

Cultivo de Células e a Exploração da Função Gênica

(0:00) Saudações para mais um podcast Ciência Ativa na Educação. (0:05) Vamos falar sobre cultivo de células e explorar como que a função gênica é (0:10) estudada usando o cultivo de células. E para falar um pouquinho sobre o tema, a (0:15) gente está aqui com o doutor Rubens e a doutora Isabelle.

Boa tarde para vocês. (0:20) Boa tarde. Eu vou começar com o Rubens.

Qual que é a importância de estudar a função (0:26) gênica? Eu diria que a importância é justamente para a gente desvendar os (0:32) eventos moleculares que a gente tem durante um desenvolvimento ou então o (0:37) funcionamento de um organismo e compreender então como que acontece essa (0:41) regulação. Isa, você tem alguma coisa que possa complementar o que o Rubens (0:45) comentou? Então, é para você descobrir, né, você tentar elucidar qual o processo (0:54) que aquele gene participa, quais são os parceiros que aquele gene interage e até, (1:00) em alguns casos, estudar como algumas mutações podem afetar a função desse (1:06) gene e podem estar associadas a doenças, tanto para você tentar entender a (1:12) etiologia de uma doença ou até utilizar aquele gene como um marcador para aquela (1:16) doença, para o diagnóstico daquela doença. Depois que você entende a função do gene, (1:22) daí você parte para uma aplicação e daí você pode aplicar desde a medicina até a (1:27) agricultura.

O cultivo das células é um elemento central, né, no (1:36) estudo.

Não tem como a gente dissociar o estudo da função de genes sem usar (1:40) algum modelo de cultivo de células. Vocês conseguem me exemplificar quais são e como (1:46) que elas estão sendo utilizadas por aí? Bom, as células, elas são utilizadas no (1:51) estudo de função gênica, tanto como um modelo, então que você utiliza aquela (1:56) célula para você estudar a função daquele determinado gene, como também uma (2:02) ferramenta no estudo da função gênica, como é o caso da linhagem HEK293, que (2:09) ela é uma linhagem que a gente utiliza no laboratório para gerar uma outra (2:13) ferramenta de silenciamento gênico, que é uma das técnicas que a gente utiliza (2:18) para avaliar a função de um gene. Eu acho que, já que a Isabelle comentou sobre a célula HEK, que é uma das (2:26) principais que a gente utiliza no estudo da função gênica, uma curiosidade é que o (2:30) pesquisador, não sei se vocês sabem... Adoro, eu adoro curiosidade, pode falar sobre isso.

(2:34) Mas, o pesquisador que construiu essa linhagem, ela é chamada de HEK293, justamente porque (2:42) era o experimento número 293 desse pesquisador. Então, aí já vem... (2:47) Sirva como exemplo aí para a galera que faz um, dois experimentos e já desistem, é 293, não desistem. (2:55) Quando você chegar no 294, aí você pára.

(3:00) E, diante de todas as técnicas que têm por aí, o que a gente tem utilizado de (3:05) técnicas aqui no Instituto Carlos Chagas, nos trabalhos que vocês desenvolveram (3:09) durante a formação acadêmica de vocês? (3:12) O que a gente pode utilizar é o knockout gênico, que é você tirar totalmente a expressão daquele gene. (3:19) Então, você vai avaliar a ausência daquele gene e vai ver como a ausência dele afeta a célula. (3:26) Você pode fazer o silenciamento gênico, que aí você vai ter como alvo diminuir a expressão do gene,

(3:33) mas não tirar ele completamente, e você já avalia se você vai ter algum efeito, (3:38) só diminuindo a expressão dele.

E você pode fazer a super expressão também desse gene, (3:43) que é você induzir a célula a produzir mais daquele gene e ver também qual o efeito que isso vai ter dentro da célula. (3:52) É, eu acho que a gente também não vai conseguir, falando um pouco sobre as ferramentas, né? (3:57) A gente não vai conseguir fugir de comentar sobre o CRISPR, que é... (4:01) É, isso é clássico, né? Uma das perguntas aí que... (4:05) Normalmente, eu acho que a gente não pode falar que é uma ferramenta nova, porque já está há um tempo. (4:10) Já, acho que mais de uma década, por aí.

(4:14) Mas ainda é a técnica mais usada até agora, principalmente pela facilidade. (4:19) Antigamente, a gente tinha que construir uma ferramenta para cada estudo de um gene. (4:25) Então, você quer estudar um gene X, você tinha que construir ali, por exemplo, uma zinc finger, (4:29) que é uma proteína que vai fazer a deleção daquele teu gene.

(4:33) Então, você tinha que construir ela especificamente para aquele teu gene. (4:36) Agora, a gente tem a Cas9, né? Que é do sistema CRISPR. (4:39) A gente utiliza a mesma proteína para todos os genes.

(4:43) A gente só altera a sequência guia e isso possibilita, então, uma aplicação mais fácil no dia a dia, no laboratório. (4:52) Porque nesse caso, a gente só muda o ácido nucleico, né? (4:55) Que a gente pode sintetizar comercialmente. (4:57) Então, manda o desenho e, em um mês, a gente tem aqui a sequência do ácido nucleico que vai utilizar, (5:03) ser usado como uma guia.

(5:05) Muito mais rápido. (5:07) E não só a Cas9, que é a proteína que vai se ligar ao DNA dupla-fita para causar alguma modificação. (5:13) Então, para fazer um nocaute gênico, se utiliza a Cas9 para introduzir uma mutação específica, (5:20) também para você avaliar aquela mutação.

(5:22) Mas existem outras proteínas da família Cas, como a Cas13, que vai agir no RNA. (5:29) E aí, isso vai provocar, na verdade, o silenciamento gênico ao invés do nocaute, por exemplo. (5:34) E a gente pode, famoso, engenheirar essa ferramenta do CRISPR e fazer diversas outras maneiras, (5:44) outras ferramentas para você avaliar a função de um gene específico.

(5:47) Uma coisa que eu acho que tem que ter muito na mente quando você vai trabalhar com ferramentas (5:51) para estudar função gênica é você fazer um desenho do seu experimento, (5:56) então já pensar também em como você vai analisar isso. (5:59) Então, eu vou estudar uma proteína, um gene ali que está participando da lesão da célula. (6:04) Então, eu vou avaliar esse fenótipo específico no meu modelo.

(6:08) Então, vou pegar uma célula, vou nocautear aquele gene, vou silenciar ele, (6:12) e vou, então, avaliar como a minha célula está aderindo da mesma maneira, (6:17) se isso foi prejudicado, se isso foi aumentado. (6:20) Então, para cada estudo, você vai ter que desenhar uma abordagem específica também, (6:24) mesmo que as ferramentas sejam as mesmas. (6:26) Avaliando, talvez, até diferentes processos, né, proliferação, diferenciação, (6:31) e coisas que podem até direcionar para alguma célula específica.

(6:36) No meu caso, eu trabalho com doenças neurológicas, (6:39) trabalho muito com progenitora neural, com neurônio. (6:42) Então, no caso do neurônio, a gente vai avaliar até

a eletrofisiologia, (6:46) alguns marcadores de sinapse, para ver se esses processos estão sendo modificados (6:53) quando a gente faz o nocaute, o silenciamento, ou a superexpressão de um gene específico. (6:58) Sim, então, é muito importante você conhecer o teu modelo.

(7:01) Então, se você vai trabalhar, que nem a Isa trabalha com doenças neurológicas, (7:05) ela utiliza uma célula neuronal para isso, né. (7:08) Então, é importante também você fazer um estudo para você entender o seu modelo (7:13) e ver qual é o melhor modelo, porque o catálogo de células que a gente tem hoje em dia (7:17) é muito abrangente. (7:17) É verdade.

(7:18) Então, você quer estudar pele, você vai ter lá muitas linhagens de célula (7:23) que você pode fazer o teu experimento. (7:25) Então, é bom você entender qual seria o melhor delas, dando uma estudada nisso também. (7:31) Essa é a sua pergunta também bem clara, né.

(7:33) Porque, às vezes, sei lá, consegui fazer o nocaute, mas aí, agora, o próximo passo, (7:37) você não tem ainda padronizado no laboratório, né. (7:40) Você quer responder com esse nocaute, você quer responder com esse silenciamento, (7:44) com a técnica que você está utilizando para estudar a função daquele gene, (7:48) é muito importante. (7:50) E os desafios, né, relacionados tanto na parte de estudar a função do gene, (7:54) mas, de uma certa forma, a gente acaba caindo nas partes técnicas, né.

(7:58) Quais são os maiores desafios que vocês têm visualizado, enfrentado no dia a dia? (8:03) Eu acho, no meu caso, eu tive muita dificuldade durante o meu doutorado (8:08) com questões de padronização, porque cada célula responde de uma maneira. (8:14) Então, é bom a gente também entender que não vai ser sempre simples, (8:20) não vai sempre pegar um protocolo que já está estabelecido na comunidade científica (8:24) e aplicar no seu modelo e vai funcionar sempre, todas as vezes, 100%. (8:28) Nosso sonho, né.

(8:29) Seria um sonho. (8:29) Então, no meu doutorado, eu tive muitas complicações com isso. (8:33) Então, padronização, atrás de padronização, até você achar, então, um modo funcional (8:40) e de alta eficiência para você realizar seus experimentos.

(8:43) Que, apesar da célula, de uma das vantagens de utilizar o cultivo de célula ser, (8:47) você trabalhar com o modelo em um ambiente controlado, laboratório, (8:50) diferente do em vivo, né, ainda assim demanda uma padronização, (8:55) um tempo que você gasta padronizando os protocolos e todas as técnicas. (9:01) Eu acho que a principal não seria nem desafio. (9:04) É um desafio também, mas ele parte de uma limitação, (9:08) que é a complexidade biológica que a gente encontra.

(9:11) Como o Rubens falou, que quando você trabalha com célula, (9:16) ele é um ambiente controlado, né, tem as variáveis mais controladas possíveis, (9:21) mas principalmente quando se trata de células em cultivo bidimensional, né, em monocamada, (9:28) isso tira a complexidade que a gente vê nos organismos vivos, (9:31) principalmente quando a gente quer estudar a função de um gene em humanos, né. (9:37) Então, por exemplo, você quer estudar como um gene está afetando a função do neurônio, (9:45) você observa isso em laboratório, só que você não consegue extrapolar isso, (9:50) que isso está acontecendo exatamente igual no cérebro, por exemplo, (9:54) porque o cérebro tem uma N questões e variáveis ali, (10:00) que você não tem como mimetizar isso em vitro, né. (10:05) A comunidade científica está avançando nesse quesito, né, (10:08) fazendo

modelos tridimensionais de co-cultivo, (10:15) então cultivando diferentes linhagens celulares juntas, fazendo modelos, por exemplo, (10:20) de junção neuromuscular, que é você fazer o músculo esquelético e colocar em cima o neurônio motor (10:27) pra você ver ali um pouquinho mais de complexidade, (10:30) ao invés de você estudar só o músculo esquelético ou só o neurônio motor separado, (10:34) ou fazer os organóides, como o caso dos organóides cerebrais, organóides de cerebelo, (10:40) que é você juntar um organóide cortical, que é do cérebro, (10:44) um organóide de cerebelo e um organóide que mimetiza a medula, por exemplo, (10:49) pra você estudar isso, e também os órgãos no chip, né, (10:53) que eu acho que vai ter até um outro episódio sobre isso, sobre esses métodos alternativos, (10:59) que é você colocar num chip um órgão e ligar esses chips de diferentes órgãos, (11:04) ou fazer o human on a chip, que é você colocar num chip maior, (11:08) diferentes câmaras com diferentes linhagens celulares, (11:11) então eu acho que a principal limitação disso ainda é a complexidade, (11:17) você tentar chegar nessa complexidade que a gente tem em modelo animal (11:20) e que a gente vai conseguir extrapolar pro ser humano.

(11:23) Mas que é o que a comunidade científica acho que tá buscando muito agora, né, (11:27) que a gente já passou, acho que do período de entender uma célula individual (11:32) ou um cultivo ali individual, e agora a gente já tá começando a tornar mais complexo (11:37) o nosso modelo bidimensional ali, pra que ele consiga responder coisas (11:42) com uma maior robustez para as nossas perguntas. (11:46) Exatamente. (11:47) Quer dizer, numa doença, então coloca as suas células em um ambiente (11:51) que é o que acontece no organismo.

(11:54) Então esse modelo de junção neuromuscular, ele é um modelo bidimensional, (11:59) porque você plaqueia, né, coloca no fundo do poço o músculo esquelético (12:03) e você coloca em cima, acaba sendo duas monocamadas, (12:07) mas ele não chega a ser um modelo tridimensional, né, (12:10) coloca em cima o neurônio motor e você avalia isso de outras formas. (12:16) Eu adorei, acho que a nossa conversa foi bastante completa, né, (12:19) a gente definiu aí qual que é a importância em fazer o estudo de genes (12:25) usando o cultivo de células, definindo-nos as ferramentas, os desafios, (12:30) e eu só tenho a agradecer ao Rubens e Isabelle por essa conversa (12:33) e a gente finaliza aqui, agradecendo aos ouvintes (12:36) e nos encontramos novamente no próximo podcast Ciência Ativa na Educação.

Audiotranscrição por TurboScribe