



# DESENVOLVIMENTO DE MODELOS *IN VITRO* GENETICAMENTE MODIFICADOS COMO FERRAMENTAS PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE AMBIENTAL.

Leite, Thalita S\*

Marins, Luis F Marins; Sandrini, Juliana Z.

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande FURG, Rio Grande do Sul RS.  
Endereço: Avenida Itália, KM 8  
Rio Grande - RS  
thalita\_s\_leite@hotmail.com

---

## INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica tem recebido muita atenção nos últimos tempos, principalmente devido a temas como mudanças climáticas, aquecimento global e destruição da camada de ozônio. Com relação a este último item, a emissão de poluentes como clorofluorcarbonos (CFCs) está causando a destruição do ozônio presente na estratosfera, resultando em um aumento na quantidade de radiação ultravioleta (UV) que chega à atmosfera (Häder e Sinhá, 2005). A radiação UV é dividida em três classes baseadas no comprimento de onda: UVA (400 - 320 nm), UVB (320 290 nm) e UVC (290 100 nm). Quanto menor o comprimento de onda, maior a energia que a radiação carrega e maior a chance de reagir com alguma molécula. Neste sentido, as radiações UVA e UVB são biologicamente mais relevantes, uma vez que UVC é barrada pelo ozônio na atmosfera terrestre. Neste sentido, a radiação UV pode acarretar diversos efeitos na biota, inclusive reagir diretamente com a molécula de DNA, induzindo a geração de lesões no DNA, a indução de proteínas de estresse (como p53 e p21) e a iniciação da parada do ciclo celular (Shackelford *et al.*, 1999).

Com relação à poluição aquática, a conservação dos recursos hídricos enfrenta um grande desafio devido ao grande avanço do desenvolvimento urbano. A atividade humana tem produzido sérios danos ao meio ambiente, especialmente aqueles relacionados com a contaminação por metais pesados, pesticidas e eutrofização produzida por descarga de esgotos sem tratamento ade-

quado.

## OBJETIVOS

Os danos causados na molécula de DNA, tanto por agentes endógenos quanto por agentes exógenos, como exposição à radiação UV e metais, podem levar a mutações e suspeita - se que sejam a maior causa de câncer (Powell *et al.*, 005). A fim de contornar esses danos causados ao genoma, as células desenvolveram uma complexa rede de reações denominada de reposta ao dano de DNA, que envolve os processos de parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (Bartek e Lukas, 2007; Déry e Masson, 2007). É importante considerar que uma das primeiras respostas observadas em um organismo frente a uma situação de dano de DNA é a ativação dos genes relacionados com o sistema de reparo desta molécula. Sendo assim, a utilização de modelos geneticamente modificados constituídos de seqüências regulatórias (promotores) de genes do sistema de reparo do DNA direcionando a expressão de genes repórteres é uma importante ferramenta para o monitoramento ambiental. Quando estes modelos geneticamente modificados forem expostos a alguma situação que cause dano ao seu DNA, a transcrição de genes do sistema de reparo poderia ser acionada, ativando assim a transcrição do gene repórter, por exemplo, uma proteína fluorescente, que poderia ser facilmente detectada e quantificada, sem a necessidade da utilização de técnicas custosas e demorada. Neste sentido, o obje-

tivo do presente trabalho foi desenvolver modelos *in vitro* geneticamente modificados que expressam proteínas fluorescentes sob o controle transcricional de seqüências gênicas regulatórias sensíveis à presença de diferentes agentes genotóxicos

## MATERIAL E MÉTODOS

A região promotora do gene Gadd45a, envolvido na resposta ao dano de DNA, foi amplificada através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando primers específicos. Através da utilização de diferentes enzimas de restrição, a região promotora deste gene foi clonada no vetor pDsRedExpress - DR (Clontech), que apresenta como gene marcador um gene que codifica para uma proteína vermelha fluorescente (DsRedExpress - DR). Esta construção genética produzida foi inserida nos hepatócitos de *D. rerio* através da técnica de transfecção utilizando o reagente FuGENE (Roche) segundo as especificações do fabricante. Após a transfecção, as células contendo o plasmídeo foram selecionadas através da utilização do antibiótico genético (G418, Gibco) no meio de cultura, uma vez que o plasmídeo pDsRedExpress - DR utilizado na preparação da construção genética apresenta um gene de resistência para este antibiótico.

## RESULTADOS

Através da metodologia utilizada foi possível construir um plasmídeo contendo um promotor que direciona a expressão da proteína vermelha fluorescente. Testes com enzimas de restrição confirmaram a produção deste

plasmídeo contendo o promotor do gene Gadd45a. Após a metodologia de transfecção, os hepatócitos foram selecionadas com meio contendo o antibiótico Geneticina, o que permitiu a produção de uma linhagem celular de hepatócitos de *D. rerio* geneticamente modificada contendo uma construção genética de interesse toxicológico. Neste sentido, essa linhagem será utilizada em estudos envolvendo a exposição a diferentes contaminantes ambientais.

## CONCLUSÃO

Como conclusão, o presente trabalho permitiu a produção de uma linhagem celular geneticamente modificada para utilização no monitoramento da qualidade ambiental. Como perspectivas futuras, pode-se ressaltar a realização de testes de exposição destas células a diferentes agentes que causam danos no DNA e a observação da produção da proteína vermelha fluorescente.

## REFERÊNCIAS

- Bartek, J., Lukas, J. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology* 19: 238 - 245.
- Déry, U., Masson, J.Y. 2007. Twists and turns in the function of DNA damage signaling and repair proteins by post-translational modifications. *DNA Repair* 6: 561 - 577.
- Powell, C.L., Swenberg, J.A., Rusyn, I. 2005. Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage. *Cancer Letters* 229: 1 - 11.