atua como inibidor de Ciclina E/CDK2 e assim também promove parada do ciclo celular em G1 (Kastan e Bartek, 2004). Assim, Chk1-Cdc25A implementa uma resposta rápida e atrasa a transição G1/S em algumas horas, enquanto a prorrogação da parada em fase G1 é sustentada pelo mecanismo depen-

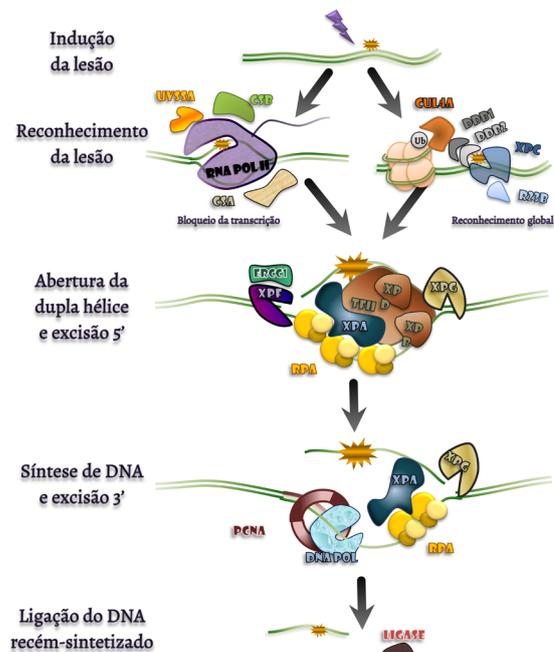


Figura 4. Modelo de reparo por excisão de nucleotídeos. O reconhecimento da lesão pode acontecer de duas formas: Bloqueio da RNA polimerase ou reconhecimento global através dos complexos de XPC e DDB1 e DDB2. Essas etapas envolvem remodelamento da cromatina, com modificação da histona, o que facilita o acesso à lesão. Em seguida TFIIF é recrutado, acontece a abertura da dupla-hélice e excisão da extremidade 5' por XPF-ERCC1. A síntese de novo do DNA preenche a lacuna e a extremidade 3' é excisada por XPG. Por fim, uma DNA ligase sela o DNA recém-sintetizado finalizando o reparo do DNA.

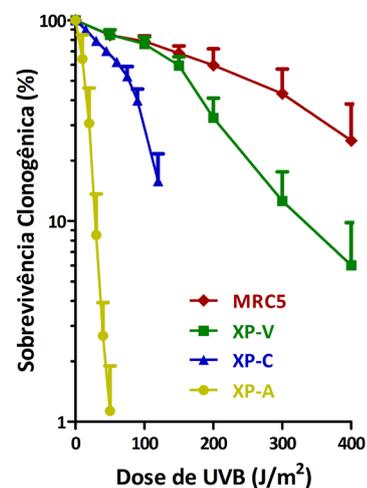


Figura 5. Sobrevivência de células mutantes em proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos ou em síntese translesão, após irradiação com luz UVB. Dados próprios obtidos através de sobrevivência clonogênica em que barras de erro correspondem ao desvio padrão de três experimentos independentes. Células MRC5 são células selvagens e apresentam a menor sensibilidade à luz UVB. Células XP-V são deficientes em pol  $\eta$  (portanto, em síntese translesão), mas proficientes em reparo por excisão de nucleotídeos e são apenas um pouco mais sensíveis à luz UVB em relação a células selvagens. Já células XP-C, possuem deficiência somente no reconhecimento global de reparo por excisão de nucleotídeos pela mutação na proteína XPC e são mais sensíveis do que XP-V, porém a maior sensibilidade é observada na célula XP-A, devido à deficiência nas duas subvias de reparo por excisão de nucleotídeos.

dente de p53 (Fig. 6B). Em fase S, os fotoprodutos bloqueiam a maquinaria de replicação e isso gera desacoplamento entre a DNA polimerase e a helicase (Byun et al., 2005), o qual resulta no sinal para a ativação de ATR - ssDNA recoberto por RPA - e fosforilação de Chk1, que em fase S resultará em inibição de novas origens de replicação (Heffernan et al., 2002). Esse efeito é mais visível em células deficientes na ativação do ponto de parada de G1 (como por exemplo, deficientes em p53) e na síntese translesão de pol  $\eta$ , já que mais ssDNA será formado por mais bloqueios de forquilha de replicação, resultando em acúmulo de células em fase S (Fig. 6D). Células com deficiência na ativação do ponto de parada de G1, mas com síntese translesão normal, progredirão à fase G2 onde tanto lacunas opostas aos fotoprodutos (Callegari et al., 2010) quanto intermediários de NER ativarão ATR e resultarão em parada do ciclo celular em G2 (Fig. 6C).

**ATR: o bombeiro controlando o fogo no DNA**

O fosforiloma de ATR revelou 570 alvos de fosforilação após irradiação com luz UV, sendo 498 nunca antes descritos (Stokes et al., 2007). Entre esses alvos, muitos alvos envolvidos com a replicação do DNA (MCMs, RPA, RFC, TopBP1 e DNA polimerases como pol  $\eta$ ), reforçando um papel importante no controle de origem de replicação, estabilidade da forquilha e recuperação da replicação. Além desses, muitos alvos estão relacionados a reparo do DNA como XPA (envolvida em NER), FANCD2 (envolvida em reparo de cross-link), BRCA1, 53BP1, WRN e BLM (envolvidas em recombinação homóloga) (Fig. 7). Porém, é mais impressionante o grande número de alvos em outras vias como sistema ubiquitina e proteassomo, processamento de RNA e reguladores transcricionais, matriz nuclear, remodelamento de cromatina, ritmo circadiano, diferenciação celular e desenvolvimen-

to. De fato o maior grupo fosforilado por ATR é um grupo de proteínas envolvidas em metabolismo de RNA - transcrição, processamento, estabilidade do RNAm - além de tradução de mRNAs.

O nocaute de ATR em modelos animais resulta em letalidade embrionária (Brown e Baltimore, 2000). Porém, através de modelos com nocaute condicional - eliminando ATR somente no animal adulto - ou com mutação em heterozigose foi possível constatar que a vida é muito estressante sem ATR, mesmo sem lesões exógenas. Com o modelo heterozigótico foi observado aumento de estresse replicacional durante a embriogênese - fase quando a proliferação é muito difundida - com aumento da fosforilação da histona H2AX e aumento de morte de células resultando em deformações (Murga et al., 2009). Com o nocaute condicional foi observado envelhecimento precoce no indivíduo adulto - pelos cinzas, osteoporose, cifose e fibrose - devido à perda de homeostase tecidual relacionada à incapacidade de renovação celular provocada pela redução de células tronco e progenitoras (Ruzankina et al., 2007). Assim, a função de ATR não é somente relacionada a resposta a danos no DNA causados por luz UV, mas também para responder a qualquer complicação durante a replicação. Regiões do genoma - mesmo sem danos externos - podem ser obstáculos à progressão da forquilha, como regiões altamente repetitivas que podem formar grampos e bloquear a replicação (Wells, 1996) ou colisões entre transcrição e replicação, principalmente em genes longos (Helmrich et al., 2011). De fato, ATR é responsável por evitar quebras através da regulação de sítios frágeis (Casper et al., 2002), em que são encontradas repetições CGG e AT, além de estruturas não-canônicas de DNA diferentes de DNA-B (Aguilera e Gómez-González, 2008).

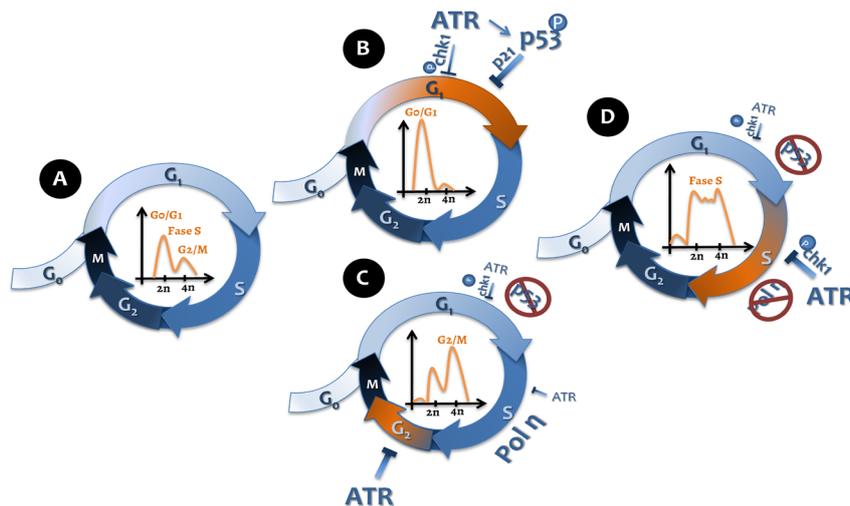


Figura 6. Resposta ao dano no DNA após exposição à luz UV: Integrando ciclo celular com tolerância e reparo do DNA. A) Fibroblasto normal de pele não irradiado tem progressão normal pelo ciclo celular. Ao centro, visualização do perfil do ciclo celular mostrando dois picos, correspondendo a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> com 2N de DNA (em maior número por ser a fase da intérfase com maior tempo de duração) e G<sub>2</sub>/M com 4 N de DNA. B) Fibroblasto irradiado com luz UV tem ativação da quinase ATR e de p53, resultando em acúmulo de células em G1 (ponto de parada em G1). C) Fibroblasto transformado (Ex. SV-40) não possui p53 ativo e, dessa forma, células irradiadas progredem com danos no DNA pelo ciclo celular através de síntese translesão, realizada principalmente por Pol  $\eta$ . Como neste caso as lesões no DNA persistem, a ativação de ATR provocará acúmulo de células em G2, antes que células entrem em mitose ainda com danos (ponto de parada em G2/M). D) Fibroblasto imortalizado (Ex. SV-40) que não possui p53 ativo e é deficiente em Pol  $\eta$  (células XP-V) possui bloqueio da replicação após irradiação com luz UV pela deficiência na síntese translesão. Dessa forma, ATR é ativado em fase S, provoca acúmulo de células nesta fase do ciclo (checkpoint intra-S) e resulta em maior morte celular, visualizado ao centro pelo aumento de células com conteúdo sub-G1 de DNA.

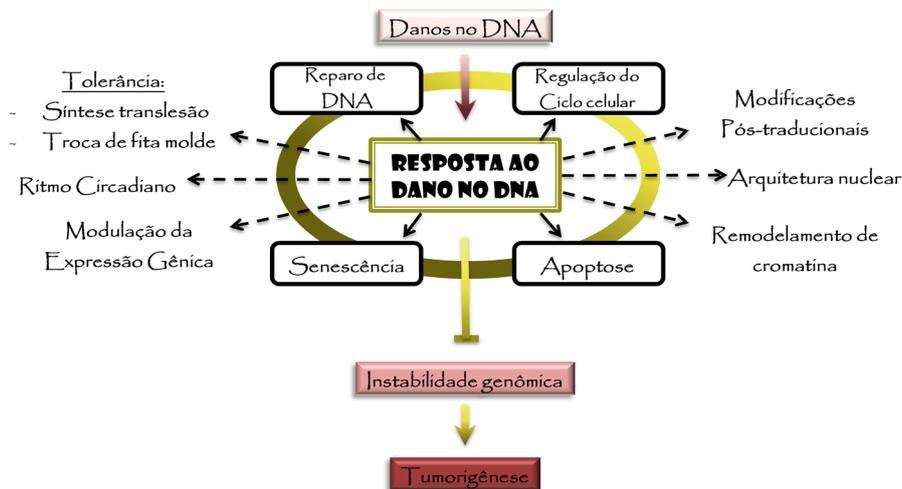


Figura 7. Danos no DNA resultam em uma ampla resposta celular, a qual diminui a instabilidade genômica e tumorigênese. Figura adaptada de Harper e Elledge, 2007. O reconhecimento da lesão ativa uma cascata de sinalização que resulta em respostas rápidas, como modificação pós-traducional de proteínas existentes, remodelamento da cromatina e alteração da arquitetura nuclear; além de respostas celulares mais demoradas, como modulação da expressão gênica com alteração da estabilidade do RNA mensageiro, processamento e síntese de genes alvos, incluindo processos como ciclo celular, reparo do DNA, mecanismos de tolerância e até ritmo circadiano. Caso a recuperação não seja possível, a resposta pode ainda induzir senescência ou a morte celular por apoptose diminuindo a chance da instabilidade genômica provocada pelos danos no DNA originar em uma célula tumoral.

### Síndromes relacionadas a defeitos em vias de reparo do DNA

A importância das respostas ao dano no DNA na fisiologia humana é exemplificada por diversas síndromes humanas causadas por mutações nessas vias. Os fenótipos variam de anormalidades neurológicas, envelhecimento precoce a predisposição a câncer. As principais síndromes, incluindo respectiva predisposição a câncer, estão resumidas na revisão de (Ghosal e Chen, 2013) e adaptadas na tabela 1.1.

Existem diferentes síndromes com deficiências em proteínas da via de reparo por excisão de nucleotídeos: Xeroderma Pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne (CS), Tricotiodistrofia (TTD) e Síndrome sensível a UV (UVSS) (Cleaver et al., 2009; Menck e Munford, 2014; Nakazawa et al., 2012). Pacientes XP apresentam elevada fotossensibilidade e a idade mediana de aparecimento de câncer de pele é antes dos 10 anos de idade. Mutações em XPC e DDB2 (XPE), ou seja, somente na subvia de reparo global de NER, não apresentam problemas neurológicos, enquanto que deficiências somente na subvia acoplada à transcrição (pacientes CS) não aumentam o risco de câncer mas apresentam sintomas neurológicos e de desenvolvimento graves. Cérebros de pacientes CS apresentam grande quantidade de lesões por oxidação e evidências mostram que CSB é importante para o funcionamento da mitocôndria e, assim, parte do fenótipo da síndrome de Cockayne poderia estar relacionada à mitocôndria (Berquist et al., 2012) ou a outras funções de CSA e CSB relacionados à transcrição e remodelamento de cromatina. A síndrome UVSS também induz fotossensibilidade, porém, diferente de pacientes CS, não induz problemas neurológicos. A proteína mutada UVSSA atua em resposta a luz UV, mas não a danos por estresse oxidativo (Spivak e Hanawalt, 2006), diferente de CSB, o que pode ajudar a explicar os diferentes fenótipos (Tabela 1). Deficiências na transcrição também parece ser a principal causa da síndrome TTD – caracterizada por cabelo quebradiço e deficiente em enxofre - em que a falta do fator de transcrição TFIIH prejudica a síntese de RNA

em grande quantidade em células diferenciadas como cabelo, unha e células imunes (Cleaver et al., 2009). Assim, a pleiotropia de funções das proteínas, com funções além de reparo do DNA, pode auxiliar a explicar as variações de fenótipo.

Existem ainda síndromes com deficiência em outras vias de reparo do DNA ou na sinalização em resposta a dano. Defeitos na via de reparo de emparelhamento errôneo resultam na síndrome de Lynch, caracterizado principalmente pelo aumento de câncer colorretal. Mutações em BRCA1 e BRCA2 resultam em câncer hereditário de mama e ovário. Deficiências em genes envolvidos em recombinação homóloga também resultam nas síndromes de Werner, Bloom e Rothmund Thomson, com fenótipo de envelhecimento precoce e aumento de linfomas e sarcomas. Mutação em ATM é causa da ataxia telangiectasia, doença neurológica que possui maior incidência de leucemias. Mutação em heterozigose de ATR resulta na síndrome de Seckel que, assim como nos modelos em camundongo, apresenta problemas de desenvolvimento como microcefalia e envelhecimento precoce, tendo também relatos de aumento de leucemia. Outra doença que aumenta a incidência de leucemia é anemia Fanconi, com mutações em diversos genes da via de reparo de cross-links. Mutações em p53 dão origem à síndrome de Li-Fraumeni, também caracterizada por maior risco de câncer em diversos órgãos (tabela 1).

### Instabilidade genômica e câncer: Como potencializar terapia antitumoral?

A tumorigênese é um processo de múltiplos passos, em que a progressão depende em uma acumulação sequencial de mutações em uma mesma célula, que em geral acontece após eventos de replicação. Essas mutações resultam em perda da homeostase tecidual já que as células transformadas adquirem vantagens seletivas pelo aumento da taxa de proliferação, diminuição da indução de morte celular, além da criação de um microambiente propenso ao crescimento (Hanahan e Weinberg, 2011). A forma mais comum de modular

o ciclo celular e combater a progressão tumoral é explorar o efeito de drogas que lesionem o DNA. Paradas no ciclo celular e morte ocorrem após exposição a agentes causadores de danos no DNA, principalmente durante a replicação do DNA na fase S. Tentativas de replicar DNA lesionado levam ao aumento de morte celular e tornam tratamentos que lesionem o DNA mais citotóxicos em células em proliferação quando comparadas com células quiescentes ou diferenciadas (Helleday et al., 2008). Entretanto, a toxicidade pode ser reduzida pela superativação de vias de reparo do DNA, o que torna a resposta ao dano no DNA um alvo de intervenção terapêutico promissor. Além de poder reverter a resistência de terapias atuais, pode resultar em mortalidade seletiva das células tumorais (Curtin, 2012). Assim, um entendimento da resposta ao dano no DNA não só contribuirá com o conhecimento de desenvolvimento de câncer, mas também para o tratamento da doença.

**Conclusões e questões futuras**

A importância da estabilidade e manutenção do DNA é exemplificada nos diversos mecanismos celulares que foram selecionados durante a evolução. Cientificamente, a área de Reparo do DNA iniciou com pesquisas envolvendo efeitos

biológicos das radiações, principalmente a luz ultravioleta, a qual estamos expostos diariamente devido ao Sol. A natureza da lesão foi descrita e sua consequência compreendida: bloqueio físico de replicação e de transcrição provocado pelo dano no DNA. As células dispõem de vias de remoção de danos – cuja eficiência é maior na região de genes ativos - mas também de mecanismos de tolerância para evitar bloqueios de replicação. Deficiências nessas vias aumentam a taxa de mutações induzidas por luz UV e consequentemente de tumores de pele, evidenciadas pelas síndromes como xeroderma pigmentosum. Porém, nas últimas duas décadas têm se descoberto que a resposta celular a danos no DNA é muito mais ampla que apenas reparo do DNA e envolve uma sinalização complexa, com parada do ciclo celular, remodelamento da cromatina e modulação da expressão gênica, como a mediada pela quinase ATR após exposição à luz UV. A manutenção da replicação sem complicações é essencial para evitar mutações e tumorigênese, mas aparentemente também está relacionada a fenótipos de envelhecimento, como os observados em animais com deficiências em ATR. Células com estresse replicacional exacerbado podem morrer por apoptose e essa tem sido uma abordagem frequente no tratamento anti-tumoral, através de quimioterápico e radiação

Tabela 1. Resumo das principais síndromes causadas por mutações em vias de resposta ao dano no DNA e sua predisposição à tumorigênese. Adaptado de Ghosal e Chen (2013).

Síndrome	Mutações	Predisposição a câncer	Via afetada
<b>Xeroderma Pigmentosum</b>	XPA; XPB; XPC; XPD; XPE; XPF; XPG ou POLH	Câncer de pele	NER ou TLS
<b>Síndrome de Cockayne</b>	CSA ; CSB ; XPB; XPD; XPG		
<b>Tricotiodistrofia</b>	XPD; XPB; TTDA		TCR-NER
<b>Síndrome sensível a UV</b>	UVSSA		
<b>Anemia Fanconi</b>	FANCA; FANCB; FANCC; BRCA2; FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG; FANCI; BACH1; FANCL; SLX4	Leucemia mielóide aguda	Reparo de ICL; recombinação homóloga
<b>Síndrome de Li-Fraumeni</b>	p53	Câncer de mama; cérebro; leucemia e sarcoma	Sinalização em resposta a dano no DNA
<b>Síndrome de Seckel</b>	ATR	Leucemia mielóide aguda	Sinalização em resposta a dano no DNA
<b>Ataxia Telangiectasia</b>	ATM	Leucemia; linfoma; câncer de mama	Sinalização em resposta a dano no DNA
<b>Câncer de mama familiar</b>	BRCA1 BRCA2	Câncer de mama e ovário	
<b>Síndrome de Bloom</b>	BLM	Linfoma e leucemia	Recombinação homóloga
<b>Síndrome de Werner</b>	WRN	Sarcoma	
<b>Síndrome de Rothmund Thomson</b>	RECQL4	Câncer de pele e osteosarcoma	
<b>Síndrome de Lynch</b>	MSH2; MLH1; MSH6; PMS2;	Câncer colorretal; estômago; intestino; endométrio; glioblastoma	Reparo de emparelhamento errôneo

que induzem danos no DNA. Na última década, cada vez mais pesquisa tem sido realizada para encontrar inibidores de resposta a danos no DNA, como por exemplo inibidores de ATR, para potencializar a morte provocada por quimioterápicos, com resultados promissores (Reaper et al., 2011, Josse et al., 2014).

Porém, várias questões ainda permanecem em relação a respostas a danos no DNA. Por exemplo, regiões transcritas pelo genoma são reparadas mais rapidamente do que regiões não-transcritas, porém não sabemos se existe uma variação da eficiência em escala genômica: genes mais expressos (e provavelmente mais bloqueados por danos no DNA) seriam reparados mais rapidamente? Já que quanto maior o gene, maior a chance de acumular lesões no DNA (imagine o tempo para remover lesões do gene da distrofina com 2,5 Mb), o tamanho do gene interfere na resposta ao dano no DNA? Poderia a necessidade de reparo de um gene, influenciar na evolução de íntrons e tamanho gênico? Por que observamos síntese translesão na replicação, mas não em transcrição? Qual modelo de mutação após exposição à UV contribui mais para a assinatura mutacional de luz UV? O que contribui mais para a tumorigênese após exposição à luz UV, mutações pontuais durante a fase S ou rearranjos decorrentes de quebras na forquilha de replicação bloqueada? Como exatamente um bloqueio da replicação resulta em quebras no DNA? ATR é importante, mesmo sem a ocorrência de danos exógenos no DNA provocados por luz UV. Quais tipos de danos endógenos ou estruturas não-canônicas no DNA realmente poderiam afetar a replicação? Reverter ou controlar essas “lesões endógenas” seria suficiente para retardar o envelhecimento? Isso envolveria danos no DNA por estresse oxidativo e ATR estaria também relacionado a essa resposta?

## Agradecimentos

Agradeço ao prof. Carlos Menck por toda orientação e oportunidade de fazer parte do Laboratório de Reparo de DNA do ICB-USP. Agradeço também ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES para a realização de meu doutorado.

## Referências

- Aguilera A, Gómez-González B. 2008. Genome Instability: A Mechanistic View of Its Causes and Consequences. *Nature Reviews. Genetics* 9 (3): 204–17.
- Araki M, Masutani C, Maekawa C, Watanabe Y, Yamada A, Kusumoto R, Sakai D, Sugawara K, Ohkuma Y, Hanaoka F. 2000. Reconstitution of Damage DNA Excision Reaction from SV40 Minichromosomes with Purified Nucleotide Excision Repair Proteins. *Mutation Research* 459: 147–60.
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Gulberg P, et al. 2005. DNA Damage Response as a Candidate Anti-Cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis. *Nature* 434: 864–70.
- Berquist BR, Canugovi C, Sykora P, Wilson DM, Bohr V. 2012. Human Cockayne Syndrome B Protein Reciprocally Communicates with Mitochondrial Proteins and Promotes Transcriptional Elongation. *Nucleic Acids Research* 40: 8392–8405.
- Beukers R, Berends W. 1960. Isolation and Identification of the Irradiation Product of Thymine. *Biochimica et Biophysica Acta* 41: 550–51.
- Bianchi K, Rudd SG, Jozwiakowski SK, Bailey LJ, Soura V, Taylor E, Stevanovic I, et al. 2013. PrimPol Bypasses UV Photoproducts during Eukaryotic Chromosomal DNA Replication. *Molecular Cell* 52 (4):566–73.
- Bohr V, Smith C, Okumoto DS, Hanawalt PC. 1985. DNA Repair in an Active Gene: Removal of Pyrimidine Dimers from the DHFR Gene of CHO Cells Is Much More Efficient than in the Genome Overall. *Cell* 40 (2): 359–69.
- Boyce RP, Howard-Flanders P. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. Coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51: 293–300.
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutation in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10124–10128.
- Brown EJ, Baltimore D. 2000. ATR Disruption Leads to Chromosomal Fragmentation and Early Embryonic Lethality. *Genes & Development* 14 (4): 397–402.
- Byun TS, Pacek M, Yee M, Walter JC, Cimprich KA. 2005. Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint. *Genes & Development* 19: 1040–52.
- Callegari J, Clark E, Pneuman A, Kelly TJ. 2010. Postreplication Gaps at UV Lesions Are Signals for Checkpoint Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (18): 8219–24.
- Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, Glover TW. 2002. ATR Regulates Fragile Site Stability. *Cell* 111 (6): 779–89.
- Chang DJ, Cimprich KA. 2009. DNA Damage Tolerance: When It's OK to Make Mistakes. *Nature Chemical Biology* 5 (2): 82–90.
- Cimprich KA, Cortez D. 2008. ATR: An Essential Regulator of Genome Integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (8): 616–27.
- Cleaver JE. 1968. Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum. *Nature* 218 (5142): 652–56.
- Cleaver JE, Thompson LH, Richardson AS, States JC. 1999. A Summary of Mutations in the UV-Sensitive Disorders: Xeroderma Pigmentosum, Cockayne Syndrome, and Trichothiodystrophy. *Human Mutation* 14: 9–22.
- Cleaver JE, Lam ET, Revet I. 2009. Disorders of Nucleotide Excision Repair: The Genetic and Molecular Basis of Heterogeneity. *Nature Reviews. Genetics* 10 (11): 756–68.
- Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM. 2003. The Eukaryotic Nucleotide Excision Repair Pathway. *Biochimie* 85: 1083–99.
- Crick F. 1974. The Double Helix: A Personal View. *Nature*. 248(5451):766-9.
- Curtin NJ. 2012. DNA Repair Dysregulation from Cancer Driver to Therapeutic Target. *Nature Reviews. Cancer* 12 (12): 801–17.
- De Boer J, Andressoo JO, Wit J, Huijman J, Beems RB, Steeg H, Weeda G, et al. 2002. Premature Aging in Mice Deficient in DNA Repair and Transcription. *Science* 296: 1276–79.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1993. The Human Mutator Gene Homolog MSH2 and Its Association with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *Cell* 75: 1027–38.
- Friedberg E. 2006. DNA Repair and Mutagenesis, 2nd Edition. Washington D.C. ASM Press. (sucede a seguinte referência)
- Friedberg E. 2003. DNA Damage and Repair. *Nature* 421 (6921): 436–40.
- Ghosal G, Chen J. 2013. DNA Damage Tolerance: A Double-Edged Sword Guarding the Genome. *Translational Cancer Research* 2 (3): 107–29.

- Giannattasio M, Follonier C, Tourrière H, Puddu F, Lazzaro F, Pasero P, Lopes M, Plevani P, Muzi-Falconi M. 2010. Exo1 Competes with Repair Synthesis, Converts NER Intermediates to Long ssDNA Gaps, and Promotes Checkpoint Activation. *Molecular Cell* 40 (1): 50–62.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, et al. 2005. Activation of the DNA Damage Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions. *Nature* 434: 907–13.
- Hanahan D, Weinberg R. 2011. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144 (5): 646–74.
- Hanasoge S, Ljungman M. 2007. H2AX Phosphorylation after UV Irradiation Is Triggered by DNA Repair Intermediates and Is Mediated by the ATR Kinase. *Carcinogenesis* 28 (11): 2298–2304.
- Hanawalt PC, Spivak G. 2008. Transcription-Coupled DNA Repair: Two Decades of Progress and Surprises. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (12): 958–70.
- Harper JW e Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*. 28(5):739-745
- Harrison JC, Haber JE. 2006. Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint. *Annual Review of Genetics* 40: 209–35.
- Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK. 2002. An ATR- and Chk1-Dependent S Checkpoint Inhibits Replicon Initiation Following UVC-Induced DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 22 (24): 8552–61.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma R. 2008. DNA Repair Pathways as Targets for Cancer Therapy. *Nature Reviews. Cancer* 8 (3): 193–204.
- Helmrich A, Ballarino M, Tora L. 2011. Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Molecular Cell* 44 (6): 966–77.
- Hollaender A, Claus WD. 1936. The bactericidal effect of ultraviolet radiation on *Escherichia Coli* in liquid suspensions. *The Journal of General Physiology* 19: 753–65.
- Holliday R. 1964. A Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genetical Research* 5: 282–304.
- Ikehata H, Ono T. 2011. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research* 52 (2): 115–25.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. 1996. Repair of Products of Oxidative DNA Base Damage in Human Cells. *Nucleic Acids Research* 24 (8): 1389–94.
- Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L. 2000. Fidelity of Human DNA Polymerase  $\epsilon$ . *The Journal of Biological Chemistry* 275 (11): 7447–50.
- Josse R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, Barnes CS, Jones J, Charlton PA, Pollard JR, Morris J, Doroshov JH, Pommier Y. 2014. The ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Research* 3369.2013.
- Kamileri I, Karakasioti I, Garinis G. 2012. Nucleotide Excision Repair: New Tricks with Old Bricks. *Trends in Genetics* : TIG 28 (11): 566–73.
- Kanazir D, Errera M. 1954. Metabolism of Nucleic Acids by *E. Coli B* after Ultraviolet Irradiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 14 (1): 62–66.
- Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR. 2004. Interaction of Human DNA Polymerase  $\epsilon$  with Monoubiquitinated PCNA: A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. *Molecular Cell* 14 (4): 491–500.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. 1991. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research* 51: 6304–11.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ. 1992. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* 71: 587–97.
- Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-Cycle Checkpoints and Cancer. *Nature* 432 (7015): 316–23.
- Kelner, A. 1949. Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-Violet Irradiation Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 35 (2): 73–79.
- Kobayashi N, Katsumi S, Imoto K, Nakagawa A, Miyagawa S, Furumura M, Mori T. 2001. Quantitation and Visualization of Ultraviolet-Induced DNA Damage Using Specific Antibodies: Application to Pigment Cell Biology. *Pigment Cell Research* 14 (2): 94–102.
- Lane DP, Crawford LV. 1979. T Antigen Is Bound to a Host Protein in SV40-Transformed Cells. *Nature* 278: 261–63. doi:10.1038/278261a0.
- Lima-Bessa KM, Armelini MG, Chiganças V, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CFM. 2008. CPDs and 6-4PPs Play Different Roles in UV-Induced Cell Death in Normal and NER-Deficient Human Cells. *DNA Repair* 7 (2): 303–12.
- Lindahl, T. 1974. An N-Glycosidase from *Escherichia Coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 3649–53.
- Lindahl, T. 1993. Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* 362 (6422): 709–15.
- Linzer DI, Levine AJ. 1979. Characterization of a 54K Dalton Cellular SV40 Tumor Antigen Present in SV40-Transformed Cells and Uninfected Embryonal Carcinoma Cells. *Cell* 17: 43–52.
- Ljungman M. 2010. The DNA Damage Response--Repair or Despair? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51 (8-9): 879–89
- Ljungman M, Zhang F. 1996. Blockage of RNA Polymerase as a Possible Trigger for U.V. Light-Induced Apoptosis. *Oncogene* 13: 823–31.
- Mailand N. 2000. Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science* 288 (5470): 1425–29.
- Masters M, Pardee AB. 1962. Failure of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia Coli* to Produce a Cross-Reacting Protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 56: 609–11.
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F. 1999. The XPV (xeroderma Pigmentosum Variant) Gene Encodes Human DNA Polymerase  $\epsilon$ . *Nature* 399: 700–704.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. 1998. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* 282: 1893–97.
- Matsuoka S, Ballif B, Smogorzewska A, McDonald RE, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, et al. 2007. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* 316 (5828): 1160–66.
- McCulloch SD, Kunkel T. 2008. The Fidelity of DNA Synthesis by Eukaryotic Replicative and Translesion Synthesis Polymerases. *Cell Research* 18 (1): 148–61.
- Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC. 1987. Selective Removal of Transcription-Blocking DNA Damage from the Transcribed Strand of the Mammalian DHFR Gene. *Cell* 51: 241–49.

- Menck CFM, Munford V. 2014. DNA Repair Diseases: What Do They Tell Us about Cancer and Aging? *Genetics and Molecular Biology* 37: 220–33.
- Mitchell DL, Nguyen TD, Cleaver JE. 1990. Nonrandom Induction of Pyrimidine-Pyrimidone (6-4) Photoproducts in Ultraviolet-Irradiated Human Chromatin. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 5353–56.
- Muller HJ. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66: 84–87.
- Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O. 2009. A Mouse Model of ATR-Seckel Shows Embryonic Replicative Stress and Accelerated Aging. *Nature Genetics* 41 (8): 891–98.
- Nakajima S, Lan L, Kanno S, Takao M, Yamamoto K, Eker APM, Yasui A. 2004. UV Light-Induced DNA Damage and Tolerance for the Survival of Nucleotide Excision Repair-Deficient Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 46674–77.
- Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, et al. 2012. Mutations in UVSSA Cause UV-Sensitive Syndrome and Impair RNA Polymerase II Processing in Transcription-Coupled Nucleotide-Excision Repair. *Nature Genetics* 44 (5): 586–92.
- Nouspikel T. 2009. DNA Repair in Mammalian Cells : Nucleotide Excision Repair: Variations on Versatility. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 994–1009.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids* 2010: 592980.
- Reaper, PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier J, MacCormick S, Charlton PA, Golec JMC, Pollard JR. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nature Chemical Biology*, v. 7, n. 7, p. 428–30, 2011
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr H, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68.
- Rowland SF. 2006. Stratospheric Ozone Depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361: 769–90.
- Rupert CS, Goodgal SH, Herriot RM. 1958. Photoreactivation in Vitro of Ultraviolet-Inactivated Hemophilus Influenzae Transforming Factor. *The Journal of General Physiology* 41: 451–71.
- Rupp, WD, Howard-Flanders P. 1968. Discontinuities in the DNA Synthesized in an Excision-Defective Strain of Escherichia Coli Following Ultraviolet Irradiation. *Journal of Molecular Biology* 31: 291–304.
- Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A, Brown EJ. 2007. Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell* 1 (1): 113–26.
- Schuch AP, Galhardo RS, Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CFM. 2009. Development of a DNA-Dosimeter System for Monitoring the Effects of Solar-Ultraviolet Radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8 (1): 111–20.
- Setlow RB, Carrier WL. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51: 226–31.
- Spivak G, Hanawalt PC. 2006. Host Cell Reactivation of Plasmids Containing Oxidative DNA Lesions Is Defective in Cockayne Syndrome but Normal in UV-Sensitive Syndrome Fibroblasts. *DNA Repair* 5: 13–22.
- Stokes MP, Rush J, Macneill J, Ren JM, Sprott K, Nardone J, Yang V, et al. 2007. Profiling of UV-Induced ATM/ATR Signaling Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (50): 19855–60.
- Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F. 1993. Cell-Free Repair of UV-Damaged Simian Virus 40 Chromosomes in Human Cell Extracts. I. Development of a Cell-Free System Detecting Excision Repair of UV-Irradiated SV40 Chromosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 9098–9104.
- Sugasawa K, Akagi J, Nishi R, Iwai S, Hanaoka F. 2009. Two-Step Recognition of DNA Damage for Mammalian Nucleotide Excision Repair: Directional Binding of the XPC Complex and DNA Strand Scanning. *Molecular Cell* 36 (4): 642–53.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. 1999. A Role for ATR in the DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53. *Genes & Development* 13: 152–57.
- Tornaletti, S. 2009. “DNA Repair in Mammalian Cells: Transcription-Coupled DNA Repair: Directing Your Effort Where It’s Most Needed.” *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS 66 (6): 1010–20. doi:10.1007/s00018-009-8738-x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153656>.
- van der Kemp PA, Thomas D, Barbey R, de Oliveira R, Boiteux S. 1996. Cloning and Expression in Escherichia Coli of the OGG1 Gene of Saccharomyces Cerevisiae, Which Codes for a DNA Glycosylase That Excises 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine and 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-N-Methylformamidopyrimidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5197–5202.
- Wagner R, Meselson M. 1976. Repair Tracts in Mismatched DNA Heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 4135–39.
- Walworth N, Davey S, Beach D. 1993. Fission Yeast chk1 Protein Kinase Links the Rad Checkpoint Pathway to cdc2. *Nature* 363: 368–71.
- Watson JD, Crick FHC. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* 171: 737–38.
- Wells RD. 1996. Molecular Basis of Genetic Instability of Triplet Repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 2875–78.
- Wilson JH, Berget PB, Pipas JM. 1982. Somatic Cells Efficiently Join Unrelated DNA Segments End-to-End. *Molecular and Cellular Biology* 2: 1258–69.
- Witkin EM. 1974. Thermal Enhancement of Ultraviolet Mutability in a Tif-1 uvrA Derivative of Escherichia Coli B-R: Evidence That Ultraviolet Mutagenesis Depends upon an Inducible Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1930–34.
- Woollons A, Clingen PH, Price ML, Arlett CF, Green MH. 1997. Induction of Mutagenic DNA Damage in Human Fibroblasts after Exposure to Artificial Tanning Lamps. *The British Journal of Dermatology* 137: 687–92.
- Zou L, Elledge SJ. 2003. Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300 (5625): 1542–48.

# Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss.

Reciprocal crosses as a tool to evaluate the reproductive isolation in a Orchidaceae hybrid zone

Tiago Manuel Zanfra de Melo e Gouveia\* e Fábio Pinheiro

Instituto de Botânica de São Paulo

\*Contato: tiago.melo.gouveia@gmail.com

**Resumo.** Híbridos são descendentes do cruzamento entre indivíduos de duas espécies cujas barreiras reprodutivas não estão completamente estabelecidas. Hibridação é particularmente comum em certos gêneros da família Orchidaceae.

Na Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro ocorrem em simpatria duas espécies irmãs do gênero *Epidendrum*: *E. secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl, além de indivíduos com caracteres intermediários, supostos híbridos. Neste trabalho avaliamos a hipótese de hibridação e a intensidade do isolamento reprodutivo entre estas espécies. Utilizando experimentos de polinização recíproca foi possível detectar hibridação entre as espécies. O baixo sucesso reprodutivo dos híbridos formados é uma importante barreira reprodutiva que promove isolamento reprodutivo forte o suficiente para manter a coesão destas espécies.

**Palavras-chave.** *Barreiras reprodutivas; Epidendrum; Híbridos; Sucesso reprodutivo*

**Abstract.** Hybrids are individuals formed when reproductive barriers between closely related species aren't totally established, and individuals from different species cross. Hybridization is remarkably common in some genus within the Orchidaceae family.

On Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, two sister species from the genus *Epidendrum*: *E. secundum* Jacq and *E. xanthinum* Lindl occur sympatrically. Individuals with intermediate traces, supposedly hybrids, also occur. In this work, we evaluate the hypothesis of hybridization between these two species and the intensity of their reproductive isolation. It was possible to detect hybridization using experiments of reciprocal pollination. The low reproductive success observed on hybrid individuals plays a major role as a barrier that promotes reproductive isolation strong enough to maintain these two species apart.

**Keywords.** *Epidendrum; Hybrid; Reproductive barriers; Reproductive success*

## Introdução

### Zonas de hibridação

O estudo de zonas de hibridação tem ajudado Biólogos a compreender a origem e intensidade das barreiras reprodutivas entre espécies. Zonas de hibridação são regiões geográficas onde duas ou mais espécies ocorrem em simpatria (ocorrendo na mesma região), e os indivíduos de suas populações entram em contato. Diversos estudos realizados em zonas de hibridação natural entre plantas tem sido realizados tanto na América quanto na Europa, tais estudos envolvem geralmente uma abordagem multidisciplinar. Os objetivos e métodos utilizados são bastante variados e vão desde o uso de marcadores moleculares em DNA nuclear e/ou plastidial, neste caso com o objetivo de evidenciar a produção de híbridos através de identificação da estrutura genética das populações em contato (Pinheiro et al., 2010; Moraes et al., 2013;

Vega et al., 2013), até experimentos com ênfase em aspectos ecológicos como, por exemplo, identificação de agentes polinizadores (Pansarin e Amaral, 2008), em alguns casos tem sido realizados experimentos envolvendo a biologia reprodutiva, neste caso polinizações manuais são conduzidas em plantas que se encontram em cultivo em coleções biológicas para se inferir a compatibilidade reprodutiva das espécies em contato (Scopece et al., 2007; Scopece et al., 2008; Pinheiro et al., 2010; Pinheiro et al., 2013).

Em plantas é comum que espécies filogeneticamente relacionadas ocorrendo numa mesma localidade experimentem fluxo de pólen recíproco, o que pode levar a formação de descendentes de natureza híbrida. Híbridos são indivíduos que, em geral, apresentam características morfológicas intermediárias entre as características de suas espécies parentais, com genomas compostos pela mistura genética das duas espécies em questão (Cozzolino e Widmer, 2005)

Recebido: 15set14

Aceito: 08jan15

Publicado: 30jul15

Revisado por  
Déborah Yara Alves  
Cursino dos Santos  
e Anônimos

### **Conceito de espécie, isolamento reprodutivo e especiação**

A formação de um descendente viável pode, numa primeira análise, trazer dúvida quanto ao status de espécies distintas das populações que se inter cruzam. O conceito de espécie já foi alvo de muita discussão no campo da Biologia. Diversos autores propuseram uma série de enunciados distintos deste conceito, desde a sua formulação inicial por Mayr (Mayr, 1942). Com o acúmulo de conhecimento no campo da Biologia o conceito biológico de espécie se mostrou falho ou inconsistente em alguns casos. A partir daí novos autores passaram a propor novos conceitos de espécie que melhor se adequassem aos seus problemas de estudo em particular, surgiram então conceitos ecológicos, filogenéticos, evolutivos e muitos outros. Para uma reflexão mais aprofundada deste tema sugerimos a leitura de Queiroz (1996) e Coyne e Orr (2004).

Quando consideramos a diversidade de conceitos de espécie propostos, essas definições parecem ser mutuamente exclusivas e contraditórias. No entanto mais pontos de concordância do que de divergência podem ser encontrados entre os diferentes conceitos (Queiroz, 1996).

Os conceitos de espécie definem espécie como uma entidade que existe no nível populacional. Apesar de suas diferenças, todos eles afirmam, seja de uma maneira explícita ou implícita, que espécies são entidades biológicas compostas por grupos de indivíduos (Queiroz, 1996).

Outro ponto de concordância entre os conceitos de espécie é que estas entidades se mantêm existindo pela capacidade de reproduzir-se. São sempre definidas como sucessivas gerações produzidas, formando linhagens. Como consequência, deve haver um contínuo genético desde os organismos ancestrais até os atuais (Queiroz, 1996).

Os diferentes conceitos de espécie propõem ainda que espécies são entidades que se mantêm distintas de outras entidades semelhantes por mecanismos que promovem o isolamento reprodutivo entre suas populações. Estes mecanismos que previnem o inter cruzamento entre espécies são as chamadas barreiras reprodutivas (Ramsey et al., 2003; Widmer et al., 2009).

Quaisquer aspectos da biologia reprodutiva de espécies que promovam a incompatibilidade reprodutiva entre os grupos que estão em contato são considerados barreiras reprodutivas (Scopece et al., 2010). Em plantas, as barreiras reprodutivas entre espécies mais óbvias, porém não apenas, seriam: período de floração sem sobreposição, não compartilhamento de agentes polinizadores, incompatibilidade de germinação do pólen no estigma, incapacidade de formação de frutos viáveis, incapacidade de fusão de gametas, inviabilidade das sementes produzidas, inviabilidade ou infertilidade dos híbridos formados (Bradshaw et al., 1995; Lexer et al., 2005; Johnson, 2010; Greiner et al., 2011).

A instalação, manutenção e evolução das barreiras reprodutivas são elementos chaves no processo de especiação (Dobzhanski, 1970). Especiação consiste no processo biológico pelo qual novas espécies passam a existir. Em geral se assume que novas espécies são formadas a partir das espécies previamente existentes. Um grupo de indivíduos que se torne reprodutivamente isolado do grupo a que pertencia antes

deixa de compartilhar genes com este. O fato de não haver mais compartilhamento genômico entre dois grupos determina que, agora cada um tenha seu próprio trajeto evolutivo independente do outro, permite que com o passar das gerações as diferenças genéticas, ecológicas etc se aprofundem. Este processo está intimamente relacionado com a diversidade biológica encontrada na natureza (Wu, 2001; Schluter, 2009).

A especiação é um processo bastante complexo e provavelmente não depende de um único evento pontual, que determine sozinho o isolamento reprodutivo entre dois grupos que eram, até então, compatíveis para a reprodução. Diversas barreiras reprodutivas podem se instalar sequencialmente, apresentando uma grande variação em intensidade. Em alguns casos o isolamento pode ser o resultado da soma das diversas barreiras atuando sequencialmente no processo reprodutivo, sem que nenhuma delas sozinha seja a responsável pelo isolamento. Além disto, o processo evolutivo pode continuar atuando após a especiação e novas barreiras podem surgir, portanto a importância atual das barreiras entre duas espécies podem não refletir a importância histórica destas barreiras no processo de especiação (Coyne e Orr, 2004; Lowry et al., 2008).

O motivo de existirem tantas formas diferentes de se definir o que é uma espécie reside no próprio processo de especiação. Os diferentes conceitos de espécie enfocam diferentes etapas do processo de especiação. Por exemplo, o conceito biológico enfoca a capacidade de reprodução, já o conceito ecológico enfoca a zona adaptativa ocupada pelas espécies. Entretanto incompatibilidades ecológicas e reprodutivas são diferentes estágios de um processo contínuo de segregação (Sambatti et al., 2008; Schluter, 2009). A ordem em que se instalam estas incompatibilidades pode ser diferente em diferentes casos, portanto ao se utilizar um ou outro conceito de espécie podemos obter divergências quanto ao número de espécies considerado válido (Queiroz, 1996).

Zonas de hibridação oferecem uma grande oportunidade para que o processo de especiação seja estudado. É nas zonas de hibridação que as barreiras reprodutivas estão atuando e mantendo a coesão das espécies que estão em contato. Hipóteses sobre os mecanismos de especiação podem ser levantadas e testadas. Processos de especiação que ainda não foram totalmente concluídos podem ser identificados e novas ideias podem ser formuladas (Cozzolino et al., 2006; Baack e Rieseberg, 2007).

### **Zonas de hibridação na família Orchidaceae**

Hibridação é um processo bastante comum em plantas da família Orchidaceae, havendo relatos praticamente em todos os continentes onde gêneros da família ocorrem. A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas e muito se discute a importância dos eventos de hibridação para a diversidade observada. Diferentes tipos de zonas de hibridação foram relatadas com diferentes consequências para as espécies envolvidas. Em alguns casos a hibridação se restringe a formação de híbridos de primeira geração (F1), configurando que a coesão das espécies é mantida apesar do inter cruzamento ser possível (Moccia et al. 2007, Cortis et al., 2009). O isolamento pode não ser completo em alguns

casos, e então pode haver a formação de híbridos de geração avançada, frutos de retrocruzamentos, isto é, cruzamentos realizados entre um indivíduo híbrido e um indivíduo pertencente a uma das espécies parentais. Neste caso algum grau de fluxo genético através da barreira das espécies pode ser detectado (Pinheiro et al. 2010; Moraes et al., 2013), sendo elementos genômicos de uma espécie encontrados no genoma de outra espécie, fenômeno conhecido como introgressão (Heiser, 1973).

### Complexo *Epidendrum secundum*: incertezas taxonômicas e hipótese de hibridação

O “complexo *Epidendrum secundum*” é um complexo de espécies, nele estão algumas das maiores incertezas taxonômicas do gênero *Epidendrum* (Brieger, 1976-1977). Tratam-se de plantas amplamente distribuídas por toda a América do Sul com elevada diversidade morfológica. O número exato de espécies é incerto e existem muitas divergências na nomenclatura. Os nomes *E. elongatum* Jacq, *E. crassifolium* Lindl, *E. ellipticum* Grah, *E. ansiferum* Rchb f, *E. versicolor* Hoehne & Schltr, *E. xanthinum* Lindl dentre outros, são tratados ora como sinônimos de *E. secundum* ora como espécies individuais.

Eventos de hibridação no gênero *Epidendrum* têm sido relatados por diversos autores (Dunsterville, 1979; Dresler, 1989; Hagsäter e Soto-Arenas, 2005; Pansarin e Amaral, 2008). A grande variação morfológica que diversos grupos de espécies possuem pode ter sido originada em eventos de hibridação, uma vez que indivíduos com morfologia floral intermediária são constantemente observados em populações simpátricas onde diferentes espécies compartilham o mesmo habitat e os mesmos polinizadores (Hagsäter e Soto-Arenas, 2005; Pansarin e Amaral, 2008; Pinheiro et al., 2010). Neste sentido, os eventos de hibridação podem ser interpretados como processos que geram a diversidade observada no grupo, inclusive podendo ocasionar o surgimento de novas linhagens e espécies. Dunsterville (1979) descreve a grande variação morfológica que é observada em populações onde *E. secundum* e *E. xanthinum* ocorrem em simpatria, onde é observada a ocorrência de indivíduos com características morfológicas intermediárias (flores em tons de laranja a creme) entre indivíduos que apresentam flores róseas (*E. secundum*) e amarelas (*E. xanthinum*) (Figura 1). Estes mesmos padrões são observados nas populações que ocorrem em determinados pontos da Floresta Atlântica, principalmente no Estado do Rio de Janeiro.

### *E. secundum* X *E. xanthinum* na Serra dos Órgãos, hipótese e objetivos do estudo

Em estudo utilizando marcadores moleculares e morfológicos (Pinheiro et al., 2009), com o intuito de revisar os limites interespecíficos e infragenéricos do complexo *E. secundum*, foi encontrado suporte a um grupo monofilético formado por *E. secundum* e *E. xanthinum*, sendo estas, então, consideradas como espécies irmãs. Em regiões onde estas espécies ocorrem em simpatria (estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais) podem ser encontradas formas com características morfológicas intermediárias, que podem ser híbridos entre *E. secundum* e *E. xanthinum*. Na Serra dos Órgãos, no município de Nova Friburgo, região serrana do estado do Rio de Janeiro, ocorre uma possível zona de hibridação entre *E. secundum* e *E. xanthinum*. Ambas as espécies e uma terceira variedade com características intermediárias são encontradas crescendo em habitat terrícola ou rupícola, inclusive em bancos de areia à beira da estrada.

Neste estudo a hipótese de hibridação entre estas espécies foi testada. Com o objetivo de quantificar a compatibilidade reprodutiva e o isolamento reprodutivo entre as espécies parentais *E. secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl e entre estas e os híbridos detectados, foram realizadas diversas polinizações recíprocas, além da avaliação da viabilidade de frutos e sementes produzidos.

## Métodos

### Espécimes

No total, 22 espécimes foram utilizados em polinizações manuais, mantidos em cultivo no núcleo de pesquisas do orquidário do estado de São Paulo. Dentre estes, 9 espécimes são da espécie *E. secundum*, 8 de *E. xanthinum*, e 5 são híbridos entre as duas espécies. Todos foram coletados na região montanhosa da Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro.

Os indivíduos amostrados foram identificados visualmente pela presença de inflorescências, sendo as de *E. secundum* com coloração predominantemente rósea e uma mancha amarela na região do calus, *E. xanthinum* com coloração totalmente amarela em suas flores e híbridos com coloração variando de tons de laranja a creme com pigmentação violácea na base da coluna (Figura 1).

Os indivíduos amostrados estavam no mínimo a 5 metros de distância entre si, de forma que se evitasse a amostragem de clones.



Figura 1. Inflorescências e flores individuais desmontadas de *E. secundum* (esquerda), híbrido (centro) e *E. xanthinum* (direita) coletados na Serra dos Órgãos – RJ

### Cruzamentos manuais

Em cada cruzamento foi utilizado um par de indivíduos, selecionados pela presença de uma inflorescência saudável com um número de no mínimo dez flores. Os indivíduos de cada cruzamento foram selecionados de forma que todas as combinações possíveis entre as espécies parentais e híbridos fossem formadas, compondo seis categorias de cruzamento: *E. secundum* X *E. secundum*; *E. secundum* X *E. xanthinum*; *E. secundum* X híbrido; *E. xanthinum* X *E. xanthinum*; *E. xanthinum* X híbrido; híbrido X híbrido.

Todos os cruzamentos foram realizados de forma bidirecional, ou seja, cada indivíduo atuou como receptor e doador de pólen do seu parceiro. Em cada cruzamento três flores de uma inflorescência foram marcadas e cada uma teve sua polínia removida com estilete metálico e transferida para o estigma de uma flor do seu parceiro. As flores polinizadas tiveram seu desenvolvimento acompanhado nos meses subsequentes para que fosse verificada a formação de um fruto (Figura 2).

### Avaliação de viabilidade de frutos e sementes

Quando o fruto formado estava maduro era então coletado e aberto. As sementes obtidas de cada fruto foram mantidas sob refrigeração a 4° C por no máximo 7 dias. A viabilidade das sementes formadas foi avaliada pelo teste do tetrazólio, neste teste as semente são imersas em solução 1% de 2,3,5-trifenil tetrazólio e mantidas por 24 horas em temperatura de 30°C. Os embriões viáveis apresentam uma forte coloração vermelha e podem ser facilmente diferenciados dos embriões inviáveis, estes são identificados pela presença da testa da semente sem conteúdo ou contendo um embrião não colorido em vermelho (Figura 3). Amostras compostas por pelo menos 300 sementes de cada fruto foram analisadas sob estereomicroscópio, dispersas em solução de glicerina 50% para facilitar a individualização de cada semente. De cada fruto foram retiradas três amostras para contagens independentes.



Figura 2. Frutos de *Epidendrum* em desenvolvimento.

### Cálculos de viabilidade e índices de isolamento

A viabilidade dos frutos foi calculada pela razão entre o número de frutos formados e o número total de flores polinizadas, para cada categoria de cruzamento. O índice de isolamento reprodutivo no estágio de formação de fruto (Índice de Isolamento Reprodutivo no estágio de formação de Fruto, IRF) foi calculado como 1 menos a viabilidade dos frutos ( $IRF = 1 - [\text{número frutos viáveis} \div \text{número de flores polinizadas}]$ ). A porcentagem de sementes viáveis foi calculada pela razão entre o número de sementes viáveis e o número total de sementes computada naquela categoria de cruzamento. O índice de isolamento reprodutivo no estágio de formação de sementes viáveis (Índice de Isolamento Reprodutivo no estágio de formação de Semente, IRS) foi calculado como 1 menos a viabilidade das sementes ( $IRS = 1 - [\text{número de sementes viáveis} \div \text{número total de sementes amostradas}]$ ). Os índices de isolamento calculados desta maneira podem ter um valor entre 0 e 1. O valor 0 significa que não há isolamento reprodutivo, ou seja, a fertilidade é total neste estágio da reprodução e o maior número possível de descendentes pode ser formado entre os parentais avaliados, considerando-se apenas este estágio. Índice com valor de 1 significa isolamento total, ou seja, este estágio da reprodução não é viável e representa por si só uma importante barreira reprodutiva atuando no isolamento reprodutivo dos grupos analisados.

Os índices de isolamento IRF e IRS foram combinados de forma a se obter um único índice de isolamento correspondente aos estágios de formação de frutos e de sementes viáveis combinados (Índice de Isolamento Reprodutivo combinado nos estágios de formação de Fruto e Semente, IRFS). Neste novo índice o IRF é somado integralmente ao valor de IRS multiplicado por 1 menos IRF ( $IRFS = IRF + [(1 - IRF) \times IRS]$ ). Esta fórmula leva em consideração que a formação de frutos atua primeiro na sequência de eventos na reprodução e que o IRS somente atua limitando o número de descendentes formados a partir dos frutos viáveis ( $1 - IRF$ ).

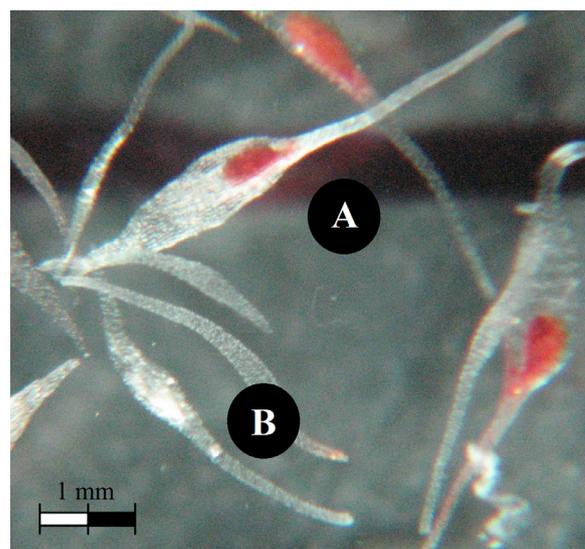


Figura 3. Resultado do teste do tetrazólio, sementes portadoras de embrião viável apresentam o embrião, estrutura arredondada com forte coloração em vermelho envolvido pela testa da semente (A). Sementes inviáveis apresentam embrião colorido em branco ou apenas a testa da semente sem embrião (B).

## Resultados

A formação de frutos foi possível em todas as categorias de cruzamento realizadas. Considerando-se todas as polinizações realizadas, 58% delas desencadearam a formação de fruto. A viabilidade dos frutos foi elevada nos cruzamentos intraespecíficos, sendo 64,1% para *E. secundum* e 74,1% para *E. xanthinum*. Os cruzamentos interespecíficos também tiveram viabilidade elevada, 66,7% quando pólen de *E. xanthinum* foi usado em flores de *E. secundum* e 93,3% na direção oposta. Os cruzamentos envolvendo híbridos tiveram uma menor porcentagem de frutos formados, especialmente quando foi utilizado pólen híbrido (Tabela 1).

A viabilidade das sementes formadas foi elevada nos cruzamentos intraespecíficos e entre as espécies parentais variando entre 68,8% (*E. secundum* -> *E. secundum*) e 83,8% (*E. xanthinum* -> *E. xanthinum*). Nenhuma semente viável foi produzida nos cruzamentos de híbridos entre si. A viabilidade das sementes formadas nos cruzamentos entre híbridos e parentais foi baixa variando entre 7,4% e 14%. Esse padrão curiosamente não foi observado quando pólen híbrido foi usado em flores de *E. xanthinum* caso em que a viabilidade das sementes foi de 39,9% (Tabela 2).

Os índices de isolamento calculados revelam a baixa viabilidade reprodutiva dos híbridos. Nos cruzamentos em que híbridos participaram, o IRFS obteve valores muito próximos a 1 (isolamento total), variando entre 0,93 e 1, exceto nos cruzamentos em que pólen híbrido foi usado para polinizar flores de *E. xanthinum*. Neste caso, o IRFS teve valor 0,65. Nos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos este índice variou entre 0,35 e 0,56 (Tabela 3).

## Discussão

A hipótese de hibridação entre *E. secundum* e *E. xanthinum* foi confirmada pelos dados obtidos nas polinizações realizadas entre as duas espécies. O IRFS encontrado entre *E. secundum* e *E. xanthinum* é semelhante ao encontrado nos cruzamentos intraespecíficos (Tabela 3), o que indica uma provável formação de indivíduos híbridos de primeira geração (F1) quando as populações ocorrem em simpatia, como é observado na Serra dos Órgãos. A hibridação ocorre de forma bidirecional, ambas as espécies podem atuar

como receptoras ou doadoras de pólen para a outra. Estes resultados reforçam a visão de que barreiras reprodutivas que evitam a transferência de pólen são fracas entre espécies de orquídeas que realizam polinização por engodo alimentar e compartilham agentes polinizadores. As barreiras reprodutivas que garantem o isolamento reprodutivo entre essas espécies são principalmente as que atuam em fases posteriores da reprodução, ou reduzindo a viabilidade ou fertilidade dos híbridos formados (Scopece et al., 2007).

No estudo aqui apresentado, o isolamento reprodutivo entre as espécies é mantido principalmente pelo baixo sucesso reprodutivo dos híbridos formados. O IRFS nos cruzamentos envolvendo híbridos entre si tem valor de 1, ou seja, o isolamento é completo e não se podem formar descendentes quando ambos os parentais são híbridos. Os cruzamentos envolvendo híbridos e parentais tem um nível de sucesso tão baixo, que a formação de descendentes destes cruzamentos deve ser incipiente quando comparado com a produção de descendentes de cruzamentos intraespecíficos ou interespecíficos (Tabela 3). Como sempre são necessários parentais envolvidos nos cruzamentos para que estes tenham elevada viabilidade e como os híbridos resultantes dos cruzamentos interespecíficos tem baixa fertilidade a continuidade das espécies parentais na Serra dos Órgãos depende dos cruzamentos intraespecíficos realizados. Sendo assim, o limite entre as espécies está bastante definido e a hipótese de que *E. secundum* e *E. xanthinum* consistem em duas espécies distintas encontra grande suporte em nossos resultados (Pinheiro et al., 2009).

Apesar do isolamento detectado, existe a possibilidade de que elementos ou regiões genômicas de uma espécie possam cruzar a barreira reprodutiva e serem transferidos para o genoma da outra espécie. Este fenômeno é chamado introgressão e já foi descrito anteriormente entre espécies próximas de orquídeas (Soliva e Widmer, 2003; Pinheiro et al., 2010). Os dados sugerem que, apesar de pouco provável, é possível se formar um descendente de natureza híbrida de geração tardia, ou seja, um híbrido que seja retrocruzado com uma das espécies parentais poderia gerar um descendente. Se este descendente for retrocruzado com a mesma espécie parental e então este fenômeno ocorrer por diver-

Tabela 1. Porcentagem de frutos viáveis formados para cada categoria de cruzamento realizado.

		doador de pólen		
		<i>E. secundum</i>	híbrido	<i>E. xanthinum</i>
receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	64,1%	11,1%	66,7%
	híbrido	74,1%	18,5%	88,9%
	<i>E. xanthinum</i>	93,3%	88,9%	74,1%

Tabela 2. Porcentagem de sementes portadoras de embrião viável para categoria de cruzamento realizado.

		doador de pólen		
		<i>E. secundum</i>	híbrido	<i>E. xanthinum</i>
receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	68,8%	14,0%	83,8%
	híbrido	9,0%	0,0%	7,4%
	<i>E. xanthinum</i>	69,9%	39,9%	79,3%

Tabela 3. Índice de Isolamento Reprodutivo combinado dos estágios formação de Fruto e viabilidade das Sementes (IRFS) para cada categoria de cruzamento realizado. Nota: valor igual a 1 indica isolamento total e valor igual a 0 indica ausência de isolamento, ou seja, fertilidade total.

		doador de pólen		
		<i>E. secundum</i>	híbrido	<i>E. xanthinum</i>
receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	0,56	0,98	0,44
	híbrido	0,93	1,00	0,93
	<i>E. xanthinum</i>	0,35	0,65	0,41

sas gerações, pode ser formado um indivíduo pertencente à uma das espécies parentais mas com alguns elementos genômicos da outra. Isto parece ser especialmente verdade quando se considera a possibilidade de introgressão sobre a espécie *E. xanthinum*, visto que nos cruzamentos em que pólen híbrido foi utilizado para fecundar flores de *E. xanthinum* o IRFS apresentou valor de 0,65 (Tabela 3), bem inferior aos demais cruzamentos envolvendo híbridos e com valor próximo ao observado nos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos.

## Conclusão

A execução de cruzamentos manuais se mostra um procedimento experimental bastante simples e interessante para avaliar a natureza e intensidade do isolamento reprodutivo em zonas de hibridação naturais. Em conjunto com outros trabalhos (Marques et al., 2014) isto reforça a importância da manutenção de coleções biológicas com espécimes vivos e em cultivo como as encontradas nos Jardins Botânicos.

Os resultados obtidos corroboram a possibilidade de intercruzamento e produção de híbridos de primeira geração (F1) viáveis, porém sub-férteis entre *E. secundum* e *E. xanthinum* na Serra dos Órgãos. A formação de outras categorias de híbridos, como híbridos de segunda geração e introgressantes, frutos de retrocruzamentos entre híbridos e parentais não pode ser verificada apenas com estes resultados. Análises complementares utilizando marcadores moleculares em DNA poderiam ajudar a compreender tanto a categoria dos híbridos coletados, quanto verificar se existe introgressão entre estas espécies (Pinheiro et al., 2010; Pinheiro et al., 2013; Vega et al., 2013; Marques et al., 2014). Análises desta natureza, utilizando microssatélites como marcadores moleculares no DNA nuclear e plastidial estão sendo executadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Em especial, a análise de marcadores moleculares no DNA nuclear pode revelar a estrutura genética da população. Seria então possível caracterizar indivíduos pertencentes às espécies parentais e híbridos com maior segurança (Burgarella et al., 2009; Pinheiro et al., 2010). Como os fenótipos formam um gradiente contínuo de cores, alguns indivíduos podem ter sido identificados erroneamente como híbridos ou parentais. Isto poderia explicar, por exemplo, porque o IRFS foi tão elevado em *E. secundum*: talvez alguns indivíduos híbridos sub-férteis tenham sido classificados erroneamente como *E. secundum*, elevando o índice. Da mesma maneira, erros na identificação de indivíduos de *E. xanthinum*, que tenham sido classificados como híbridos, poderiam explicar o baixo IRFS entre pólen híbrido e flores de *E. xanthinum*. O erro na classificação pode ter aumentado a compatibilidade dos cruzamentos, reduzindo artificialmente o índice de isolamento.

## Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP (Fundo de Amparo à Pesquisa de São Paulo) pelo financiamento realizado para as viagens de campo e materiais de laboratório dos experimentos.

## Referências

- Baack EJ, Rieseberg LH. 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current opinion in genetics & development* 17:513-518.
- Bradshaw HD, Wilbert SM, Otto KG, Schemske DW. 1995. Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in Monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* 376:762-765.
- Brieger FG. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendrea. In: Brieger FG, Maatsch R, Senghas K, editors. *Schlechter, Die Orchideen*. Berlin: Paul Parey, p.509-549.
- Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R, Lumaret R, Guichoux E, Petit RJ, Soto A, Gil L. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* 102:442-452.
- Cortis P, Vereecken NJ, Schiestl FP, Barone-Lumaga MR, Scrugli A, Cozzolino S. 2009. Pollinator convergence and the nature of species boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of botany* 104:497-506.
- Coyne JA, Orr Ha. 2004. *Speciation*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Cozzolino S, Widmer A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20:487-494.
- Cozzolino S, Nardella AM, Impagliazzo S, Widmer A, Lexer C. 2006. Hybridization and conservation of mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological conservation* 129:14-23.
- Dressler RL. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American orchid society bulletin* 58:796-800.
- Dobzhansky T. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. New York: Columbia University Press.
- Dunsterville GC. 1979. Orchids of venezuela - *Epidendrum elongatum*. *American orchid society bulletin* 48:447-454.
- Greiner S, Rauwolf U, Meurer J, Herrmann RG. 2011. The role of plastids in plant speciation. *Molecular ecology* 20:671-691.
- Hágsater E, Soto-arenas MA. 2005. *Epidendrum L.* In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, editors. *Genera Orchidacearum vol 4*. Oxford: Oxford University Press p236-251.
- Heiser GB. 1973. Introgression re-examined. *The Botanical Review* 39:347-366.
- Johnson NA. 2010 Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield? *Trends in genetics* 26:317-325.
- Lexer C, Fay MF, Joseph JA, Nica M-S, Heinze B. 2005. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular ecology* 14:1045-1057.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of the royal society of London (series b: biological sciences)* 363:3009-3021.
- Marques I, Draper D, Riofrío L, Naranjo C. 2014. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary biology* 14:1-14.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Moccia MD, Widmer A, Cozzolino S. 2007. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molecular ecology* 16:2855-2866.
- Moraes AP, Chinaglia M, Palma-Silva C, Pinheiro F. 2013.

- Interploidy hybridization in sympatric zones: the information of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). *Ecology and evolution* 3:3824-3837.
- Pansarin ER, Amaral MCE. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology* 10:211-219.
- Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLE, Salatino A, Barros F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *amphiglottium* (Laellinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 283:165-177.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 19:3981-3994.
- Pinheiro F, Cozzolino S, Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution* 67:2024-2039.
- Queiroz K. 1996. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Endless forms: species and speciation*. Oxford: Oxford University Press p57-75.
- Ramsey J, Bradshaw HD, Schemske DW. 2003. Components of reproductive isolation between the Monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57:1520-1534.
- Sambatti JBM, Ortiz-Barrientos D, Baack EJ, Rieseberg LH. 2008. Ecological selection maintains cytonuclear incompatibilities in hybridizing sunflowers. *Ecology Letters* 11:1082-1091.
- Schluter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323:737-741.
- Scopece G, Musacchio A, Widmer A, Cozzolino S. 2007. Patterns of reproductive isolation in mediterranean deceptive orchids. *Evolution* 61:2623-2642.
- Scopece G, Widmer A, Cozzolino S. 2008. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. *The American Naturalist* 171:315-326.
- Scopece G, Lexer C, Widmer A, Cozzolino S. 2010. Polymorphism of postmating reproductive isolation within plant species. *Taxon* 59:1367-1374.
- Soliva M, Widmer A. 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive Ophrys (Orchidaceae) species. *Evolution* 57:2252-2261.
- Vega Y, Marques I, Castro S, Loureiro J. 2013. Outcomes of extensive hybridization and introgression in *Epidendrum* (Orchidaceae): can we rely on species boundaries? *Plos One* 8:1-13.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102:31-38.
- Wu C-I. 2001. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 14:851-865.

# Síntese do conhecimento sobre a diversidade de sistemas visuais em Mollusca, com ênfase em Bivalvia

Synthesis of the knowledge of visual systems diversity in Mollusca, with emphasis on Bivalvia

Jorge Alves Audino\*, José Eduardo Amoroso Rodriguez Marian e Sônia Godoy Bueno Carvalho Lopes

Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia

\*Contato: jorgeaudino@ib.usp.br

**Resumo.** A diversidade de sistemas visuais encontrada em Metazoa é surpreendente, e seu estudo vem crescendo exponencialmente com avanços significativos, principalmente por meio do emprego de novas técnicas e abordagens. Ampla variedade de sistemas visuais ocorre no filo Mollusca, em especial na classe Bivalvia, sendo esses animais considerados potenciais modelos de estudo na área. Primeiramente, este artigo explora a classificação da diversidade visual em Metazoa e as principais discussões atuais sobre homologies e convergências da fotopercepção animal. Em seguida, é apresentada uma revisão crítica do conhecimento sobre sistemas visuais em moluscos, destacando-se a organização ocular em bivalves. Finalmente, são apontadas lacunas no conhecimento e novas perspectivas de estudos empregando moluscos, considerando o histórico de investigações no grupo e os atuais paradigmas da evolução da visão animal.

**Palavras-chave.** Bivalves; Convergências; Fotorreceptores; Moluscos; Olhos

**Abstract.** The diversity of metazoan visual systems is astonishing, and numerous recent studies have been advancing our knowledge by incorporating novel techniques and approaches. The phylum Mollusca exhibits huge diversity of ocular structures, and Bivalvia is the most diverse class in this aspect, bivalves being regarded as potential models for the study of visual systems evolution. Firstly, this paper explores the classification of visual diversity in Metazoa, and the main current hypotheses on homologies and convergences in animal photoreception. Then, a critical review of the knowledge of molluscan visual systems is presented, with emphasis on ocular organization in bivalves. Finally, gaps in our knowledge and perspectives for future research are discussed, as well as current paradigms in animal vision evolution.

**Keywords.** Bivalves; Convergences; Eyes; Mollusks; Photoreceptors

## Introdução

A compreensão da evolução e função adaptativa dos fotorreceptores é um tema complexo, amplamente estudado e com avanços recentes a partir do emprego de diferentes abordagens moleculares e evolutivas (e.g., Erclik et al., 2009; Vopalensky e Kozmik, 2009; Gehring, 2012). Estruturas fotossensíveis estão presentes nas mais diversas espécies de seres vivos, desde fotorreceptores simples em bactérias e eucariontes unicelulares, até olhos complexos em muitos animais, como lulas e aves (Nilsson, 2009).

Há pouca informação disponível sobre o surgimento de órgãos fotossensíveis em Metazoa, porém os registros mais antigos sobre estruturas oculares incluem impressões das facetas de olhos compostos preservadas em fósseis de trilobitas do início do Cambriano, cerca de 530 milhões de anos atrás (maa) (Land e Nilsson, 2012). Já o registro fóssil do início do

Ordoviciano (488 maa), que inclui representantes da maioria dos filos de metazoários atualmente reconhecidos, revela, de forma surpreendente, ampla variedade de estruturas oculares (Nilsson, 2009; Land e Nilsson, 2012).

## Fotopercepção

Apesar do emprego recorrente na literatura científica de termos como “visão” e “olho”, esses conceitos nem sempre são claramente definidos. O crescente avanço no estudo da fotopercepção animal faz com que este seja um tema constantemente reavaliado. A proposta de classificação apresentada a seguir baseia-se na compilação de dados da literatura sobre fotopercepção em Metazoa (Land e Nilsson, 2012; Nilsson, 2013), sendo particularmente útil na compreensão da diversidade ocular em Mollusca, como discutido mais adiante. Segundo Nilssen (2013), a classificação dos sistemas fotossensíveis é definida como a sequência de quatro classes

Recebido: 06fev15

Aceito: 12jun15

Publicado: 30jul15

Revisado por

Daniel Lahr e

Anônimos

evolutivamente relacionadas, sob a premissa de que a evolução da estrutura fotorreceptora está associada à evolução de comportamentos visualmente guiados. Neste contexto, são apresentadas as quatro classes morfofuncionais:

**I. Fotopercepção não-direcional.** Células fotorreceptoras simples, geralmente isoladas, apenas identificam a presença, intensidade e ausência de luz. Esse tipo de fotopercepção é muito comum, por exemplo, em organismos do zooplâncton, auxiliando na migração vertical ao longo da coluna de água.

**II. Fotopercepção direcional.** Células fotorreceptoras são acompanhadas de células pigmentadas que atuam sombreando os fotorreceptores, de modo que a luz é detectada em algumas direções, mas não em outras. A fototaxia, por exemplo, depende de um sistema direcional de fotopercepção, como ocorre nos ocelos de planárias.

**III. Visão de baixa resolução.** Quando diferentes células fotorreceptoras encontram-se organizadas, por exemplo, em taças pigmentares, diferentes direções são simultaneamente percebidas. Esta é considerada a origem da visão, pois a variação de luz no espaço é detectada de forma simultânea e comparada. Este sistema está presente, por exemplo, nos olhos de muitos gastrópodes marinhos e terrestres.

**IV. Visão de alta resolução.** A inclusão de diferentes componentes e estruturas ao sistema III está associada ao avanço da resolução óptica e, conseqüentemente, ao aumento da diversidade de morfologias oculares. Os olhos de aves, cefalópodes e alguns mamíferos são os mais notáveis exemplos dessa classe. O surgimento de lentes e outros mecanismos foram inovações-chave na evolução de comportamentos visualmente guiados mais complexos. Em suma, apenas as classes III e IV são rigorosamente consideradas visão em razão de sua acuidade espacial. Conseqüentemente, olhos são estruturas visuais incluídas nestas duas classes.

### Estruturas fotorreceptoras em Metazoa

A fotopercepção mais simples em Metazoa corresponde às classes I e II, presentes na maioria dos filos animais (Nilsson, 2009; Land e Nilsson, 2012). Entretanto, estruturas como manchas oclares frequentemente variam quanto à classificação (II ou III) conforme critérios ópticos e comportamentais (Nilsson, 2013). Os sistemas oculares (classes III e IV) são classificados de acordo com os mecanismos de formação de imagem, podendo ser subdivididos em olhos compostos e simples. Os olhos compostos, formados pelo arranjo de milhares de unidades fotorreceptoras denominadas ommatídeos, são característicos dos artrópodes, principalmente de Crustacea e Insecta, além de ocorrer também em poliquetos e bivalves (Nilsson, 1994). Os olhos simples são formados por camadas de células fotorreceptoras associadas a células pigmentadas; entretanto, outros elementos podem estar presentes, como lentes, retinas acessórias e córnea (Land, 1992; Jonasova e Kozmik, 2008). Tanto olhos compostos quanto simples são chamados de complexos quando possuem maior acuidade e/ou sensibilidade visual (Land e Nilsson, 2012).

As células fotorreceptoras animais podem apresen-

tar dois tipos de modificação da membrana celular relacionadas à sensibilidade e resposta à luz (Eakim, 1965): rabdoma (Fig. 1A), conjunto de microvilosidades presente em diversos filões de animais, e cílio (Fig. 1B), no qual há dobras na região da membrana que o envolve, este último tipo presente nos deuterostômios (Eakim, 1965; Nilsson, 2004; Fain et al., 2010). Receptores rabdoméricos e ciliares também diferem quanto às proteínas envolvidas na cascata de sinalização celular produzida (Arendt, 2003). Embora se observe uma aparente dicotomia entre deuterostômios e protostômios, a evolução das células receptoras ainda é amplamente discutida (Fain et al., 2010). Por exemplo, invertebrados protostômios como bivalves e artrópodes também apresentam receptores ciliares semelhantes aos de vertebrados, revelando casos de convergência evolutiva (Arendt, 2003). De forma consensual, a evolução da morfologia das células fotorreceptoras é considerada homoplástica, com inúmeros casos de convergência e evolução independente em distintos táxons animais (Salvini-Plawen, 2008).

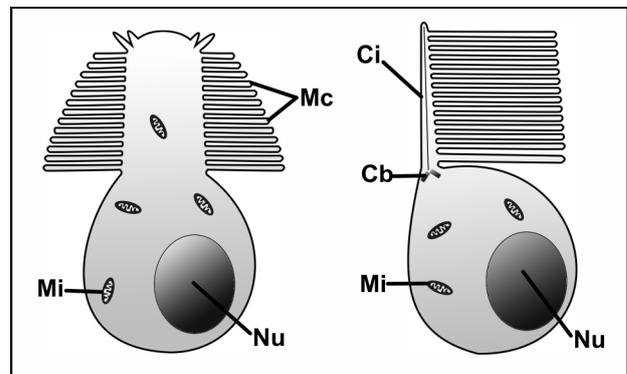


Figura 1. Representação esquemática dos dois tipos morfológicos de células fotorreceptoras animais. A. Célula fotorreceptora rabdômica cujas proteínas fotossensíveis (opsinas) estão agrupadas na membrana celular organizada em microvilosidades (rabdomas). B. Célula fotorreceptora ciliosa onde as opsinas encontram-se presentes em expansões da membrana celular do cílio modificado. Cb, corpúsculo basal; Ci, cílio; Mc, microvilosidades; Mi, mitocôndrias; Nu, núcleo.

### Homologias

Como descrito acima, olhos são encontrados em diversos filões e possuem uma variedade morfológica surpreendente. O desenvolvimento ocular é distinto entre os grandes grupos de animais e, apesar de haver semelhanças, em geral assume-se que não há qualquer homologia estrutural envolvida (Land e Nilsson, 2012). Mesmo dentro dos filões, como no caso de Mollusca, a evolução dos fotorreceptores e estruturas oculares é reconhecidamente não-homóloga (Salvini-Plawen, 2008).

Apesar das evidências morfológicas apontarem para caminhos independentes e convergentes, nas últimas décadas dados da biologia molecular colocaram em questão a completa ausência de homologia entre tantas estruturas visuais. Pesquisas na área de regulação gênica de estruturas oculares revelaram que genes da família Pax estão intimamente relacionados à regulação de transcrições envolvidas na formação de estruturas visuais em metazoários (e.g., Gehring, 2005, 2012; Nilsson, 2004; Fernald, 2006;

Vopalensky e Kozmik, 2009). Mais especificamente, os genes Pax atuam na transcrição das duas principais classes de opsinas que estão presentes no sistema de fotorreceptores rabdomérico e ciliar (Nilsson, 2009).

As opsinas são proteínas trans-membranas, altamente conservadas em Metazoa, e essenciais na cascata proteica envolvida na despolarização ou hiperpolarização da membrana celular durante a transdução do sinal luminoso (Fain et al., 2010). Genes da família Pax também estão presente em Cnidaria, recebendo o nome de PaxB em razão das variações nos domínios principais (Piatigorsky e Kozmik, 2004). Estudos recentes sugerem que o gene PaxB possa corresponder à condição ancestral, a qual, por meio de eventos de duplicação e diversificação, teria originado as variedades Pax6 e Pax 2/5/8 dos bilaterais (e.g., Ruzickova et al., 2009).

Em suma, as evidências acumuladas para diferentes grupos animais revelam que, apesar da origem embrionária distinta e das demais diferenças no desenvolvimento de órgãos fotorreceptores, há uma base molecular ancestral comum: os animais compartilham genes ortólogos (i.e., que descendem evolutivamente de um mesmo gene ancestral) reguladores de transcrição, fundamentais para formação de estruturas visuais (e.g., Nilsson, 2004; Fernald, 2006; Ruzickova et al., 2009; Gehring, 2012). Sendo assim, pode não haver homologia nos tecidos que origi-

nam os olhos, porém ela existe quando considerada a base molecular reguladora dessa formação. Como apontado por Piatigorsky (2008), é fundamental se pensar em diferentes níveis de homologia quando se trata da evolução das estruturas visuais nos animais.

## Mollusca

O contexto evolutivo e morfológico dos sistemas visuais dos metazoários é fundamental para o embasamento das discussões sobre evolução e caracterização das estruturas fotorreceptoras de Mollusca. O filo corresponde a um dos mais diversificados grupos de metazoários, com cerca de 130.000 espécies descritas para a fauna atual e 70.000 para o registro fóssil (Haszprunar et al., 2008). Apesar das classes Solenogastres, Caudofoveata, Monoplacophora e Scaphopoda não possuírem órgãos oculares (Serb e Earnings, 2008), a diversidade de estruturas fotossensíveis é surpreendentemente diversa nas demais classes, pois, além da fotopercepção direcional e não direcional (classes I e II), a visão pode ocorrer em taças ou cúpulas pigmentares (classes II e III) ou em olhos do tipo câmara (classes III e IV). A variedade de estudos sobre fotopercepção no filo inclui abordagens genéticas, experimentais, fisiológicas e anatômicas, permitindo o reconhecimento de padrões gerais bem como especificidades em cada classe.

Uma das sinapomorfias de Polyplacophora é justamente a presença de estruturas sensoriais características denominadas estetos, presentes em canais que atravessam as placas valvares (Todt et al., 2008). O conjunto de células fotorreceptoras (ocelos) presente em tais canalículos percebe a luminosidade do meio externo, permitindo ao animal uma resposta de exposição ou fuga de ambientes mais iluminados (Moseley, 1884; Fitzgerald, 1975). A distribuição de ocelos pode ser regular ou irregular e, em alguns casos, com maior concentração nas val-

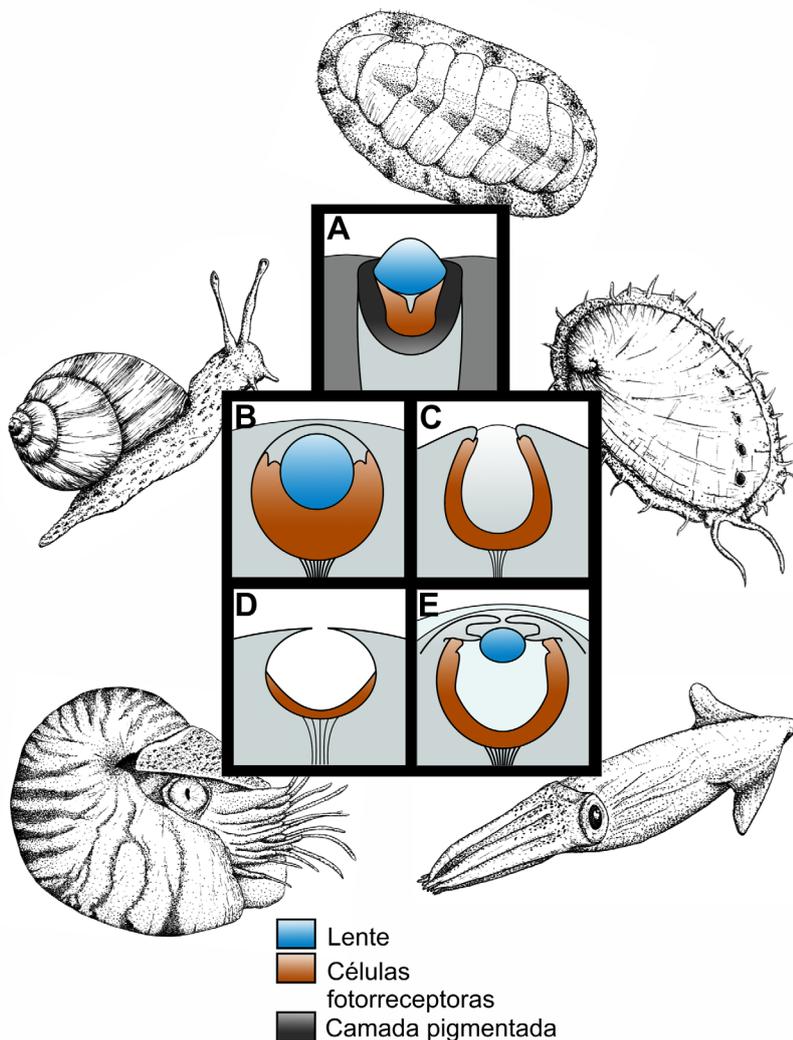


Figura 2. Diversidade de estruturas oculares em Mollusca. A. *Acanthopleura granulata* (Polyplacophora: Chitonidae). Quitons podem possuir milhares de estetos com ocelos desenvolvidos distribuídos ao longo das placas valvares. B. *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). Alguns gastrópodes terrestres apresentam olhos fechados no ápice dos tentáculos cefálicos. C. *Haliotis* sp. (Gastropoda: Haliotidae). Muitas espécies de gastrópodes marinhos possuem olhos abertos, preenchidos por uma matriz homogênea, e localizados na base dos tentáculos cefálicos. D. *Nautilus pompilius* (Cephalopoda: Nautilidae). Os náutilos possuem um par de olhos abertos do tipo câmara e com o interior em contato direto com o ambiente. E. *Doryteuthis plei* (Cephalopoda: Loliginidae). Lulas, sépias e polvos apresentam característico arranjo ocular fechado, do tipo câmara e com diversos componentes oculares.

vas anteriores (Speiser et al., 2011a). Pode haver também variedade nos tipos estruturais presentes, como ocelos intra e extra-pigmentares, que permitem a percepção de intensidade e direção da luz (Crozier, 1920; Fischer, 1978).

Surpreendentemente, casos de visão em baixa resolução ocorrem no grupo a partir de estruturas diferenciadas. Por exemplo, o quíton *Acanthopleura granulata* (Chitonidae) possui estetos cujos ocelos (Fig. 2A) contêm lentes compostas por aragonita, uma curiosa exceção entre os animais, os quais, em sua maioria, possuem lentes formadas por proteínas (Speiser et al., 2011a). Nesta espécie, a lente de aragonita é apontada como responsável, em parte, pela capacidade de formação de imagem na retina tanto na condição submersa como em exposição ao ar (Speiser et al., 2011a). Apesar das descrições gerais e dos estudos aprofundados com *A. granulata*, as estruturas fotorreceptoras dos poliplacóforos ainda foram pouco investigadas. Detalhes da anatomia e variação entre os diferentes grupos da classe são escassos, assim como estudos genéticos, ontogenéticos e fisiológicos.

Os gastrópodes, em sua maioria, apresentam olhos cefálicos localizados na base dos tentáculos. No caso dos gastrópodes pulmonados terrestres, os olhos são terminais, localizados no ápice dos tentáculos cefálicos (Mordan e Wade, 2008). Duas morfologias oculares podem estar presentes em Gastropoda: olhos fechados, que podem apresentar lentes, e olhos sem córnea, abertos para o meio (*open pit*) (Serb, 2008). De modo geral, tais condições morfológicas sugerem fotopercepção associada às classes II e III. Caramujos e lesmas terrestres, como o scargot (*Helix aspersa*, Helicidae), possuem estrutura ocular terminal com córnea, retina e lente celular (Fig. 2B) (Meisenhaimer, 1912). Gastrópodes marinhos do gênero *Littorina* (Littorinidae), comuns em costões rochosos, possuem organização similar, embora seus olhos ocorram na base dos tentáculos cefálicos (Seyer, 1992). Já em outros grupos, como no gênero *Haliotis* (Haliotidae), conhecidos como abalones, o olho possui uma abertura estreita para o meio, além de uma cavidade com retina e preenchimento gelatinoso homogêneo (Fig. 2C) (Cox, 1962). É interessante notar que, além dos olhos cefálicos, estudos morfofisiológicos também foram conduzidos com ocelos localizados em papilas dorsais de lesmas marinhas da família Onchidiidae (Katagiri et al., 2002).

As áreas mais estudadas no contexto da fotopercepção em Gastropoda são a ultraestrutura e a fisiologia, principalmente empregando espécies de pulmonados terrestres e aquáticos, que são modelos comuns em investigações sobre olhos (e.g., Bobkova et al., 2004; Zieger e Meyer-Rochow, 2008). A regeneração ocular é outro tema muito explorado, havendo ampla variedade de informações compiladas para diferentes espécies de gastrópodes (Tuchina e Meyer-Rochow, 2010). Detalhes da formação do órgão visual foram descritos para *Helix aspersa* (Eakin e Bradenburger, 1967), entretanto estudos mais recentes de morfogênese e expressão gênica são escassos para o grupo (e.g., O'Brien e Degnan, 2002).

Em Cephalopoda ocorrem dois padrões básicos de olhos cefálicos do tipo câmera. Na subclasse Nautiloidea,

cujos representantes são os náutilos, os olhos possuem uma organização conhecida como *pinhole camera*, pois se trata de uma cavidade aberta para o meio, sem lente nem córnea (Fig. 2D). Sendo assim, a retina está localizada ao fundo do olho e em contato direto com a água do mar (Muntz e Raj, 1984). Os olhos dos náutilos são relativamente grandes e estima-se que esse arranjo ocular permita percepção de movimento com alta resolução, contudo a sensibilidade é muito reduzida devido à pequena abertura ocular, limitando a captura de luz (Muntz e Raj, 1984; Muntz, 1999). Diferentes hipóteses sobre a evolução dos olhos associada a hábitos de vida em náutilos já foram levantadas, explorando principalmente a compatibilidade do sistema visual com visão a curta distância, movimentos lentos de natação e migração vertical (Muntz, 1999; Colicchia, 2006).

Na subclasse Coleoidea (lulas, sépias e polvos) ocorrem olhos do tipo câmera, cuja organização é a mais complexa dentre os invertebrados e de notável convergência com o modelo ocular de vertebrados, i.e., sistema de retina, lente, íris, pupila e córnea (Fig. 2E) (Young, 1971; Serb, 2008). Os olhos desses cefalópodes são classificados dentro da classe IV em razão de sua complexidade estrutural, alta resolução e vasto repertório de comportamentos visualmente guiados, sendo o único grupo de Mollusca a receber tal classificação (Nilsson, 2013). Dentre os cefalópodes, o olho mais sofisticado pertence às lulas (ordem Teuthida), contudo há grande variação na forma, simetria e composição ocular, de modo que diferentes aspectos da evolução do sistema visual em Coleoidea vêm sendo investigados em conjunto com informações sobre hábito de vida pelágico, profundidade de ocorrência, metabolismo e captura de presas (Sweeney et al., 2007; Serb, 2008). O sistema sensorial e nervoso de cefalópodes foi e ainda é o mais intensamente estudado em comparação com os demais grupos de moluscos. Neste sentido, é interessante ressaltar que informações mais detalhadas sobre anatomia ocular, neurofisiologia, comportamento e ecologia visual de cefalópodes podem ser encontradas na literatura (e.g., Hanlon e Messenger, 1996; Hanlon e Shashar, 2003; Nixon e Young, 2003; Sweeney et al., 2007).

## Bivalvia

Os moluscos bivalves são animais de corpo mole protegido por duas valvas e que apresentam extensa diversidade de formas e hábitos de vida (Giribet, 2008). O adulto não possui região cefálica e os diferentes tipos de órgãos sensoriais ocorrem principalmente concentrados no manto e em sua margem livre (Stasek e McWilliams, 1973; Yonge, 1983). Dentre os demais moluscos, os bivalves apresentam a maior diversidade de estruturas fotorreceptoras (Serb, 2008).

Segundo Morton (2008), a fotopercepção neste grupo pode ocorrer basicamente por três tipos: receptores simples do manto, ocelos cefálicos ou olhos paliais. O primeiro tipo corresponde a fotorreceptores simples, onde o próprio nervo palial contém células sensíveis à luminosidade (Kennedy, 1960). Essa condição sugere uma fotopercepção não-direcional vinculada à classe I. Res-

postas à sombra são típicas nesse caso, por exemplo, com consequente retração dos sífões. Esse tipo de mecanismo é observado em diversos bivalves, principalmente em habitantes de águas mais rasas e de substratos pouco profundos, como é o caso do escavador *Donax* (Donacidae), que responde a variações de luminosidade com ajustes de sua posição no sedimento (Ansell et al., 1998).

Os ocelos cefálicos foram descritos para a fase larval de representantes de apenas algumas famílias do agrupamento que inclui as ostras, vieiras e mexilhões (e.g., Cole, 1938; Hodgson e Burke, 1988; Carriker, 1990), o que levou à hipótese de que tais órgãos teriam surgido apenas uma vez em Bivalvia (Morton, 2008). Situados na região cefálica da larva (anteriormente às brânquias), os ocelos cefálicos possuem forma de taça pigmentar uniforme, podendo inclusive haver uma lente amorfa (Waller, 1981; Hodgson e Burke, 1988). Tais estruturas ocorrem apenas na fase larval e sofrem degeneração ao longo do desenvolvimento (Carriker, 1990). Apesar de aspectos funcionais serem ainda especulativos, o padrão morfológico para esses ocelos sugere uma fotopercepção direcional (classe II).

Os olhos paliais certamente compõem o tipo ocular que mais se destaca, tanto pela diversidade quanto pela plasticidade (Fig. 3). Tais estruturas ocorrem na margem livre do manto e assume-se que seu surgimento tenha ocorrido diversas vezes de forma independente ao lon-

go da evolução do grupo (Morton, 2008). A hipótese da evolução homoplástica de estruturas oculares em Bivalvia, principalmente de olhos paliais, é fortemente sustentada por diferentes dados morfológicos e ultraestruturais sobre diversidade de fotorreceptores nessa classe (Salvini-Plawen, 2008). Tal cenário é congruente com a evolução da fotopercepção em Mollusca e também entre os demais grupos de metazoários, cujo recrutamento e interação independente de genes regulatórios são responsáveis pela diversidade de estruturas oculares, muitas vezes com notáveis convergências evolutivas (Jonasova e Kozmik, 2008; Piatigorsky, 2008).

A borda livre do manto apresenta geralmente três pregas distintas e, segundo Morton (2008), a classificação dos olhos paliais em bivalves pauta-se na localização nessas pregas, havendo, portanto, três categorias de olhos. No primeiro tipo ocular, os olhos são formados na face interna da prega externa, sendo a porção mais externa responsável pela secreção dos componentes da valva. É interessante notar que o sulco entre a prega mediana e a externa é responsável pela secreção do perióstraco, camada proteica mais externa da concha. Devido a sua localização, as estruturas visuais ficam permanentemente sob a camada do perióstraco, o que limita a percepção luminosa (Morton, 1995).

Olhos paliais da prega externa estão presentes em algumas famílias de bivalves, i.e., Pteriidae, Limopsidae, Anomiidae e Arcidae (Morton, 2008). Para *Pteria brevialata* (Pteriidae), células fotossensíveis e células pigmentadas se agrupam na prega externa sob o perióstraco (Morton, 1995). Em espécies de Arcidae, como *Barbatia virescens* e *Anadara notabilis*, observam-se células fotossensíveis entremeadas às células pigmentadas formando pequenas cúpulas (Morton, 1987; Nilsson, 1994; Morton e Peharda, 2008). Já *Arca zebra*, *Arca noae* e *Barbatia cancellaria* apre-

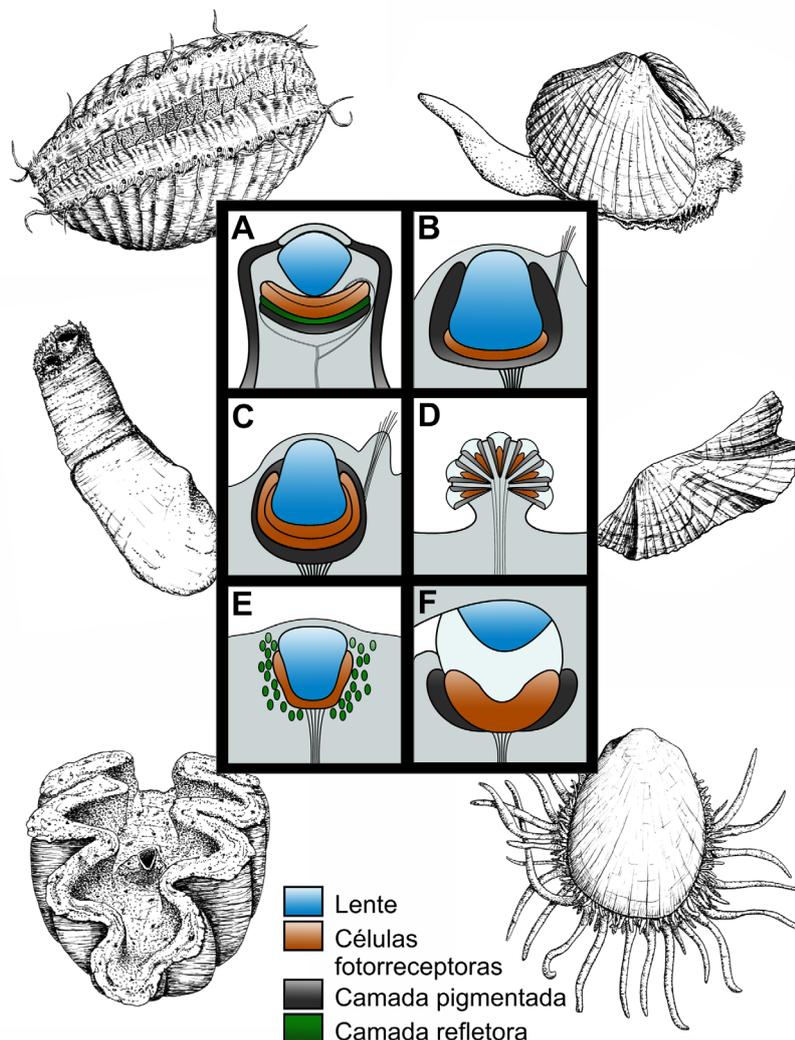


Figura 3. Representação de diferentes membros da classe Bivalvia com seus respectivos esquemas de olhos paliais em destaque. A. *Argopecten irradians* (Pectinidae), vieira que possui dezenas de olhos paliais espelhados na prega mediana do manto e distribuídos em ambos os lados do corpo. B. *Cerastoderma edule* (Cardiidae), bivalve que apresenta pequenos ocelos na região da prega palial interna em tentáculos associados aos sífões e à abertura ventral. C. *Laternula truncata* (Laternulidae), bivalve com olhos complexos presentes em tentáculos ópticos dos sífões. D. *Arca zebra* (Arcidae), bivalve que possui vários olhos compostos distribuídos na prega palial externa. E. *Tridacna maxima* (Tridacnidae), bivalve com milhares de ocelos associados a zooxantelas presentes na prega interna hipertrofiada do manto. F. *Tenoides floridanus* (Limidae), bivalve com olhos abertos para o ambiente e localizados na prega palial mediana.

sentam centenas de olhos compostos multifacetados cuja organização em omatídeos se assemelha superficialmente aos olhos compostos dos artrópodes (Fig. 3D) (Waller, 1980; Nilsson, 1994; Morton e Peharda, 2008). Cada unidade corresponde a um tubo afunilado, desprovido de lente e com células receptoras ao fundo cercadas por células pigmentadas (Nilsson, 1994). Tal arranjo indica uma fotopercepção direcional (classe II) associada ao fechamento das valvas por detecção de sombra e movimentos (Nilsson, 1994, 2013).

A formação de olhos paliais nas pregas mediana e interna é apontada como uma das possíveis condições que favoreceram o surgimento de estruturas visuais mais complexas (Morton, 2008). A vantagem oferecida no desenvolvimento de estruturas oculares nessas pregas é a ausência da cobertura do perióstraco, condição que pode estar associada ao aumento da resolução e sensibilidade visual (Morton, 2008).

A segunda categoria ocular corresponde aos olhos formados pelo lobo palial mediano, que estão presentes nas famílias Limidae, Pectinidae e Spondylidae (Dakin, 1928). Na base dos tentáculos de *Ctenoides floridanus* (Limidae), os olhos correspondem a invaginações da porção externa da prega mediana e possuem forma de taça pigmentar que envolve os fotorreceptores (Fig. 3F) (Morton, 2000a). Outro aspecto relevante é a presença de uma lente celular, contudo, o olho possui, curiosamente, conexão com o meio externo, sendo preenchido por uma matriz amorfa (Morton, 2000a). Com exceção dessas informações e daquelas acerca da fisiologia dos fotorreceptores de *Lima scabra* (Nasi, 1991), dados mais detalhados da anatomia, desenvolvimento e variabilidade ocular são ausentes para família.

Situação inversa ocorre com os olhos de vieiras (Pectinidae), possivelmente o grupo mais bem estudado dentre os Bivalvia quanto a aspectos visuais (Serb e Earnisse, 2008). Os olhos paliais deste grupo apresentam córnea, lente, retina dupla e outros componentes (Fig. 3A) (Dakin, 1910). É interessante notar que esse tipo ocular complexo ocorre tanto em Pectinidae, família de bivalves com grande capacidade de mobilidade, inclusive de natação, como em Spondylidae, que reúne bivalves sésseis que vivem cimentados ao substrato (Dakin, 1928; Speiser e Johnsen, 2008). Devido à proximidade de parentesco entre ambas as famílias citadas, supõe-se que esses olhos paliais já estivessem presentes em seu ancestral comum (Morton, 2008).

Os olhos das vieiras vêm sendo extensamente estudados quanto a aspectos de anatomia e fisiologia desde o início do século 20 (e.g., Dakin, 1910; Land, 1965; Barber et al., 1967; Speiser e Johnsen, 2008). Localizados no ápice de pequenos pedúnculos, os olhos ocorrem entre centenas de tentáculos na prega mediana da margem palial (Dakin, 1910). A retina dupla destes órgãos é formada por fotorreceptores em uma camada proximal, rabdomérica, e uma camada distal, ciliar (Barber et al., 1967). Além de diferirem quanto à morfologia, as camadas de retina possuem diferentes sensibilidades ao espectro de luz, o que se soma ao conjunto de evidências que apontam para a hipótese da

especialização dessas retinas para diferentes tarefas visuais, como detecção de movimentos (Speiser et al., 2011b). Abaixo da retina dupla há uma camada côncava refletora composta por cristais de guanina que refletem a luz como um espelho (Barber et al., 1967; Wilkens 2006). A luz que entra pela abertura ocular passa pela córnea e lente, sendo refletida no fundo do olho pela camada refletora de modo que a imagem em baixa resolução resultante é formada na retina (Land, 1964, Nilsson, 2013). Recentemente, estudos pioneiros em genética e transcriptoma de pectinídeos revelaram como genes que codificam fotoproteínas variam nesses animais, fornecendo dados para hipóteses sobre origem e evolução da base molecular da fotopercepção no grupo (Pairett e Serb, 2013; Serb et al., 2013).

Debates sobre função dos olhos em Pectinidae e Spondylidae são extensos, e muitas vezes não consensuais, principalmente devido à complexidade de fatores associados à evolução de tais órgãos (Morton, 2000b). Especula-se que seu papel funcional esteja relacionado à resposta de fuga de predadores em espécies com capacidade de natação, embora haja controvérsias nessa hipótese devido à participação de quimiorreceptores em tais tarefas (Wilkens, 2006). Dados de anatomia comparada também indicam variação ocular em função da mobilidade do organismo (Speiser e Johnsen, 2008). Funções relacionadas à orientação do animal no ambiente e substrato também foram sugeridas a partir de experimentos comportamentais com *Argopecten irradians* (Hamilton e Koch, 1996).

Finalmente, a última categoria de olhos corresponde àqueles formados na prega palial interna (i.e., famílias Myidae, Cardiidae, Tridacnidae, Laternulidae). A presença de um tufo ciliar associado ao órgão fotorreceptor parece comum neste caso, porém sua função é desconhecida (Morton, 2008). Na família Cardiidae, os olhos paliais mais estudados são os que ocorrem nos tentáculos dos sífios de *Cerastoderma edule*, cuja organização ocular é em forma de cúpula com células pigmentadas envolvendo os fotorreceptores (Fig. 3B) (Barber e Land, 1967).

Os representantes do gênero *Tridacna* (Tridacnidae), os maiores bivalves existentes, possuem numerosos ocelos ao longo da margem hipertrofiada do manto, a qual abriga milhares de zooxantelas (i.e., dinoflagelados fotossintetizantes endossimbiontes) (Yonge, 1936). Morfológicamente, os ocelos de *Tridacna* são muito similares aos de Cardiidae, contendo córnea, lente e retina; não obstante, há uma diferença fundamental associada à presença das zooxantelas localizadas no entorno dos componentes visuais (Fig. 3E). Essa organização ocular parece se utilizar dos simbiontes como refletores de luz, aumentando a eficiência de percepção direcional da luz (Fankboner, 1981; Wilkens, 1986). Apesar de haver poucos dados ultraestruturais e fisiológicos sobre os ocelos de Tridacnidae, um vasto repertório de comportamentos visualmente guiados foi registrado, como retração do manto e sífio, produção de jatos de água e fechamento das valvas (Wilkens, 1986; Land 2003). De modo geral, os dados de comportamento e anatomia sugerem fotopercepção direcional (classe II) como a classe morfofuncional desses bivalves.

Outro exemplo notável de organização estrutural

está presente nos representantes de Laternulidae, cujos olhos são muito semelhantes e tão complexos quanto os de Pectinidae. Entretanto, a distância filogenética entre essas famílias sugere um alto grau de convergência (Morton, 2008). Os olhos de *Laternula truncata*, associados aos tentáculos dos sífoes na prega interna do manto, possuem córnea, lente e duas camadas de retina (ambas com fotorreceptores rabdoméricos), além de um órgão sensorial ciliar acessório (Fig. 3C) (Adal e Morton, 1973; Morton, 1973). Todavia, não há mais informações além da anatomia geral desses olhos.

### Considerações finais

Ao longo das últimas décadas novas metodologias vêm sendo integradas a diferentes áreas do conhecimento na tentativa de esclarecer questões sobre a evolução e diversidade dos sistemas visuais animais. Dentre elas, destacam-se técnicas de biologia molecular, genética, ecologia comportamental e microscopia. Os debates sobre homologias e convergências ganham continuamente mais elementos à medida que novas informações são descobertas para diferentes grupos de animais, genes e proteínas. Consensos estão finalmente sendo definidos, principalmente quanto à variabilidade no recrutamento e expressão de genes ortólogos regulatórios. De modo geral, entretanto, a maior parte dos estudos sobre sistemas visuais é baseada em animais vertebrados, sendo estes os principais objetos de estudo na área. Para melhor compreender a evolução da visão em Metazoa, os invertebrados ganharam mais atenção nas últimas décadas, principalmente artrópodes, moluscos e, mais recentemente, cnidários.

Em Bivalvia, a diversidade de formas e organizações oculares é notável, atingindo surpreendentes níveis de especialização e convergência. Neste contexto, a borda do manto parece ser a região com maior plasticidade e variabilidade de sistemas oculares, abrigando tipos variados nas mais diferentes famílias. Embora descrições gerais de órgãos visuais sejam abundantes, essa classe de moluscos ainda carece de dados comparativos de anatomia e comportamento que correspondam à sua diversidade taxonômica. Diferentemente do estado do conhecimento sobre os olhos de cefalópodes e gastrópodes, informações morfológicas e ultraestruturais ainda são insuficientes para compreensão da diversidade e funcionamento de órgãos visuais em Bivalvia. Deve-se ressaltar ainda que a plasticidade de estruturas fotorreceptoras dos bivalves torna esses animais excelentes modelos para investigações sobre diversificação da fotopercepção.

Estudos moleculares voltados à pesquisa de fotorreceptores são escassos para o grupo, embora iniciativas recentes tenham contribuído significativamente no entendimento de sua maquinaria molecular. Neste sentido, novas perspectivas na compreensão da evolução dos olhos em bivalves devem surgir a partir de estudos de expressão gênica e regulação da formação de olhos. De forma complementar, investigações morfogenéticas também são carentes e devem acrescentar substancial informação sobre o tema ao grupo. Em síntese, o uso integrado de diferentes técnicas e abordagens mostra-se vital na continuidade dos

estudos sobre estruturas fotorreceptoras em Bivalvia.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio da Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 010/17000-5) e também às cuidadosas sugestões feitas por dois revisores anônimos, que contribuíram para o engrandecimento do presente artigo.

### Referências

- Adal MN, Morton B. 1973. The fine structure of the pallial eyes of *Laternula truncata* (Bivalvia: Anomalodesmata: Pandoracea). *Journal of Zoology* 170:533-556.
- Ansell AD, Gunther CP, Burrows MT. 1998. Partial emergence of the bivalve *Donax vittatus* in response to abrupt changes in light intensity and before spawning. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78:669-672.
- Arendt D. 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *International Journal of Developmental Biology* 47:563-571.
- Barber VC, Evans EM, Land MF. 1967. The fine structure of the eye of the mollusk *Pecten maximus*. *Zeitschrift für Zellforschung* 76:295-312.
- Barber VC, Land MF. 1967. The eye of the cockle, *Cardium edule*: anatomical and physiological investigations. *Cellular and Molecular Life Sciences* 23(8):677-678.
- Bobkova MV, Gál J, Zhukov VV, Shepeleva IP, Meyer-Rochow VB. 2004. Variations in the retinal designs of pulmonate snails (Mollusca, Gastropoda): squaring phylogenetic background and ecophysiological needs (I). *Invertebrate Biology* 123(2):101-115.
- Carriker MR. 1990. Functional significance of the pediveliger in bivalve development. In: Morton B, editor. *The Bivalvia: Proceedings of a Memorial Symposium in honour of Sir Charles Maurice Yonge (1899-1986) at the 9th International Malacological Congress, Edinburgh, 1986*. Hong Kong: Hong Kong University Press.
- Cole HA. 1938. The fate of larval organs in the metamorphosis of *Ostrea edulis*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 22:469-484.
- Colicchia G. 2006. Ancient cephalopod scavenges successfully with its pinhole eye. *Physics Education* 41:15-17.
- Cox KW. 1962. California abalones, family Haliotidae. *Fish Bulletin* 118.
- Crozier WJ. 1920. On the photic sensitivity of the chitons. *The American Naturalist* 54:376-380.
- Dakin WJ. 1910. The eye of *Pecten*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 55:49-112.
- Dakin WJ. 1928. The eyes of *Pecten*, *Spondylus*, *Amussium* and allied Lamellibranchs, with a short discussion on their evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B* 103:355-365.
- Eakin RM. 1965. Evolution of photoreceptors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 30:363-370.
- Eakin RM, Bradenburger JL. 1967. Differentiation in the eye of a pulmonate snail *Helix aspersa*. *Journal of Ultrastructure Research* 18:391-421.
- Erclik T, Hartenstein V, McInnes RR, Lipshitz HD. 2009. Eye evolution at high resolution: The neuron as a unit of homology. *Developmental Biology* 332:70-79.
- Fain GL, Hardie R, Laughlin SB. 2010. Phototransduction and evolution of photoreceptors. *Current Biology* 20:114-124.
- Fankboner PV. 1981. Siphonal eyes of giant clams and their relationship to adjacent zooxanthellae. *The Veliger* 23:245-249.

- Fernald RD. 2006. Casting a genetic light on the evolution of the eyes. *Science* 313:1914-1918.
- Fischer FP. 1978. Photoreceptor cell in chiton aesthetes. *Spixiana* 1:209-213.
- Fitzgerald WJ. 1975. Movement patterns and phototactic response of *Mopalia ciliata* and *Mopalia muscosa* in Marin County, California. *The Veliger* 18:37-39.
- Gehring WJ. 2005. New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *Journal of Heredity* 96(3):171-184.
- Gehring WJ. 2012. The animal body plan, the prototypic body segment, and eye evolution. *Evolution e Development* 14:34-46.
- Giribet G. 2008. Bivalvia. In: Ponder WF, Lindberg DR, editors. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press.
- Hamilton PV, Koch KM. 1996. Orientation toward natural and artificial grassbeds by swimming bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199:79-88.
- Hanlon RT, Messenger JB. 1996. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hanlon RT, Shashar N. 2003. Aspects of the sensory ecology of cephalopods. In: Collin SP, Marshall NJ. *Sensory processing in aquatic environments*. New York: Springer New York.
- Haszprunar G, Schander C, Halanych KM. 2008. Relationships of Higher Molluscan Taxa. In: Ponder WF, Lindberg DR, editors. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press.
- Hodgson CA, Burke RD. 1988. Development and larval morphology of the spiny oyster, *Chlamys hastata*. *Biological Bulletin* 174:303-318.
- Jonasova K, Kozmik Z. 2008. Eye evolution: lens and cornea as an upgrade of animal visual system. *Seminars in Cell e Developmental Biology* 19:71-81.
- Katagiri N, Suzuki T, Shimatani Y, Katagiri Y. 2002. Localization of retinal proteins in the stalk and dorsal eyes of the marine gastropod, *Onchidium*. *Zoological Science* 19(11):1231-1240.
- Kennedy D. 1960. Neural photoreception in a lamellibranch mollusc. *Journal of General Physiology* 44:277-299.
- Land MF. 1965. Image formation by a concave reflector in the eye of the scallop, *Pecten maximus*. *Journal of Physiology* 179:138-153.
- Land MF. 1992. The evolution of eyes. *Annual Review of Neurosciences* 15:1-9.
- Land MF. 2003. The spatial resolution of the pinhole eyes of giant clams (*Tridacna maxima*). *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 270:185-188.
- Land MF, Nilsson D. 2012. *Animal eyes*. Oxford: Oxford University Press.
- Meisenheimer J. 1912. Die weinbergschnecke *Helix pomatia* L. Leipzig: Werner Klinkhardt.
- Mordan P, Wade C. 2008. Heterobranchia II: the Pulmonata. In: Ponder WF, Lindberg DR, editors. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press.
- Morton B. 1973. The biology and functional morphology of *Laternula truncata* (Lamarck 1818) (Bivalvia: Anomalodesmata: Pandoracea). *Biological Bulletin* 145:509-531.
- Morton B. 1987. The pallial photophores of *Barbatia virescens* (Bivalvia: Arcacea). *Journal of Molluscan Studies* 53:241-243.
- Morton B. 1995. The biology and functional morphology of *Pteria breviaalata* (Bivalvia: Pterioidea) associated with gorgonians in Hong Kong. *Journal of Zoology* 236:223-241.
- Morton B. 2000a. The pallial eyes of *Ctenoides floridanus* (Bivalvia: Limidae). *Journal of Molluscan Studies* 66:449-455.
- Morton B. 2000b. The function of pallial eyes within the Pectinidae, with a description of those present in *Patinopecten yessoensis*. In: Harper EM, Taylor JD, Crame AJ. *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. The Geological Society of London, Special Publications 177:247-255.
- Morton B. 2008. The evolution of eyes in the Bivalvia: new insights. *American Malacological Bulletin* 26(1/2):35-45.
- Morton B, Peharda M. 2008. The biology and functional morphology of *Arca noae* (Bivalvia: Arcidae) from the Adriatic Sea, Croatia, with a discussion on the evolution of the bivalve mantle margin. *Acta Zoologica* 89:19-28.
- Moseley HN. 1884. On the presence of eyes and other sense-organs in the shells of the Chitonidae. *Annals and Magazine of Natural History* 5:141-147.
- Muntz WRA, Raj U. 1984. On the visual system of *Nautilus pompilius*. *Journal of Experimental Biology* 109:253-263.
- Muntz WRA. 1999. Visual systems, behaviour, and environment in cephalopods. In: Archer SN, Djamgoz MBA, Loew ER, Partridgeand JC, Vallerga S, editors. *Adaptive Mechanisms in the Ecology of Vision*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Nasi E. 1991. Whole-cell clamp of dissociated photoreceptors from the eye of *Lima scabra*. *Journal of General Physiology* 97:35-54.
- Nilsson D. 1994. Eyes as optical alarms systems in fan warms and ark clams. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 346:195-212.
- Nilsson D. 2004. Eye evolution: a question of genetic promiscuity. *Current Opinion in Neurobiology* 14:407-414.
- Nilsson D. 2009. The evolution of eyes and visually guided behavior. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364:2833-2847.
- Nilsson D. 2013. Eye evolution and its functional basis. *Visual Neuroscience* 30:5-20.
- Nixon M, Young JZ. 2003. *The brains and lives of cephalopods*. Oxford: Oxford University Press.
- O'Brien EK, Degnan BM. 2002. Developmental expression of a class IV POU gene in the gastropod *Haliotis asinina* supports a conserved role in sensory cell development in bilaterians. *Development Genes and Evolution* 212:394-398.
- Pairett AN, Serb JM. 2013. De novo assembly and characterization of two transcriptomes reveal multiple light-mediated functions in the scallop eye (Bivalvia: Pectinidae). *PLoS ONE* 8(7): e69852.
- Piatigorsky J, Kozmik Z. 2004. Cubozoan jellyfish: an Evo/Devo model for eyes and other sensory systems. *International Journal of Developmental Biology* 48:719-729.
- Piatigorsky J. 2008. Evolution of mollusc lens crystallins: Glutathione S-transferase/S-crystallins and aldehyde dehydrogenase/Ω-crystallins. *American Malacological Bulletin* 26(1/2):73-81.
- Ponder WF, Lindberg DR. 2008. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press.
- Ruzickova J, Piatigorsky J, Kozmik Z. 2009. Eye-specific expression of an ancestral jellyfish Pax B gene interferes with Pax6 function despite its conserved Pax6/Pax2 characteristics. *International Journal of Developmental Biology* 53:469-482.

- Salvini-Plawen L. 2008. Photoreception and the polyphyletic evolution of photoreceptors (with special reference to Mollusca). *American Malacological Bulletin* 26(1/2):83-100.
- Serb JM. 2008. Toward developing models to study the disease, ecology, and evolution of the eye in Mollusca. *American Malacological Bulletin* 26(1/2):3-18.
- Serb JM, Eernisse DJ. 2008. Charting evolution's trajectory: using molluscan eye diversity to understand parallel and convergent evolution. *Evolution Education Outreach* 1:439-447.
- Serb JM, Porath-Krause AJ, Pairett AN. 2013. Uncovering a gene duplication of the photoreceptive protein, opsin, in scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Integrative and Comparative Biology* 53:68-77.
- Seyer J. 1992. Resolution and sensitivity in the eye of the winkle *Littorina littorea*. *Journal of Experimental Biology* 170:57-69.
- Speiser DI, Johnsen S. 2008. Comparative morphology of the concave mirror eyes of scallops (Pectinoidea). *American Malacological Bulletin* 26:27-33.
- Speiser DI, Eernisse DJ, Johnsen S. 2011a. A chiton uses aragonite lenses to form images. *Current Biology* 21:665-670.
- Speiser DI, Loew ER, Johnsen S. 2011b. Spectral sensitivity of the concave mirror eyes of scallops: potential influences of habitat, self-screening and longitudinal chromatic aberration. *Journal of Experimental Biology* 214:422-431.
- Stasek CR, McWilliams WR. 1973. The comparative morphology and evolution of molluscan mantle edge. *The Veliger* 16:1-19.
- Sweeney AM, Haddock SHD, Johnsen S. 2007. Comparative visual acuity of coleoid cephalopods. *Integrative and Comparative Biology* 47(6):808-814.
- Todt C, Okusu A, Schander C, Schwabe E. 2008. Solenogastres, Caudofoveata, and Polyplacophora. In: Ponder WF, Lindberg DR, editors. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press.
- Tuchina O, Meyer-Rochow VB. 2010. Regeneration of the visual system in gastropods (Mollusca). *Invertebrate Biology* 129(1):27-38.
- Vopalensky P, Kozmik Z. 2009. Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364:2819-2832.
- Waller TR. 1980. Scanning electron microscopy of shell and mantle in the order Arcoida (Mollusca: Bivalvia). *Smithsonian Contributions to Zoology* 313:1-58.
- Waller TR. 1981. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Smithsonian Contributions to Zoology* 328:1-70.
- Wilkins LA. 1986. The visual system of the giant clam Tridacna: behavioral adaptations. *Biological Bulletin* 170:393-408.
- Wilkins LA. 2006. Neurobiology and behaviour of the scallop. In: Shumway SE, Parsons GJ, editors. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Amsterdam: Elsevier.
- Yonge CM. 1936. Mode of life, feeding, digestion and symbiosis with zooxanthellae in the Tridacnidae. *Scientific Reports of the Great Barrier Reef Expedition 1928-1929* 1:283-321.
- Yonge CM. 1983. Symmetries and the role of the mantle margins in the bivalve Mollusca. *Malacological Review* 16:1-10.
- Young JZ. 1971. *The anatomy of the nervous system of Octopus vulgaris*. Oxford: Clarendon Press.
- Zieger MV, Meyer-Rochow VB. 2008. Understanding the cephalic eyes of pulmonate gastropods: a review. *American Malacological Bulletin* 26:47-66.

# Biologia Sintética: possibilidades e desafios

## Synthetic Biology: possibilities and challenges

Jossan Borba Gomes Silva<sup>1\*</sup> e Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biomedicina, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Salvador-BA

<sup>2</sup> Mestrado Profissional em Bioenergia, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Salvador - BA

\*Contato: jossanborba@gmail.com

**Resumo.** A biologia sintética, principalmente por causa das técnicas desenvolvidas, adquiriu atenção distinta entre cientistas, ambientalistas, políticos, bem como a sociedade, após o feito mais significativo até então: criação do primeiro organismo vivo controlado por um genoma sintético, isto é, a bactéria *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0. Portanto, o foco deste estudo foi realizar uma revisão da literatura sobre a biologia sintética, com o objetivo de identificar as possibilidades e os desafios existentes. Assim, os dados foram coletados a partir de publicações indexadas em bases de dados eletrônicas e a análise dos dados revelou que existem possibilidades de aplicações práticas para a indústria, meio ambiente e saúde humana, mas estas serão acompanhadas por desafios significativos.

**Palavras-chave.** Genoma sintético; *Mycoplasma mycoides*; tecnologias emergentes.

**Abstract.** Synthetic Biology, mainly because of the techniques developed, has acquired distinct attention among scientists, environmentalists, political as well as the society after the more significant accomplishment until then: creation of the first living organism controlled by a synthetic genome; i.e., the bacterium *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0. Therefore, the focus of this study was to undertake a review of the literature on synthetic biology with the aim of identifying existing possibilities and challenges. Thus, the data were collected from indexed publications in electronic databases; the data analysis revealed that there are possibilities for practical applications for industry, environment, and human health; but these possibilities will be accompanied by significant challenges.

**Keywords.** Emerging technologies; *Mycoplasma mycoides*; synthetic genome.

Recebido: 07jan14

Aceito: 21jan15

Publicado:

31jul2015

Revisado por

Carlos Ribeiro

Vilela, Lucas

Garbini Cespedes e

Carolini Kaid Dávila

## Introdução

Desde 2003, cientistas desenvolvem uma nova tecnologia denominada biologia sintética, ou *synbio*, como sendo o limite seguinte da biociência (EASAC, 2011). Tratando-se de uma abordagem sistêmica, interdisciplinar e multiprofissional, principalmente por causa das técnicas desenvolvidas, adquiriu atenção distinta entre cientistas, ambientalistas, políticos, bem como a sociedade (Schneider, 2007).

Em 2010, por meio de uma publicação dos cientistas do *J. Craig Venter Institute* (JCVI – instituto fundado pelo bioquímico, geneticista e empresário norte-americano John Craig Venter), na revista *Science*, foi descrito o feito mais significativo até então: criação do primeiro organismo vivo controlado por um genoma sintético, isto é, a bactéria *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0. (Gibson et al., 2010). Tal descrição apresentou-se como uma promissora e alarmante preparação para o objetivo maior de transformar microrganismos naturais (bactérias, leveduras, algas e vírus) em sintéticos (com genomas sintéticos) para realizarem funções predefinidas e específicas (Centro Ecológico, 2009-2010).

Após o feito de 2010, relevantes ponderações surgiram sobre o desenvolvimento de técnicas ainda pouco compreendidas, ou seja, se estas apresentariam mais resultados positivos ou negativos (ETC Group, 2010a,b; Kaiser, 2010). E seguindo estas ponderações, consideráveis questionamentos

começaram a ser feitos: O que é biologia sintética? Quais são as possibilidades e os desafios, principalmente, para indústrias, meio ambiente e saúde humana?

Sendo assim, o presente trabalho justifica-se pela abordagem dos fundamentos dessa nova tecnologia emergente, com o objetivo de identificar as possibilidades e os desafios existentes.

## Revisão da literatura

### Biologia sintética

O primeiro laboratório licenciado para pesquisas com biologia sintética foi criado em 2003, numa instituição dos Estados Unidos da América (E.U.A) – *Lawrence Berkeley National Laboratory* (EASAC, 2011). Todavia, até 2006, a biologia sintética existiu apenas como uma visão informal de como inovar a biologia de sistemas, por exemplo, testando-se a montagem aleatória de elementos genéticos. Finalmente, a partir de 2009, ratificou-se, entre os pesquisadores, uma definição precisa: biologia sintética é a engenharia genética, porém, digital e padronizada (Rabinow e Bennett, 2009).

Definida como digital e padronizada, pois, os cientistas utilizam e/ou modificam técnicas de outras áreas biológicas, tais como: engenharia genética, microbiologia e bioinformática, para transformarem microrganismos naturais em sintéticos de modo sistemático (Centro Ecológico, 2009-2010).

Com a utilização do conjunto das técnicas, ácidos

desoxirribonucleicos (*DNAs*) são projetados *in silico*, sintetizados e transplantados em microrganismos, cujos genes constituintes são utilizados como ferramentas especiais para aplicações funcionais específicas, singulares e padronizadas (Schneider, 2007). Em linguagem própria, utilizada por pesquisadores acadêmicos e, paralelamente, por entusiastas da nova tecnologia, *biohackers* e *biopunks* – programadores informáticos com considerável entendimento biológico –, os procedimentos são feitos em um *hardware* (parte física do computador) e em um *software* (parte lógica do computador; programa), onde o *hardware* refere-se a organismos vivos e o *software* representa o *DNA* sintético, projetado em ambiente virtual, que contera um *script* (série de comandos informáticos programáveis), os quais, ao serem integrados, resultarão em respostas conjuntas entre o *hardware* e o *software*, isto é, pelo microrganismo sintético (Wohlsen, 2011).

Tal definição, digital (informatizada) e padronizada (sistemática), após experimento malsucedido em 2006, tornou-se possível em 2010, em experimento bem-sucedido, com a transformação de uma espécie de bactéria preexistente em uma nova subespécie sintética viva.

#### O microrganismo sintético

A etapa inicial foi a concepção *in silico* do genoma sintético, no computador, por meio da utilização de softwares, a partir da sequência de 1.077.947 pares de bases (pb) nitrogenadas do genoma natural da espécie *M. mycoides*<sup>1</sup>. Genoma este disponível no *GenBank* – banco virtual de dados genéticos e moleculares dos E.U.A – do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (Pivetta, 2010).

Em seguida, foi inserido um transposon da bactéria *Escherichia coli*<sup>2</sup> e removidos quinze genes naturais para a inserção de seis, sendo um de resistência ao antibiótico tetraciclina, quatro marcadores, denominados *watermark* (marca d'água), e um reativo, para a reação colorimétrica, às sequências que seriam transplantadas nas células receptoras de transplante da espécie *Mycoplasma capricolum*<sup>3</sup>. Estes genes foram necessários para distinguir os genomas sintéticos dos naturais e as colônias teste e controle, cujas bases nitrogenadas purínicas (A e G) e pirimidínicas (C e T) foram emparelhadas sequencialmente (Adenina + Timina, Citosina + Guanina; A + T, C + G), de modo a estarem criptografadas (illegíveis em acesso não autorizado), contendo *tags* em *HTML* (linguagem de marcação em hipertexto que correlaciona conteúdo e facilita buscas), um *URL* (localizador padrão de recursos), com o endereço do *website* (conjunto de páginas virtuais em hipertexto) do instituto, além dos nomes dos cientistas e citações de algu-

1. Espécie de bactéria desprovida de parede celular, pleomórfica e parasita de bovinos, caprinos e ovinos.
2. Espécie de bactéria Gram-negativa, colonizadora do trato intestinal de mamíferos, com subtipos patogênicos.
3. Espécie de bactéria do mesmo gênero e com as mesmas características da espécie da nota 1.
4. Espécie de levedura utilizada na produção de etanol e certas bebidas alcoólicas e alimentos fermentados.
5. Há divergências entre pesquisadores, com relação ao termo "sintético": para alguns deles, trata-se de "semisintético", sendo uma subespécie resultante da hibridação de espécies preexistentes, e não totalmente nova; no entanto, para a maioria é "sintético", pois não existia tal microrganismo antes do resultado final do experimento de 2010.

mas das técnicas utilizadas no experimento; programas de computador auxiliaram, *in silico*, na fragmentação do genoma em 1.100 partes aproximadamente iguais, cada uma contendo cerca de 1.080 pb (Gibson et al., 2010; Chen et al., 2012).

Posteriormente, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*<sup>4</sup> foi utilizada para unir *in vitro* os fragmentos em *DNAs* circulares. Foram adicionadas aos fragmentos pequenas sequências terminais de ligação (prefixos e sufixos) com a finalidade de, após tratados quimicamente, tornar possível as ligações e fusões dos mesmos em segmentos únicos de *DNAs* circulares, isto é, em plasmídeos sintéticos, os genomas sintéticos completos (O Globo, 2010).

Na etapa final, extraídos das leveduras, os plasmídeos sintéticos foram suspensos em solução química com as bactérias receptoras de transplante, plaqueadas em meio ágar SP4, contendo o substrato cromogênico X-gal e o antibiótico tetraciclina, e incubadas a 37 °C por 72 horas. Após o período de incubação, numa proporção de 100.000:1, as células de *M. capricolum* transformadas cresceram e formaram colônias que expressaram apenas proteínas da espécie natural *M. mycoides*. As colônias teste ficaram concêntricamente coradas, devido ao gene *lacZ* inserido ao *DNA* sintético, qual sintetizou a enzima  $\beta$ -galactosidase, pela conversão do substrato cromogênico em compostos azulados.

Enfim, as colônias teste foram comparadas às colônias controle *Wild Type (WT)*, com o genoma natural da bactéria *M. mycoides*, as quais, sem o gene *lacZ*, permaneceram esbranquiçadas; como podem ser vistas na Figura 2A-B (Bouzarc, 2010; Gibson et al., 2010).

Após quatro anos, em 2010, estava transformado o

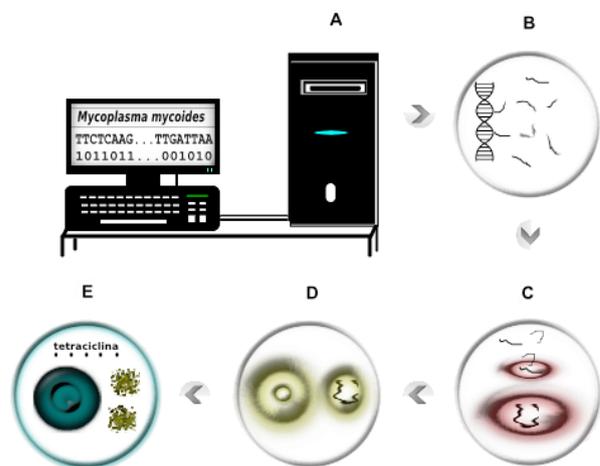


Figura 1. Etapas do processo de transformação do microrganismo natural em sintético. (A) Concepção do genoma natural da bactéria *Mycoplasma mycoides* em ambiente virtual; (B) Síntese, inserção dos genes e transposon e fragmentação do genoma sintético; (C) União dos fragmentos, por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e formação do plasmídeo sintético; (D) Transplante do plasmídeo sintético na bactéria receptora da espécie *Mycoplasma capricolum*; (E) Morte da célula sem o gene de resistência ao antibiótico tetraciclina e transformação da bactéria da espécie natural, *Mycoplasma capricolum*, em uma nova subespécie sintética, o microrganismo sintético – *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0.

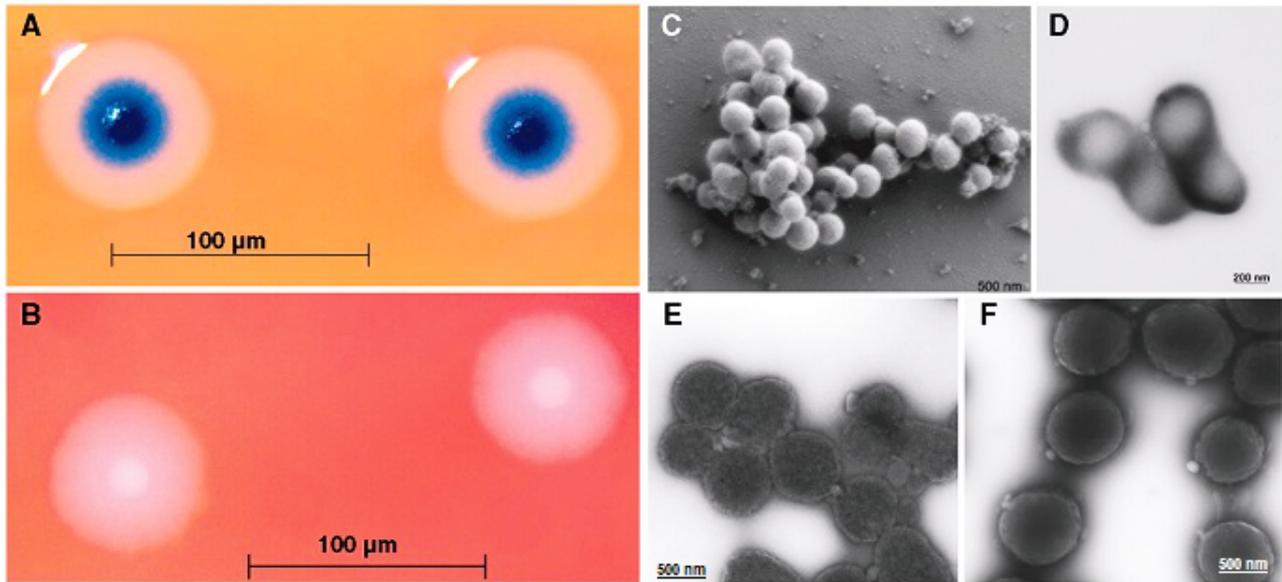


Figura 2. Morfologias e arranjos das colônias e células dos experimentos de 2006 e 2010. (A) Colônias teste de *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0; (B) Colônias controle *Wild Type* (WT); (C) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células controle WT; (D) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células controle WT; (E) MET de células teste de *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 do experimento de 2010; (F) MET de células controle WT do experimento de 2006.

Extraído de: *J. Craig Venter Institute*, 2010 (autorizado e adaptado).

primeiro ser vivo natural em sintético. A subespécie transformada, por meio da hibridação entre a célula e o genoma modificado, respectivamente, das espécies *M. capricolum* e *M. mycoides*, foi tecnicamente denominada *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, pelos cientistas do JCVI; apelada como “*synthia*”, pelos ambientalistas do *ETC Group*; e genericamente descrita como “microrganismo sintético”<sup>5</sup>; principalmente, pelos meios de comunicação (Centro Ecológico, 2009-2010; EASAC, 2011; ETC Group, 2010c; Lopes, 2010).

Este foi o resultado de quinze anos de pesquisas e experimentos realizados pelos cientistas do JCVI (O Globo, 2010). As Figuras 1 e 2 ilustram, conjunta e resumidamente, as etapas do processo de transformação do microrganismo natural em sintético e as morfologias e arranjos das colônias e células dos experimentos de 2006 e 2010.

O resultado positivo do experimento também possibilitou que mais estudos, em diversas áreas do conhecimento, fossem feitos por outros cientistas; e alguns destes estudos estão resumidamente descritos a seguir.

## Possibilidades

### Partes padronizadas

Denominadas em conjunto como *biobricks* (biotijolos), pela analogia com o brinquedo de montar peças “Lego”, as partes padronizadas foram inicialmente desenvolvidas por ex-professores do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT), em 2003 (Khan, 2014); onde, no mesmo ano, foi iniciada também a *International Genetically Engineered Machine* (iGEM – competição internacional de engenharia de sistemas biológicos). Elas representam o princípio da padronização denominado singularidade, ou seja, um conceito que abrange a forma de utilização técnica de elementos genéticos para aplicações diversas definidas (Pasotti et al., 2012).

As sequências de nucleotídeos dos *biobricks* são projetadas para serem montadas na construção de novos circuitos e sistemas biológicos com aplicações específicas, por exemplo: síntese de proteínas e produção de compostos, entre outras. São constituídas por genes que atendem a critérios preestabelecidos, garantem a compatibilidade entre as partes e mantêm o formato da montagem básica, definindo-as, portanto, como peças padrão (Knight, 2003). Cada peça padrão é construída com extremidades para junções, prefixos e sufixos, e pontos de clivagem para as enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI* e *SpeI* (Constante et al., 2011).

### Indústria

Na indústria bioenergética: os principais estudos são com relação à possibilidade de desenvolvimento do combustível regenerativo, utilizando-se da eletricidade para decompor água em hidrogênio e oxigênio na obtenção de energia constante; novos tipos de biocombustíveis de segunda geração, mais limpos, a base de cana-de-açúcar, por meio da fotossíntese induzida artificialmente, além de resíduos orgânicos da agricultura, evitando-se a competição com plantas cultivadas para fins alimentares. Na indústria agrícola: novos aditivos alimentares e o melhoramento de alimentos. Na indústria química: a produção em larga escala de compostos e produtos químicos, incluindo-se novos tipos de fibras, plásticos, tintas e adesivos (Pivetta, 2010). Na indústria tecnológica: fabricação de componentes eletroeletrônicos, tais como, circuitos integrados, baterias renováveis, microprocessadores. Na indústria farmacêutica: novas drogas e novos métodos terapêuticos (ver: *Engenharia metabólica e produção de novas drogas sintéticas; Combate a infecções; Tratamento do câncer; Desenvolvimento de novas vacinas; Câncer*).

### Meio ambiente

Destaca-se a utilização de algas marinhas para a detecção de poluentes marinhos e sua remoção pela captação do dióxido de carbono, em casos de desastres naturais ocorridos por vazamento de petróleo em navios petroleiros, bem como a biorremediação, em contaminações de recursos hídricos por metais pesados (Chen et al., 2012).

Segundo as publicações pesquisadas, dentre as considerações dos autores, verificou-se também significativas possibilidades na área da saúde humana.

#### *Engenharia metabólica e produção de novas drogas sintéticas*

Utilização dos biobricks para sintetizar e transplantar genomas contendo apenas genes específicos, além da eliminação de genes próprios, do ponto de vista humano, visando a melhoria das atividades metabólicas dos microrganismos pela manipulação de suas funções enzimáticas. Em síntese, modificar o metabolismo do microrganismo, eliminando a produção de determinadas substâncias indesejáveis, para produzir proteínas úteis aos processos metabólicos de seres humanos (Schneider, 2007), como, por exemplo, a insulina.

Com relação às novas drogas, destacam-se: a utilização da bactéria *E. coli*, para a produção do ácido artemisínico, precursor da artemisinina (substância ativa da droga antimalárica), por meio da fermentação e transformação por via fotoquímica; utilização da levedura *S. cerevisiae*, para as produções do composto taxol, na produção de antitumoral, e na síntese do acetado de hidrocortizona, na produção de anti-inflamatórios esteroides a partir da glicose (EASAC, 2011).

#### *Combate a infecções*

Possibilidade do desenvolvimento de antibióticos, por meio da criação de bacteriófagos sintéticos, contra infecções por bactérias produtoras de biofilme (Sonnenburg, 2011).

Em estudos feitos por Ruder et al. (2011), bactérias da espécie *E. coli*, quando infectadas por bacteriófagos, tiveram desligados os mecanismos de resistência que as protegem dos antibióticos numa taxa de prevalência de até 80%; se comparados, uma eficácia de 60% maior que os 20% obtidos com os métodos antibioticoterápicos convencionais utilizados atualmente.

#### *Tratamento do câncer*

A possibilidade está na eliminação de células cancerosas do organismo humano sem danificar o tecido associado. Para tanto, Ruder et al. (2011), em estudo descrevendo testes feitos em ratos de laboratório, utilizando bactérias modificadas para invadir as células cancerosas, demonstraram que bactérias sintéticas podem infectar, por exemplo, as células do cancro do cólon do útero e inativar o gene *CTNGB1*, inibindo a sua expressão e a invasão celular, bem como, conseqüentemente, eliminando a ocorrência de metástase.

#### *Desenvolvimento de novas vacinas*

A vacina atuaria inoculando-se ao hospedeiro a bac-

téria atenuada e com o gene “antigênico”, responsável por iniciar uma resposta imune no hospedeiro, que sintetizaria um tipo específico de proteína com característica antigênica. Esta proteína induziria a produção e diferenciação de células e proteínas de defesa (linfócitos B, plasmócitos e imunoglobulinas) contra futuras invasões pela própria bactéria patogênica. No entanto, o mecanismo de atenuação é complexo e arriscado, pelo qual, podendo ocorrer conjugação bacteriana, mutação genética e ação reversa, a bactéria passaria a atacar o próprio hospedeiro (Noorden, 2010).

Os estudos publicados (Tabela 1), apesar de hipotéticos, com alguns testes realizados, apresentam relevantes aplicações às indústrias, ao meio ambiente e à saúde humana. Entretanto, também apresentam desafios significativos em relação à ética, ao meio ambiente, à biossegurança (Figura 3), à biopirataria, ao bioterrorismo, à falta de regulamentação e ao regime de patentes excessivos.

### **Desafios**

#### *Biossegurança*

De um modo geral, os desafios relacionados à biossegurança são de dois tipos:

(i) *Biosafety* (libertação acidental): Risco de incidentes ou acidentes involuntários, por acontecimentos não previstos, envolvendo a manipulação inadequada dos microrganismos.

Bactérias têm a capacidade de trocar rapidamente informação genética com outras bactérias, sob condições adequadas (Kelle, 2009), caracterizando um dos riscos; e

(ii) *Biosecurity* (libertação premeditada): Utilização de microrganismos, sequências de DNAs e moléculas sintéticas, com intenções criminosas, para a produção de novas e letais armas biológicas; devido, também, à falta de regulamentação (EASAC, 2011; PCSBI, 2010).

#### *Regulamentação e patenteamento*

Há o risco da perda de direitos de populações vulneráveis, como as pequenas cooperativas de agricultores, pela falta de regulamentações específicas e dos patenteamentos excessivos (Calvert e Martin, 2009). De acordo com o gerente de programas do *ETC Group* (Grupo de Ação em Erosão, Tecnologia e Concentração), Jim Thomas:

“Não há regulação e a autorregulação é igual a nenhuma regulamentação. Estas recomendações dão à indústria um passe livre e não garantem que o ambiente e a saúde pública estejam protegidos. É preciso de uma regulamentação maior, mais transparente para a Biologia Sintética, e não menos” (Jim Thomas apud ETC Group, 2010b).

Ainda assim, segundo Wadman (2010), boa regulamentação, embora essencial, é limitada contra bioterroristas interessados na biologia sintética para produzirem armas biológicas.

#### *Biopirataria digital e bioterrorismo*

O modo como a biologia sintética está sendo desenvolvida, possibilita que biopiratas possam acessar os recursos genéticos livremente e utilizá-los de forma ilegal. Além disso, com o bioterrorismo, a tecnologia pode ser utilizada para criar linhagens de novos microrganismos sintéticos patogênicos ou recriar microrganismos já extintos para a reprodução de toxinas letais (Centro Ecológico, 2009-2010; Rabinow e Bennett, 2009).

#### Ambiental

Segundo publicação da ONG brasileira Centro Ecológico:

“[...] microrganismos sintéticos liberados no ambiente (deliberadamente ou inadvertidamente) podem apresentar transferências horizontais de genes, afetando equilíbrios bióticos, ou evoluir para além das funções para as quais foram programados, com risco de efeitos colaterais desconhecidos e sem precedentes sobre o ambiente, sobre outros organismos e a saúde. Atendendo ao princípio da precaução, deveria ser proibida a liberação no ambiente até que haja um amplo debate social, uma avaliação de riscos feita para cada aplicação proposta, considerando todo o seu ciclo de vida [...]” (Centro Ecológico, 2009-2010).

#### Métodos

Para o presente artigo de revisão da literatura, foi realizada a pesquisa qualitativa, buscando-se por publicações indexadas nas seguintes bases de dados eletrônicas: (i) internacionais: MIT (*Massachusetts Institute of Technology*; www.web.mit.edu), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; www.ncbi.nlm.nih.gov), *Nature* (www.nature.com), *Science* (www.sciencemag.org) e *ETC Group* (*Action Group on Erosion, Technology and Concentration*; www.etcgroup.org); e (ii) nacionais: jornais Estadão (www.estadao.com.br), Folha de S. Paulo (www.folha.uol.com.br) e O Globo (www.oglobo.globo.com), bem como a Revista Galileu (www.revistagalileu.globo.com). Para as buscas das publicações, utilizou-se dos descritores: “*Synthetic Biology*”, “*Biología Sintética*” e “*Biologia Sintética*”, respectivamente, nas línguas inglesa, espanhola e portuguesa.

Como critério de inclusão, as publicações foram selecionadas quanto aos: dados primários, publicações no período de cinco anos (2008 a 2012) e descritores apresentados em título ou resumo. Para o critério de exclusão: publicações fora do período dos cinco anos previamente estabelecidos.

Para o tratamento e análise dos dados, optou-se pela amostragem por saturação, sendo considerado o universo de 4.612 publicações, das quais foram selecionadas 943 como elementos representativos da amostra, posteriormente, distribuídas por base eletrônica e publicação por ano com os totais individuais por base eletrônica e os totais gerais por ano, bem como, em frequência relativa por área pesquisada, para distribuir os dados em gráfico de setores.

Referente ao aspecto ético, todas as instituições, as publicações específicas, utilizadas para elaborar este tra-

balho, e seus respectivos autores estão citados e referenciados.

## Resultados e Discussão

### Resultados

Do total das 943 publicações analisadas, de 2008 a 2012, os resultados demonstram, por meio dos dados da Tabela 1, um crescente número de publicações a partir do ano de 2008 (104), seguidas por 2009 (145) e 2010 (240), Tabela 1. Distribuição dos dados por ano e base eletrônica consultada

Bases eletrônicas	Publicações por ano					Total
	2008	2009	2010	2011	2012	
<i>Nature</i>	55	33	75	77	125	365
<i>Science</i>	17	29	37	62	33	178
NCBI	15	45	42	26	35	163
ETC Group	13	26	18	16	33	106
O Globo	1	5	17	13	4	40
Estadão	1	-	23	7	4	35
MIT	-	7	7	8	5	27
Folha de S. Paulo	2	-	14	-	3	19
Revista Galileu	-	-	7	3	-	10
<b>Total</b>	<b>104</b>	<b>145</b>	<b>240</b>	<b>212</b>	<b>242</b>	<b>943</b>

com discreto decréscimo em 2011 (212) e finalizando com o maior resultado em 2012 (242). Dentre as bases eletrônicas consultadas, internacionais, a *Nature* apresenta o maior número total de publicações (365), em comparação com as demais (*Science*, 178; NCBI, 163; *ETC Group*, 106; e MIT, 27). Entre as nacionais, O Globo obteve o maior número no total de publicações (40), em relação às demais (Estadão, 35; Folha de S. Paulo, 19; e Revista Galileu, 10).

Entre as variáveis com as maiores frequências, como

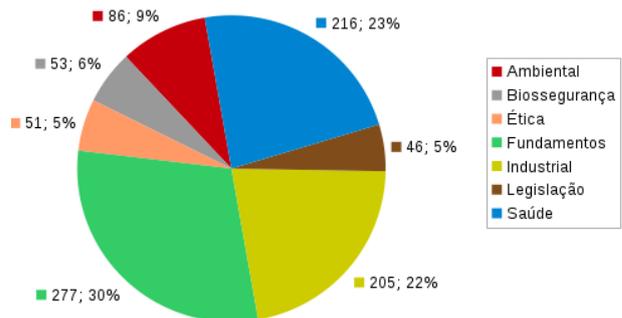


Figura 3. Frequência relativa dos dados por área pesquisada

ilustrado no gráfico de setores (Figura 3), estão: Fundamentos, com o maior número de publicações no total (277), assim como em porcentagem (30%), seguida por Saúde (216 e 23%) e Indústria (205 e 22%). Em contrapartida, as variáveis: Ambiental (86 e 9%), Biossegurança (53 e 6%), Ética (51 e 5%) e Legislação (46 e 5%) encontram-se, em relação às primeiras, consideravelmente discrepantes e com as menores frequências no mesmo período.

### Discussão

É possível verificar que a biologia sintética, apesar de emergente, já está estabelecida (Figuras 1 e 2). No entanto, observa-se também que existem linhas de raciocínios distintos: (i) pesquisadores que publicaram as possibilidades industriais (energética, química, agrícola e farmacêutica), benéficas tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana: produção de produtos sintéticos, biocombustíveis ecologicamente corretos, métodos de descontaminação ambiental, novos produtos farmacêuticos e métodos terapêuticos, tais como, vacinas, tratamento contra o câncer, combate a infecções e novas drogas sintéticas; e (ii) organizações não governamentais que publicaram os desafios: biopirataria digital, bioterrorismo, falta de regulamentação específica, regime de patenteamento não controlado de materiais genéticos e a falta de biossegurança, cuja liberação acidental ou criminosa de microrganismos sintéticos no meio ambiente poderia resultar em crescimentos incontrolláveis e danosos com consequências ainda desconhecidas.

Portanto, entende-se que é necessária a criação tanto de um conselho deliberativo internacional quanto de sociedades científicas nacionais, que regulamentem as atividades correlacionadas e corroborem entre si na normatização legal e fiscalização da biologia sintética.

## Conclusão

Pelo exposto na presente revisão, pode-se asseverar que a biologia sintética, apesar de emergente, já está estabelecida como biociência. Tendo suas atividades oficialmente iniciadas em 2003, tornou-se o cerne das atenções de cientistas, políticos, ambientalistas e da sociedade quando, em 2010, os cientistas do *JCVI* publicaram um artigo na revista *Science* descrevendo as técnicas aplicadas na transformação da bactéria *Mycoplasma capricolum* em uma nova subespécie, controlada por genoma sintético, denominada *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 (Figuras 1 e 2). Deixando de ser uma abordagem informal da biologia de sistemas para ser uma nova e independente ciência, ratificou as atenções para si e estimulou o crescente número de publicações.

A partir das 943 publicações selecionadas (Tabela 1), de um período de cinco anos (2008 a 2012), a análise dos dados revelou que existem possibilidades de aplicações práticas à indústria, ao meio ambiente e à saúde humana, mas estas serão acompanhadas por desafios significativos, ficando evidentes as expectativas e as desconfiças dos pesquisadores por áreas (Figura 3), por meio de divergentes interesses: (i) apresentar as possibilidades de desenvolvimento e (ii) alertar para os desafios (e riscos) provenientes deste mesmo desenvolvimento. Em se tratando de uma tecnologia emergente, fato é que ainda há muito o que ser feito (ou não) para que sejam cientificamente confirmados todos os argumentos apresentados pelos autores de ambos os grupos divergentes.

Sendo assim, apresentados os fundamentos desta nova tecnologia emergente, caracterizando a relevância da pesquisa, conclui-se que o objetivo foi alcançado, pois, teoricamente, existem possibilidades e desafios referentes à biologia sintética. Acrescenta-se, no entanto, que esta

revisão não tem a finalidade de esgotar o assunto, mas informar os leitores das biociências sobre a hodierna perspectiva.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Lisa McDonald e Matthew LaPointe do *J. Craig Venter Institute*, por disponibilizarem imagens dos experimentos e pelas sugestões iniciais de pesquisa; a Sandra Silva, pelas sugestões para a melhoria do texto; a Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), Unidade Salvador, Bahia, pelo suporte acadêmico; e aos coordenadores, revisores e editores da Revista da Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

## Referências

- Bouzar K. 2010. How to make an artificial cell. MIT Technology Review 1-2.
- Calvert J, Martin P. 2009. The role of social scientists in synthetic biology. *EMBO reports*, 10(3):201-204. DOI:10.1038/embor.2009.15.
- Centro Ecológico. 2009-2010. *Biologia Sintética. Novas tecnologias 2. Centro Ecológico* 2:1-44.
- Chen Y, Christina S, Kate EG. 2012. Synthetic Biology: Advancing biological frontiers by building synthetic systems. *Genome Biology* 13(240):1-10. DOI:10.1186/gb-2012-13-2240.
- Constante M, Grünberg R, Isalan M. 2011. A biobrick for cloning custom eukaryotic plasmids. *PLoS One* 6(8):1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0023685.
- EASAC. European academies science advisory council. 2011. Synthetic Biology: An introduction. *Academia Europaea* 1-16.
- ETC Group. Action group on erosion, technology and concentration. 2010a. Groups criticize presidential commission's recommendations on synthetic biology. *ETC Group* 1-4.
- \_\_\_\_\_. 2010b. Synthetic Biology: creating artificial life forms. *ETC Group* 1-6.
- \_\_\_\_\_. 2010c. Synthia is alive... and breeding panacea or pandora's box. *ETC Group* 1-4.
- Gibson D et al. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329(5087):52-56. DOI:10.1126/science.1190719.
- J. Craig Venter Institute. 2010. Images of *M. mycoides* JCVI-syn1.0 and WT *M. mycoides*. Disponível em: <www.jcvi.org/cms/research/projects/first-self-replicating-synthetic-bacterial-cell/photos/>. Acesso em: 07 de jan. de 2014.
- Kaiser J. 2010. Panel weighs guidelines for synthetic biology. *Science* 329(5989): 264-265. DOI:10.1126/science.329.5989.264-b.
- Kelle A. 2009. Synthetic biology and biosecurity. *EMBO reports* 10(1)23-53. DOI:10.1038/embor.2009.119.
- Khan FA. 2014. Biotechnology in Medical Sciences. In: Slaughter MJ, editor. *Synthetic biology and nanomedicine*. Florida: CRC Press p270-281.
- Knight T. 2003. Idempotent vector design for standard assembly of biobricks. *DSPACE@MIT* 1-11. URI:1721.1/21168. Disponível em: <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/21168#files-area>. Acesso em: 15 de jan. de 2014.
- Lopes RJ. 2010. Gênesis – capítulo dois?. *Revista Galileu* 228:1-5.
- Noorden RV. 2010. Demand for malaria drug soars. *Nature* 466:672-673. DOI:10.1038/466672a.
- O Globo. 2010. Saiba como foi feita a criação da primeira célula

- artificial do mundo, uma nova vida gerada em... *Ciência* 1-2.
- Pasotti L et al. 2012. Bottom-up engineering of biological systems through standard bricks: A modularity study on basic parts and devices. *PLoS One* 7(7):1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0039407.
- Pivetta M. 2010. A síntese da criação. *Revista Pesquisa Fapesp* 172:44-51.
- PSCBI. Presidential commission for the study of bioethical issues. 2010. Ethics of synthetic biology and emerging technologies. *Bioethics.gov* 1-192.
- Rabinow P, Bennett G. 2009. Synthetic biology: ethical ramifications. *Systems and Synthetic Biology* 3:99-108. DOI:10.1007/s11693-009-9042-7.
- Ruder W, James T, Collins JJ. 2011. Moving into the Clinic. *Science* 333(6047):1248-1252. DOI:10.1126/science.1206843.
- Schneider M. 2007. *Biologia sintética*. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados 1-6.
- Sonnenburg JL. 2011. Community health care: Therapeutic opportunities in the human microbiome. *Science Translational Medicine* 3(78):1-16. DOI:10.1126/scitranslmed.3001626.
- Wadman M. 2010. US report pins down future biosecurity. *Nature* 466:678. DOI:1038/466678a.
- Wohlsen M. 2011. Biopunk. DIY scientists. Hack the software of life. *Current: Penguin Group* p1-37.