

Isoenzimas de amilase: acessando a diversidade genética

Kátia Luiza Kraemmer¹, Marcos Trindade da Rosa²,
Lenira M. N. Sepel³, Elgion L. S. Loreto⁴

¹Licencianda do curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, RS

²Doutorando do PPG em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, RS

³Departamento de Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

⁴Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

Autor para correspondência - elgion@base.ufsm.br

Palavras-chave: variabilidade genética, ensino de genética, isozimas, polimorfismo gênico

Um desafio no ensino de Genética na graduação é mostrar ao aluno a dimensão da diversidade genética existente nas populações, principalmente em relação ao fator molecular. Traçamos neste artigo o relato de uma experiência didática que temos empregado com sucesso. Utilizamos o sistema de eletroforese de gel de agarose, usado para separar ácidos nucleicos que são muito comuns em laboratório de genética e biologia molecular para analisar amostras de DNA e RNA. Com sistema de eletroforese e alguns reagentes de fácil acesso (insetos dos cereais, amido de milho e solução de iodo) é possível que os alunos realizem uma atividade prática que permite vislumbrar a diversidade genética de isoenzimas de amilase.

Em nossas atividades os alunos colocam a mão na massa fazendo o experimento. São questionados a interpretar os resultados e, posteriormente, são abordados aspectos históricos sobre as pesquisas com isoenzimas. Não apresentamos aqui uma receita de uma atividade prática, mas o relato de como foi feito. Sugerimos aos interessados em implementá-la em sala de aula que realizem testes e façam as adaptações necessárias para o contexto em que estão inseridos. Entretanto, antes de descrever a atividade prática, apresentaremos uma contextualização histórica, para que, principalmente para os que não viveram o período de pesquisa em genética em que as isoenzimas eram uma ferramenta de vital importância, possam compreender as questões daquela época.

Um pouco de história

A metodologia de detecção de isoenzimas por eletroforese em gel foi de grande importância na pesquisa genética a partir dos anos 1960. Ela permitiu desvendar uma diversidade genética antes desconhecida. Na primeira metade do século XX, a análise genética estava restrita à observação de fenótipos morfológicos e a presença de diversidade genética era percebida em locos cujos alelos provocavam variações visíveis. Nos laboratórios, os primeiros geneticistas guardavam coleções de organismos com alelos mutantes como, por exemplo, mosquinhas drosófila com diferentes cores para os olhos, incluindo olhos brancos, rosa, marrom, cor de pêssego e outras tonalidades. Os pesqui-

sadores que trabalhavam com milho tinham coleções de sementes para plantas que produziam espigas com grãos de cores e formas variadas.

Na natureza parecia ser diferente, não se observavam tantas variantes nas populações selvagens, fossem de animais ou de plantas. Fora dos laboratórios, é raro encontrar indivíduos de *Drosophila melanogaster* que não tenham olhos vermelhos. Os organismos de uma mesma espécie seriam, na natureza, todos geneticamente muito parecidos? As comparações entre as populações naturais e as mantidas em laboratório criaram muitas dúvidas sobre a variabilidade genética presente nas populações. A primeira ideia foi atribuir ao processo de seleção natural a exclusão de todas as variações genéticas que surgem na natureza, deixando nas populações somente os alelos selecionados. Por isso, os organismos de uma espécie seriam todos muito semelhantes entre si, tanto na morfologia quanto nos genes.

As interpretações sobre a presença e importância da variabilidade genética nas populações começou a mudar a partir da década de 1960, com o desenvolvimento de novas técnicas para analisar conteúdo de proteínas em amostras biológicas. No final dos anos 70, tornaram-se muito frequentes as pesquisas utilizando separação de proteínas em campo elétrico, chamadas de estudo de isoenzimas por eletroforese em gel. Isoenzimas ou isozimas é o nome dado a enzimas que catalisam a mesma reação química, mas diferem na sequência de aminoácidos. As isoenzimas podem ser produto do mesmo locus gênico, nesse caso representam a expressão de dife-

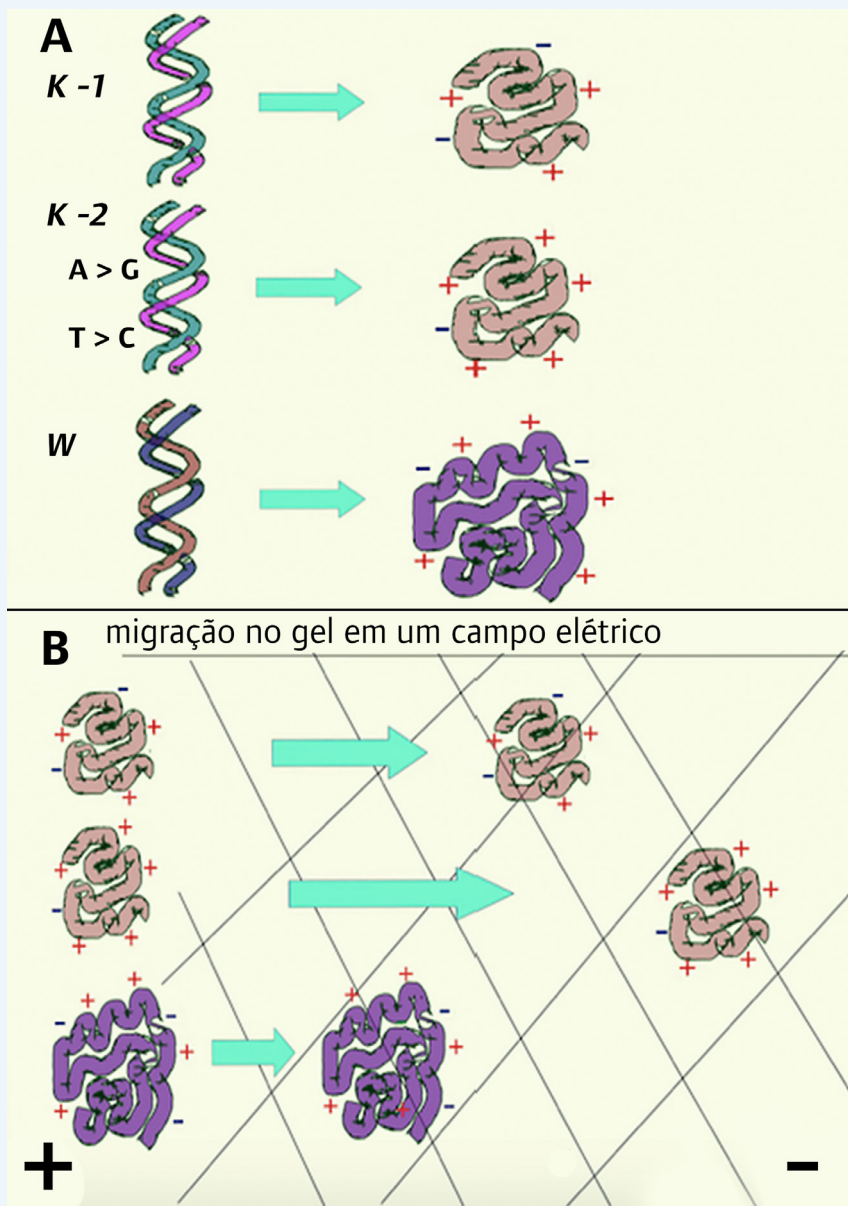
rentes alelos, mas também podem ser produtos de genes diferentes (Box 1). Quando as isoenzimas são devidas a alelos diferentes, também podem ser chamadas de aloenzimas ou alozimas.

Para o estudo de isoenzimas por eletroforese, amostras de um tecido ou organismo são

homogeneizadas e aplicadas em um gel, geralmente feito de amido, agarose ou de poliacrilamida. O gel com as amostras é submetido a um campo elétrico e as proteínas que estão nas amostras se deslocam no interior do gel. A migração das proteínas ocorre de acordo com a carga elétrica, a forma ou o tamanho delas.

BOX 1.

Na parte **A** da figura, o gene *K* tem dois alelos, *K-1* e *K-2*. O alelo *K-2* tem duas mudanças de bases em relação a *K-1*, acarretando substituições de aminoácidos de carga (-) por aminoácidos com carga (+); assim, os alelos *K-1* e *K-2* codificam proteínas que têm cargas elétricas diferentes. O gene *W* não apresenta variações alélicas e codifica para uma enzima de maior tamanho. Na parte **B** da figura, as isoenzimas em um gel, representado pelas linhas formando uma rede, estão sob ação de um campo elétrico e vão migrar (setas). As proteínas com carga elétrica líquida positiva vão migrar para o polo negativo. Quanto mais carregado positivamente, mais rápida será esta migração. Isoenzimas com diferentes pesos moleculares migrarão também com velocidade diferente. As moléculas menores migram mais rapidamente que as maiores porque estas vão ter mais dificuldade de percorrer a matriz formada pelos polímeros que compõem o gel. Neste caso, a isoenzima codificada pelo gene *W* migra mais lentamente, pois tem maior tamanho.



Depois que o processo de eletroforese termina, as enzimas podem ser detectadas no gel utilizando-se os substratos que elas reconhecem. A reação que uma enzima catalisa deve ocorrer e o produto da reação enzimática será visualizado geralmente pela produção de alguma alteração de cor no local da reação.

As isoenzimas podem ser estudadas em conjunto porque utilizam o mesmo substrato e realizam a mesma catálise, mas por terem diferenças em suas estruturas primárias (presença de aminoácidos com cargas elétricas

diferentes) elas se deslocam com velocidades distintas durante a eletroforese. A velocidade de migração típica de cada isoenzima faz com que elas apareçam em posições diferentes no gel. Assim, através da separação por eletroforese, é possível acessar uma parcela de variantes enzimáticas que existem nos organismos, ou seja, é possível observar a existência de isozimas que tenham migrações em velocidades de deslocamento diferentes durante a eletroforese. Essa é apenas uma parte da variabilidade genética possível para as enzimas (Figura 1).

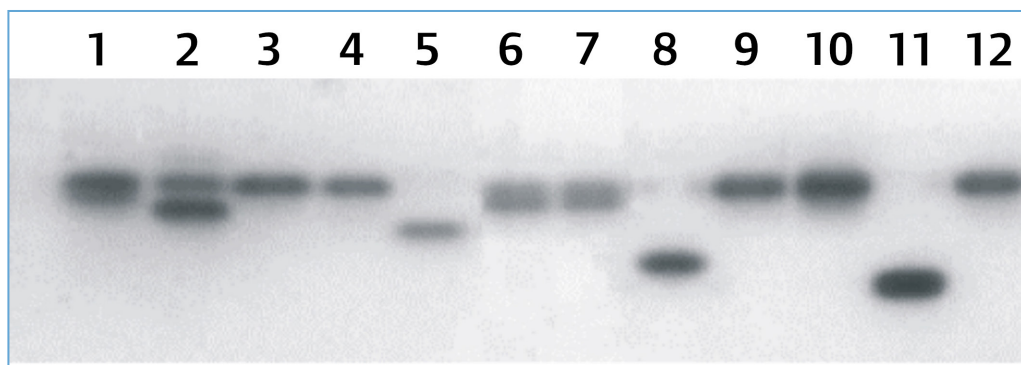


Figura 1.

Um exemplo de padrão eletroforético para isoenzimas. Pode-se observar diferentes isoenzimas pelas posições que elas ocupam no gel após o processo de migração. As amostras 3, 4, 9, 10 e 12 são homozigotas e carregam o mesmo alelo. Os indivíduos 5, 8 e 9 também são homozigotos, evidenciado por terem uma só banda, mas têm alelos diferentes, pois migram em posições diferentes no gel. As amostras 1, 2, 6 e 7 representam genótipos heterozigotos pois a coloração no gel indica a presença de duas bandas.

A técnica de eletroforese para separação de isoenzimas revelou-se muito eficiente e vários grupos de pesquisa, mundo afora, montaram laboratórios que permitiam processar um grande número de amostras e muitas enzimas diferentes foram estudadas em relação à presença de variantes isoenzimáticas. Os resultados dessas pesquisas rapidamente indicaram que a variabilidade genética no mundo das enzimas era muito maior do que se imaginava até então. As populações naturais podem ter baixa variabilidade morfoanatômica, mas se apresentam muito diversificadas em relação à presença de formas variantes de enzimas.

No final do século XX, o avanço das metodologias de clonagem molecular, amplificação e sequenciamento de DNA permitiram estudar os genes diretamente. A variabilidade genética passou a ser analisada através da sequência de nucleotídeos do DNA e as conclusões obtidas com a análise de isoenzimas foram confirmadas e ampliadas – as populações apresentam-se muito mais variáveis molecularmente do que se imaginava.

Com o desenvolvimento das técnicas de Biologia molecular, o estudo de isoenzimas foi perdendo relevância. Hoje, poucos laboratórios ainda mantêm a metodologia de eletroforese de isoenzimas como rotina; nesses casos, o principal objetivo é caracterização funcional de enzimas. As pesquisas sobre variabilidade genética passaram a priorizar estudo de polimorfismos de DNA, primeiro com a análise de amplificações por PCR e, mais recentemente, através da análise de polimorfismo de nucleotídeos através de sequenciamento do DNA.

Neste artigo apresentamos uma atividade de eletroforese de isoenzimas, destinada aos cursos de graduação da área biológica e que tem sido aplicada como atividade prática em disciplinas de Genética e Biologia molecular. A enzima escolhida é a amilase e uma das vantagens da atividade é o sistema de eletroforese e géis utilizados serem os usualmente empregados em laboratórios de Biologia molecular para visualização de DNA/RNA. Além disso, os reagentes necessários para a revelação das isoenzimas são de fácil obtenção e de baixo custo.

A atividade tem como objetivo principal apresentar aos alunos a variabilidade genética observável em relação às proteínas. A execução da prática permite também revisar conteúdos de biofísica e bioquímica. A técnica de eletroforese e sua aplicação à investigação de isoenzimas também propicia discussões sobre a história recente das pesquisas em Genética, considerando que esta metodologia permitiu redimensionar a presença da variabilidade genética das populações e fomentou a discussão das teorias neutralistas e selecionistas. Os selecionistas defendiam que a principal força para moldar a evolução é a seleção natural. Os neutralistas apontavam que a deriva genética é uma força importante, capaz de explicar a grande variabilidade genética observada molecularmente. As evidências mostraram que os neutralistas estavam certos e que, embora a seleção natural seja responsável pela evolução adaptativa, ocorrem mudanças evolutivas, por deriva genética, em caracteres que não estão sob pressão adaptativa.

Com a mão na massa

Além de estimular a curiosidade sobre aspectos históricos e discussões clássicas sobre a importância da variabilidade genética nas populações e sobre as teorias que explicam a manutenção dessa variabilidade, também é possível discutir o uso das isoenzimas como ferramenta para estudos filogenéticos.

O sistema de eletroforese

O gel é de ágar bacteriológico ou agarose (1%) em tampão TAE usado para eletroforese de DNA: ("T" de tris hidroximetil aminometano - 40 mM; "A" de ácido acético - 20 mM e "E" de EDTA - 1 mM). O sistema de eletroforese é o de mini-gel horizontal submarino (Figura 2-A) e os poços para aplicação da amostra também são feitos com o mesmo pente usado para eletroforese de DNA (Figura 2-B).

Para a aplicação das amostras, também foi usado o procedimento típico de aplicação de DNA em gel; as amostras contendo as isoenzimas foram misturadas com tampão

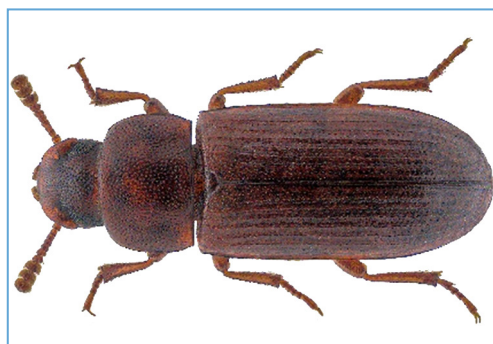
de amostra (glicerol 90%; completar com solução de bromofenol 2%, em tampão TAE). A adição do tampão de amostra facilitará a aplicação no gel (Figura 2-C) e permitirá, pela presença do azul de bromofenol, acompanhar o processo de migração das amostras no gel.

Preparação das amostras e eletroforese

A amilase é uma enzima presente em muitos organismos. No experimento aqui descrito, são analisadas amilases de cinco amostras: saliva humana; cotilédones de feijão; *Sitophilus oryzae* (animais adultos); larvas de *Tribolium castaneum*; e larvas de *Stegobium paniceum*. As larvas são de coleópteros também conhecidos como gorgulhos, são fáceis de encontrar porque são pragas muito comuns em cereais armazenados. Os cotilédones de feijão foram coletados de plântulas com 3 a 4 dias de germinação em algodão e água.



Sitophilus oryzae



Tribolium castaneum

Todas as amostras foram maceradas em água, mas com volumes adequados a cada tipo de material. A padronização dos volumes para cada amostra foi uma etapa importante para possibilitar a repetibilidade dos resultados e as comparações entre as amostras. Os volumes preestabelecidos de água são apresentados na Tabela 1.

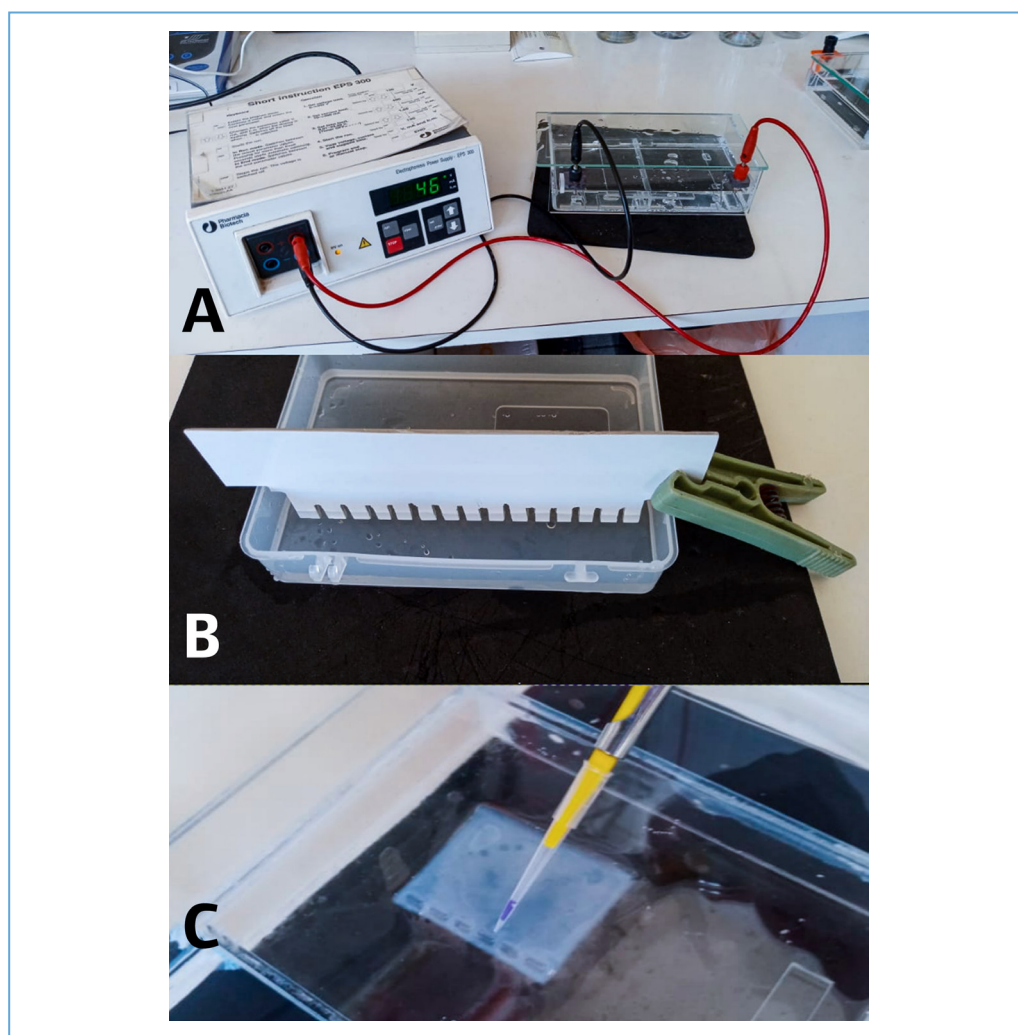
Amostra	Quantidade de água	Quantidade aplicada
6 gorgulhos do arroz	50 µl	15 µl
1 cotilédone de feijão	300 µl	10 µl
2 larvas de gorgulho da farinha	100 µl	15 µl
1 larva de <i>Tribolium</i>	300 µl	20 µl
100 µl de saliva	100 µl	20 µl

Tabela 1.

Preparação das amostras.

As amostras foram processadas diretamente em tubos de microcentrifuga, empregando um embolo de homogeneização. Os volumes de amostra aplicados no gel também foram adequados para cada material e são informados na Tabela 1. Volumes iguais de amostra e

tampão de amostra foram misturados e aplicados nos poços dos géis com auxílio de micropipeta, como mostrado na Figura 2-C. A migração ocorre com o gel imerso na solução tampão TAE, com a aplicação de corrente elétrica de 75V por cerca de 35 minutos.


Figura 2.

Separação de isoenzimas por eletroforese. **A)** Sistema para eletroforese em mini-gel horizontal, comumente empregado para separação de DNA; **B)** Preparação do gel de agarose com o pente para a formação dos poços onde as amostras são aplicadas; **C)** Aplicação das amostras com auxílio de uma micropipeta no gel submerso em tampão na cuba para eletroforese.

Revelando as isoenzimas

Uma vez terminada a migração, o gel é retirado da cuba e imerso em uma solução de amido. Esta solução deve estar à temperatura ambiente, sendo previamente preparada com

200 mg de amido de milho (maisena) dissolvido em 100 mL de água. É necessário ferver a mistura de água e amido por 1 minuto para que ocorra a dissolução do amido.

O gel ficará mergulhado na solução de amido por 15 minutos e depois deverá ser lavado

em água corrente para remover a solução de amido. Depois de lavado, o gel deve ser exposto a gotas de lugol ou tintura de iodo 2%. A solução de iodo 2% pode ser comprada em farmácia, pois é usada como desinfetante local. O gel deve ficar na solução de iodo por cerca de 5 minutos e, depois desse período, será novamente lavado em água corrente para remover o excesso de iodo e permitir a visualização das bandas.

As regiões claras observadas no gel correspondem às bandas das isoenzimas (posição

das isoenzimas no gel), contrastando com o fundo escuro no qual não há presença de amilase (Figura 3). Esse padrão de coloração é explicado pelo fato de a solução de amido ter se difundido no gel (por isso todo o gel cora com a solução de iodo) mas, nas regiões do gel onde estão as moléculas de amilase, o amido foi degradado (por isso a coloração será mais clara). A solução de iodo intercala-se à do amido, dando uma cor escura e as amilases consomem o amido que entra em contato com elas, reduzindo a coloração nas regiões onde estão presentes.

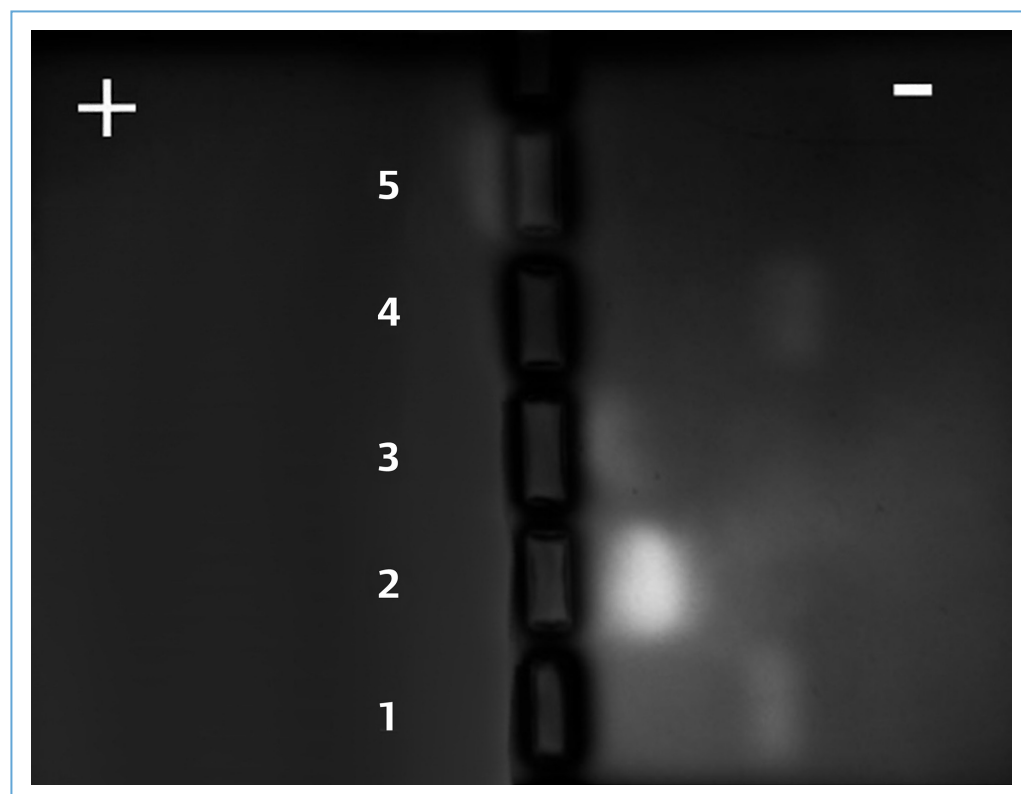


Figura 3.

O gel de ágar-ágar tratado com amido hidrolisado após revelação com solução de iodo. Podem ser vistas as bandas claras no fundo escuro: **1)** Gorgulho do arroz; **2)** Cotilédone de feijão; **3)** Larvas de gorgulho da farinha; **4)** *Tribolium*; **5)** saliva humana. A amostra 5, ao contrário das demais, migrou um pouco para o polo positivo.

Contextualizações didáticas

Alguns pontos são relevantes para o professor conduzir questionamentos com os alunos e assegurar um melhor aproveitamento da atividade prática. Por exemplo, pode-se questionar por que a amilase da saliva foi a única amostra a migrar para o polo positivo? Notar ainda que esta amostra pouco migrou. Indicar uma revisão bibliográfica sobre ponto isoelétrico de uma proteína.

Esta técnica também permite projetos investigativos. Por exemplo, os alunos podem ser

incentivados a buscar outras fontes de amilase e caracterizar as enzimas por eletroforese. Muitas plantas possuem amilase. Pode-se questionar os alunos: diferentes variedades de feijão ou de milho podem ter isoenzimas de amilase variantes?

Outro aspecto interessante a ser explorado é o aspecto histórico, colocando a análise de isoenzimas como fonte importante de argumentos para a discussão entre as escolas neutralistas e selecionistas que debateram intensamente sobre o papel da seleção natural e da deriva genética no processo evolutivo no final do século passado.