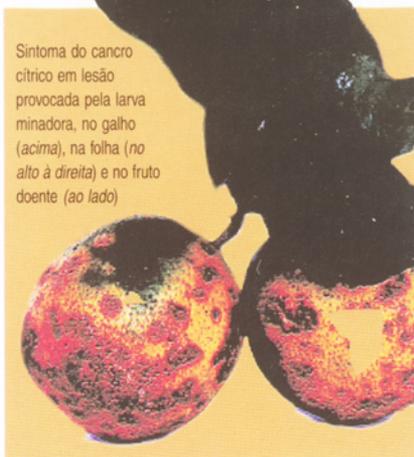


# Na mira, o cancro cítrico

FOTOS: HENRIQUE SANTOS/FUNDECITRUS



Sintoma do cancro cítrico em lesão provocada pela larva minadora, no galho (acima), na folha (no alto à direita) e no fruto doente (ao lado)

O alarmante recrudescimento do cancro cítrico no Estado de São Paulo, que se expressa com força nos 349 focos da doença até agora confirmados e espalhados por toda a área de plantio da laranja, começa a ser contra-atacado, para além do controle emergencial em curso, com um projeto de pesquisa de grande porte que, a médio prazo, pode desarmar o problema em suas origens genéticas. É esse o objetivo último do Projeto Genoma - *Xanthomonas*, que a FAPESP está iniciando formalmente no mês de junho, dentro de seu Programa Genoma.

Com investimentos programados de US\$ 5 milhões da FAPESP, mais US\$ 500 mil do Fundo Paulista de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, esse quarto projeto do Programa Genoma vai realizar o seqüenciamento genético da bactéria *Xanthomonas axonopodis pv citri*, dentro do mesmo esquema de rede de laboratórios utilizado pelos anteriores - ou seja, o projeto pioneiro, já praticamente concluído, de seqüenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora de uma outra doença das laranjeiras, a CVC ou praga do amarelinho, mais o Genoma Hu-

mano do Câncer e o Genoma Cana, que estão em fase inicial.

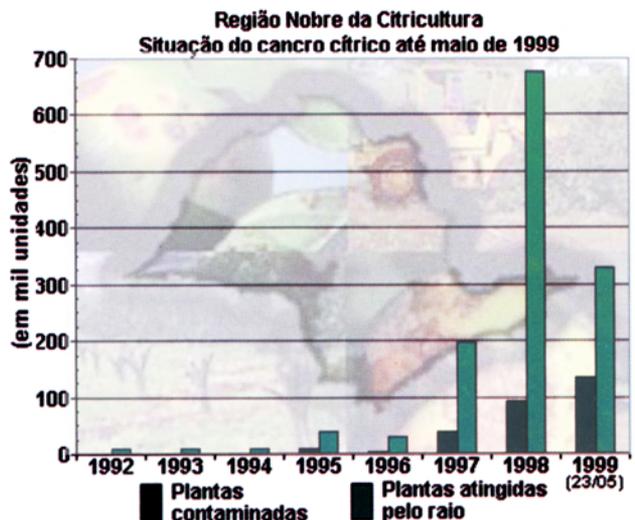
A lista dos laboratórios que vão participar do Genoma *Xanthomonas* deverá estar definida até 30 de julho. Para conseguir isso, a FAPESP disponibiliza em sua página na Internet, a partir de 2 de junho, o edital do projeto, com todas as instruções para que os grupos de pesquisa interessados possam se inscrever até o dia 2 de julho e participar do processo de seleção previsto. A expectativa é de que entrem no mais novo projeto de pesquisa genômica, em São Paulo, tanto grupos já ligados à Organização para Seqüenciamento e Análise de Nucleotídeos, ONSA - de *Organization for Nucleotides Sequencing and Analysis*, arede virtual de laboratórios criada pela FAPESP, no final de 1997, para tocar o projeto da *Xylella*, e hoje responsável pelos projetos Genoma em andamento, quanto novos grupos.

O Projeto-*Xanthomonas* tem prazo de conclusão previsto para dentro de dois anos, mas poderá, na verdade, ser antecipado, graças ao know-how científico e tecnológico acumulado no trabalho com a *Xylella* - bactéria, aliás, muito parecida com a causadora do cancro cítrico. Além da decifração do código genético do microorganismo, o projeto, do mesmo modo que foi feito no caso da *Xylella*, vai abrir-se para um chamado Genoma Funcional, no momento em que se tiver resultados significativos do seqüenciamento. Isso quer dizer que, mais adiante, a FAPESP lança um novo braço do Genoma-*Xanthomonas* para acolher e financiar projetos de

pesquisa que visem a análise das funções biológicas dos genes identificados e diretamente ligados à patogenicidade e virulência da bactéria, capazes de gerar informações fundamentais para o combate e a erradicação do cancro cítrico.

## Inovação nas bibliotecas

Em certa medida, o Genoma-*Xanthomonas* já começou e é por isso que figura há algumas semanas na base de dados do TIGR - *The Institute for Genoma Research*, instituição dirigida pelo conhecido pesquisador norte-americano Craig Venter. Os dois laboratórios centrais do projeto já estão definidos: o dos professores Fernando Reinach, Ana Cláudia Rasera, Ronaldo Quaggio e Shaker Chuck Farah, no Instituto de Química da USP, e o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do professor Jesus Aparecido Ferro, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp de Jaboticabal. Está definido também que, na coordenação de informática, atuará o Laboratório de Bioinformática da Unicamp, dos pro-





Jesus Ferro e Ana Cláudia Rasero: novo projeto tem alta relevância científica, biológica e econômica

fessores João Meidanis e João Setúbal, o mesmo que já vem exercendo essa função nos projetos Genoma *Xylella* e Genoma-Cana.

Para fazer o seqüenciamento, os pesquisadores utilizarão o material contido em quatro bibliotecas de DNA, e esse é precisamente um dos pontos em que o projeto da *Xanthomonas* avança em relação ao da *Xylella*. “A estratégia agora é diferente, porque vamos tentar obter muito mais seqüências menores de clones ao acaso, para depois ancorar as seqüências maiores entre as ilhas que devem se formar, e assim completar o seqüenciamento da bactéria”, explica o professor Jesus Ferro. Dessa forma, espera-se que o problema dos *gaps* entre seqüências, que foi um grande desafio nas fases finais de seqüenciamento da *Xylella*, seja bastante reduzido.

A primeira biblioteca, a randômica (palavra que se refere exatamente a processo aleatório), já foi construída nos dois laboratórios centrais, com recursos remanescentes do projeto da *Xylella*. Ela foi elaborada a partir do

DNA total da bactéria, isto é, o genômico e o plasmidial, que foi fragmentado ao acaso, em pedaços contendo de 2 mil a 4 mil pares de base (ou 2 a 4 quilobases, Kb), e clonados em seguida, constituindo os plasmídeos.

Devem ser feitas ainda uma biblioteca em

bacteriófago, ou seja, um vírus de bactéria, o *Fago lambda*, contendo fragmentos clonados de até 20 Kb; uma biblioteca de cosmídeos, com fragmentos clonados que têm entre 35 e 40 Kb, e, por último, uma de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*), com fragmentos clonados de até 200 Kb. O último vetor não foi usado no projeto da *X. fastidiosa*.

Já foi feito, segundo o professor Jesus Ferro, o seqüenciamento de 1.000 clones da biblioteca randômica em Jaboticabal e São Paulo. Essas seqüências estão sendo comparadas com as do GenBank, dos Estados Unidos e com as do banco de dados da *Xylella*, para verificação de homologias. Ressalte-se que existem até o momento apenas 29 genes já conhecidos de *Xanthomonas axonopodis pv citri*.

Afora a mudança estratégica que está articulada com a composição das bibliotecas, a outra inovação do Projeto *Xanthomonas* em relação ao da *Xylella*, será a tentativa de fazer seu seqüenciamento em larga escala, a um custo menor, compatível com o padrão internacional (US\$ 1 por par de base), graças ao aumento de capacidade de processamento das máquinas já existentes. Essa otimização operacional, em paralelo à competência técnica propiciada pelo trabalho com a *Xylella*, torna

#### CLASSIFICAÇÃO DOS FOCOS - 1996 a 1999

FOCOS NOVOS				
PROPRIEDADES	1996	1997	1998	1999 (23/05)
Pomares Domésticos	17	80	151	137
Pomares Comerciais	14	51	119	129
<b>SUBTOTAL</b>	<b>31</b>	<b>131</b>	<b>270</b>	<b>266</b>
RECONTAMINAÇÕES				
PROPRIEDADES	1996	1997	1998	1999 (23/05)
Pomares Domésticos	0	18	42	10
Pomares Comerciais	14	41	145	73
<b>SUBTOTAL</b>	<b>14</b>	<b>59</b>	<b>187</b>	<b>83</b>
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>	<b>190</b>	<b>457</b>	<b>349</b>

FUNDECITRUS

## A nova explosão do cancro cítrico

Trabalhar num projeto de pesquisa ligado ao cancro cítrico é, para a FAPESP, uma espécie de reencontro com os primórdios de sua história. Em 1963, quando a Fundação mal completara um ano de funcionamento, a doença se alastrava e ameaçava dramaticamente a jovem agroindústria da laranja no Estado de São Paulo. E foi nesse momento que ela concedeu o primeiro auxílio para os estudos de controle do cancro, realizados no Instituto Biológico sob a direção da doutora Victoria Rosseti. Daí até 1985, sucederam-se os auxílios para projetos de pesquisa coordenados pela doutora Victoria (14), para publicações científicas, apresentação de trabalhos em reuniões internacionais, visitas a outros centros de pesquisa, publicações científicas e bolsas para pesquisadores. Os investimentos da FAPESP nesse campo totalizaram US\$ 5 milhões.

Em 1985, considerava-se a doença praticamente erradicada, e a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico, lançada 11 anos antes, completamente vitoriosa. O Fundecitrus, criado para a defesa da citricultura, transformara-se numa instituição sólida e eficiente, e a doutora Rosseti era reconhecida como a excepcional especialista em doenças de citros, que desenvolvera um programa de trabalho fundamental para a erradicação e o controle do cancro, sem deixar de pesquisar outros males das laranjeiras. Mais: a citricultura transformara-se numa das principais atividades sócio-econômicas do Estado, e numa das muito importantes para a pauta de exportações brasileiras.

Mas, a natureza faz suas surpresas: o cancro começou a dar sinais de seu reaparecimento em 1994 e, em 1997, já não deixava dúvidas de que pretendia

tirar o sono dos produtores. Em 1999, depois de ter produzido prejuízos de US\$ 500 milhões no ano anterior, intensificou violentamente sua escalada: de 1º de janeiro até 23 de maio foram registrados pelo Fundecitrus 266 focos novos e 83 focos de recontaminação, em 77 municípios do Estado (veja gráfico). Para efeito de comparação, registre-se que nesse momento, nos Estados Unidos, há apenas 4 focos confirmados da doença e o governo já destinou uma verba de US\$ 25 milhões para o controle do cancro.

O plano de combate, com varredura de cerca de 150 milhões de pés de laranja em São Paulo, sob o comando do Fundecitrus, já começou. O governo federal liberou no começo de abril R\$ 5 milhões, de um total de R\$ 17 milhões prometidos para este ano. O setor privado deverá gastar mais R\$ 30 milhões. E a FAPESP volta a esse cenário no campo que lhe é próprio: financiando pesquisas que, talvez, possam transformar o cancro, dentro de alguns anos, num inimigo eliminado.

possível que o projeto da *Xanthomonas* tenha um custo previsto equivalente a quase um terço daquele, embora o microorganismo causador do cancro cítrico, com cerca de 5 milhões de pares de base e estimados 4 mil genes, tenha o dobro do tamanho do agente da praga do amarelinho.

## Virulência espantosa

De certo modo será impossível falar nos próximos meses da *Xanthomonas* sem recorrer ao conhecimento já acumulado sobre a *X. fastidiosa*. Na verdade, as duas bactérias são muito semelhantes e essa foi a principal razão científica do novo projeto (a outra razão determinante é econômica, ou seja, a bactéria em questão é causadora de um problema de enorme relevância econômica para o país). A comparação entre os dois genomas, prevêem os pesquisadores envolvidos com o projeto, permitirá certamente avanços significativos no conhecimento de ambos.

Mas, além disso, o novo projeto tem uma relevância considerável do ponto de vista biológico, porque o gênero *Xanthomonas* infecta várias outras culturas, como a do feijão (*X. a. pv phaseolis*), a do arroz (*X. a. pv oryzae*) e a do maracujá (*X. a. pv passiflora*). “Todas as espécies são muito semelhantes, e o estudo de uma delas permitirá conhecer um pouco todas as outras”, diz o professor Jesus Ferro. O fato é que, em termos científicos, o Brasil está construindo uma situação singular no conhecimento genômico de fitopatógenos, e alcançando-se a uma posição especial no campo do genoma de bactérias, a cuja pesquisa, por enquanto, só oito países vêm se dedicando. Entre eles, encontra-se o Japão, com quem o Brasil passa a estar em condições de igualdade nessa área, já que ambos contam com dois projetos.

“Depois do estudo de dois agentes causadores de importantes doenças da laranja, é natural que, em futuro próximo, o Programa Genoma parta para a pesquisa genômica da própria planta”, prevê o diretor científico da FAPESP, professor José Fernando Perez. Nada a estranhar, quando no programa já está em desenvolvimento a pesquisa genômica da cana-de-açúcar, outra planta de decisiva importância econômica para o Estado de São Paulo.

Se a *X. fastidiosa* e a *Xanthomonas axonopodis pv citri* são semelhantes, a virulência da segunda é, no entanto, muito maior. Isto porque a bactéria que a provoca é transmitida pelo ar, pelo saco de coleta, pelos engradados utilizados na colheita, pela roupa do trabalhador, pela roda do caminhão que transporta os frutos colhidos.

Bem controlado até 1997, o cancro cítrico explodiu a partir daí (ver box), no rastro do aparecimento da lagarta ou larva minadora na área de plantio. Essa larva do inseto *Phyllocnistis citrella* abre uma lesão na folha, principalmente, mas também nos ramos das vegetações novas e em frutos, e é essa lesão

que serve de porta de entrada à *Xanthomonas*. A partir daí, ela vai fazendo seu caminho de minas (ou túneis) na laranja e em outros citros que atingir. Suspeita-se hoje que o

*Phyllocnistis citrella* adulto carrega a bactéria e transmite o cancro — mas por enquanto isso é apenas uma suspeita.

## Os laboratórios do Genoma Câncer

### Coordenador de DNA:

Andrew John George Simpson, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

### Laboratórios Associados de Bioinformática:

1. Aline Maria da Silva, Bioquímica/Instituto de Química/USP
2. Antonio Carlos Cassola, Depto. Fisiologia e Biofísica, Inst. Ciências Biomédicas/USP
3. Igor Polikarpov, Grupo de Cristalografia de Proteína, Lab. Nacional Luz Síncrotron, CNPq/LNLS
4. Jesus Aparecido Ferro, Fac. Ciências Agrárias Veterinárias Jaboticabal/UNESP
5. João Carlos Setúbal, Instituto de Computação/UNICAMP
6. Milton Faria Júnior, Departamento de Química, Física e Matemática /Unaerp
7. Nancy Amaral Rebouças, Instituto de Ciências Biomédicas/USP
8. Richard Charles Garratt, Departamento de Física e Informática, São Carlos/USP
9. Roy Edward Larson, Dept. Bioquímica - Fac. Medicina Ribeirão Preto/USP

### Laboratórios Centrais e Laboratórios de Seqüenciamento:

#### Centro de Seqüenciamento 1 – Instituto de Química/USP

Coordenador: Sérgio Verjovski Almeida

#### Laboratórios de seqüenciamento ligados a este centro:

- Arthur Gruber – Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP
- Edna Teruko Kimura – Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas/USP
- Hamza Fahmi Ali El Dorry – Bioquímica, Instituto de Química/USP
- Mari Cleide Sogayar – Bioquímica, Instituto de Química/USP

#### Centro de Seqüenciamento 2 – Esc. Paulista de Medicina/UNIFESP

Coordenador: Marcelo Ribeiro da Silva Briones

#### Laboratórios de seqüenciamento ligados a este centro:

- Ismael Dale Cotrim G. Silva – Biologia Molecular/Ginecologia/UNIFESP
- João Bosco Pesquero – Biofísica/UNIFESP
- Luís Eduardo Coelho Andrade – Medicina/UNIFESP
- Rui Monteiro de Barros Maciel – Endocrinologia Molecular/Medicina/UNIFESP

#### Centro de Seqüenciamento 3 – Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP

Coordenador: Fernando Ferreira Costa

#### Laboratórios de seqüenciamento ligados a este centro:

- Christine Hackel - Genética Médica/Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP
- Gonçalo Amarante Guimarães Pereira - Genética/Instituto de Biologia/UNICAMP
- Helaine Carrer - ESALQ/USP
- Maria de Fátima Sonati – Patologia Clínica/UNICAMP

#### Centro de Seqüenciamento 4 – Faculdade de Medicina/USP

Coordenador: Maria Aparecida Nagai

#### Laboratórios de seqüenciamento ligados a este centro:

- Angelita Habr Gama - Gastroenterologia/FMUSP
- Daniel Giannella Neto - Endocrinologia/FMUSP
- Elizabeth A.L. Martins – Biotecnologia/ Instituto Butantan/SSSP
- Suely Kazue Nagahashi Marie - Neurologia/FMUSP

#### Centro de Seqüenciamento 5 – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Coordenador: Marco Antonio Zago

#### Laboratórios de seqüenciamento ligados a este centro:

- Enilza Maria Espreafico – Morfologia/FMRP/USP
- Gustavo H. Goldman – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFRP)/USP
- Maria Luisa Paco-Larson – Morfologia/FMRP/USP
- Vanderlei Rodrigues – Parasitologia/FMRP/USP

#### Centro de Seqüenciamento do Estado - Inst. Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

Coordenador: Andrew J.G. Simpson

#### Laboratórios Centrais do Estado:

- Eloiza Helena Tajara da Silva – IBILCE/UNESP
- Maria Inês de Moura Campos Pardini – Hemocentro/ Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP
- Marina Pasetto Nóbrega – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, IPED/UNIVAP
- Sandro Roberto Valentini – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP
- Sílvia Regina Rogatto – Genética/Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP