

Novos e bons frutos

Tecnologias são desenvolvidas no decorrer do Programa Genoma

O ambiente propiciado pelo Programa Genoma-FAPESP está gerando bons e imprevisíveis frutos. Até agora, dois laboratórios estão se preparando para registrar descobertas ou iniciar metodologias antes impensáveis no Brasil e que surgiram no decorrer do projeto. As pesquisadoras Eliana de Macedo Lemos e Lúcia Carareto Alves, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de Jaboticabal, que participaram do seqüenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, no âmbito do Projeto Genoma *Xylella*, já estão preparando uma descrição científica de como elaborar um meio de cultura definido para o crescimento desse microrganismo, com o qual trabalham desde 1994. A FAPESP pretende patentear a descoberta. Simultaneamente, Luís Fernando Reis, do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, que participa do Genoma Humano do Câncer, desenvolveu chips de DNA.

Para estudar e chegar ao genoma da *Xylella*, que está agora com 99,9% dos genes seqüenciados, os pesquisadores do projeto precisam fazer com que a bactéria cresça e se multiplique rapidamente e em grande quantidade. Para conseguir isso, se valem de meios de cultura onde a bactéria possa encontrar todos os nutrientes necessários à sua sobrevivência. No Projeto Genoma *Xylella* usam-se meios complexos, ou seja, meios cujas fontes de carbono e nitrogênio que os compõem não são definidas. Para o projeto, foram utilizados os meios PW, desenvolvido por M. J. Davis, e o SPW, do norte-americano J.S. Hartung. Os constituintes dos meios PW e o SPW são materiais caros e importados. Com a descoberta de Eliana Lemos e Lúcia Alves os componentes do meio de cultura podem ser comprados aqui mesmo.

Mas as vantagens do meio definido não são só conseguir fazer com que a bactéria cresça e se multiplique. Ele é valioso tam-

bém para a manipulação genética da *Xylella*. Com o genoma praticamente fechado, os laboratórios envolvidos no Genoma Funcional pesquisam uma maneira de modificar geneticamente a bactéria, alterando os prováveis genes responsáveis por sua patogenicidade. A idéia é obter mutantes e, para sua seleção, o pesquisador precisa saber exatamente os componentes do meio. Os cientistas ainda não dominam os métodos para a manipulação genética da bactéria, mas ter um meio definido já significa um passo a mais nessa direção.

Como o genoma da bactéria estava quase pronto e a maior parte dos genes estavam anotados, Eliana, bióloga e bioquímica, e Lúcia, bioquímica e microbióloga, analisaram os dados armazenados no Laboratório de Bioinformática do Projeto Genoma *Xylella*. Sabendo que a maioria dos microrganismos utilizam glicose como fonte de carbono para reações de síntese de moléculas importantes na obtenção de energia, como a ATP, as pesquisadoras analisaram os genes presentes na *Xylella*, que, descobriram, possuía todas as enzimas necessárias ao meta-

bolismo da glicose e do glicerol, outra fonte de carbono. Portanto, no meio para o crescimento da *Xylella* poderia ser usado tanto a glicose quanto o glicerol como fonte de carbono.

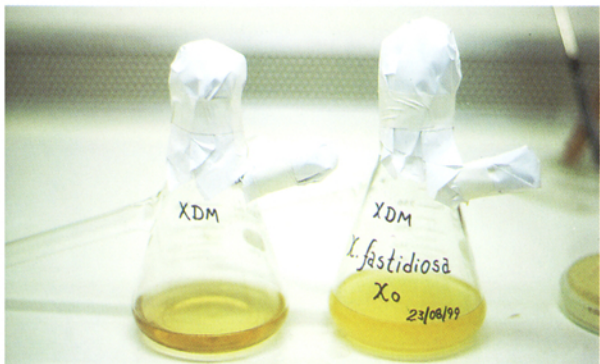
Voltando ao genoma

Para definir a fonte de nitrogênio do meio, as pesquisadoras analisaram novamente o genoma e observaram quais dos 22 aminoácidos a bactéria conseguia sintetizar. Um deles, o glutamato, era uma exceção. Isso significava que ele deveria estar presente no meio de cultura. Ficou faltando apenas a definição dos sais. Novamente o genoma mostrou que a bactéria tinha os genes relacionados com o transporte dos sais para dentro dela. A membrana da *Xylella* é seletiva, e a porta de entrada é uma proteína por onde entram ferro, sulfato e magnésio. A análise do genoma também indicou uma elevada quantidade de genes relacionados com a pirofosfatase. Era o que as pesquisadoras precisavam para acrescentar o fosfato, na forma de pirofosfato, ao meio de cultura.

O meio definido de *Xylella* vai beneficiar pesquisadores do mundo todo e principalmente aqueles envolvidos no Genoma Funcional da *Xylella*. "Ficou provado que é possível voltar ao genoma e resolver um problema sério", diz Eliana Lemos. Desde a metade do ano passado, quando chegou à formulação do novo meio de cultura, o laboratório de Jaboticabal faz testes para tornar a bactéria mais competente e possibilitar as modificações genéticas.



FOTOS GABRIELA ZAITH



Eliana Lemos e o novo meio de cultura (ao lado, à esq.): facilitando a manipulação genética e a pesquisa de mutantes da *Xylella*

Chips de DNA

O primeiro laboratório de chips de DNA, que começa a ser montado no Brasil, irá utilizar seqüências geradas pelo Projeto Genoma Humano do Câncer. Os chips vão organizar as informações geradas pelo projeto e possibilitar aos cientistas responder quando e em quais tecidos um determinado RNA está presente. A iniciativa é do Instituto Ludwig e está sob a responsabilidade do coordenador de RNA do Genoma Humano do Câncer, Luís Fernando Reis. “Eventualmente vamos encontrar genes que estão sendo expressos só no tumor e não no tecido normal e assim descobrir novos alvos para o tratamento ou formas de diagnóstico”, diz Reis.

O novo laboratório deve começar a funcionar em outubro, no prédio do Instituto, que investirá US\$ 800 mil no primeiro ano e US\$ 400 mil no segundo. A partir daí serão US\$ 200 mil anuais para manutenção. Além do coordenador, Reis, outros quatro pesquisadores já estão envolvidos no projeto: Alex Carvalho, Sibebe Mireles, Beatriz Stolf e Ludmila Ferreira.

Os chips de DNA ou *microarray* permitirão a organização dos 500 mil plasmídeos gerados pela técnica Orestes. Plasmídeos são DNA circulares, que se multiplicam nas bactérias de forma autônoma e que carregam um pedaço do DNA de determinada célula. Dentro do Projeto Genoma, para chegar a esse pedaço, os pesquisadores extraem o RNA da célula, que contém os genes expressos. A partir do RNA, que é de difícil manipulação, gera-se o cDNA. Quando são seqüenciados os genes de uma célula de pulmão, por exemplo, está se trabalhando com um pedaço do DNA, o cDNA, introduzido num plasmídeo. Atualmente, chips de DNA são feitos pela comunidade científica com os genes de domínio público disponíveis nos bancos de dados internacionais. O novo laboratório, além de iniciar uma prática pioneira no Brasil, permitirá a descoberta de possíveis novas drogas ou novos marcadores tumorais.

O processo

A base do chip é um suporte sólido, que tanto pode ser uma membrana de náilon ou uma lâmina de vidro. Nela se fixam os plasmídeos com as seqüências correspondentes aos genes expressos nos tecidos normais ou tumorais. Essas seqüências são depositadas no suporte sólido por meio de um robô e, pela utilização de raios ultravioleta, uma reação química fixa as seqüências à membrana. Com os genes assim dispostos e organizados, e comparando-se duas ou mais fases sólidas idênticas, pode-se saber em quais tecidos um determinado gene é expresso. O *microarray* também pode indicar quando um gene é expresso: se no tecido normal, na alteração pré-maligna ou na fase maligna. Um robô leva aproximadamente duas horas para produzir cerca de 50 réplicas de uma fase sólida com 10 mil seqüências distribuídas em cerca de 2 centímetros quadrados, no caso de lâminas de vidro, ou cerca de 13 mil seqüências em 70 centímetros quadrados, no caso de suporte de náilon.

MEDICINA

Regeneração acelerada

Lasers e medicamentos aceleram recuperação do fígado

Um dos órgãos mais complexos do corpo humano é o fígado. São conhecidas pelo menos cinco mil funções para esse órgão, que compreendem a captação de substâncias, síntese, metabolismo e coagulação do sangue, consideradas indispensáveis à vida. Não é de se admirar, portanto, que pessoas enfrentem sérias dificuldades quando perdem parte do fígado em intervenções cirúrgicas. Sua situação pode melhorar em futuro próximo. Uma equipe multidisciplinar da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto está realizando pesquisas sobre maneiras de estimular a regeneração do fígado a partir da parte restante do órgão. A primeira parte do estudo, envolvendo trabalhos de laboratório em ratos, terminou com muito sucesso. A partir do ano que vem, provavelmente, começam os testes em seres humanos, no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

“Os resultados são extremamente animadores”, diz o professor Orlando de Castro e Silva Júnior, do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, coordenador da equipe, que envolve ainda os departamentos de Farmacologia e Patologia da própria faculdade e o Instituto de Física de USP de São Carlos. Os pesquisadores conseguiram comprovar que é possível estimular a regeneração hepática em animais de laboratório, tanto com o uso de luz laser de baixa potência como com o uso de algumas substâncias químicas. As perspectivas são de que os métodos tenham sucesso também em seres humanos, abreviando o período de tratamento e a volta às atividades normais depois da operação.

O início dos testes em seres humanos depende agora da aprovação dos métodos a serem aplicados, pela comissão de ética do Hospital das Clínicas. Essa é uma prática em experiências como esta, que ainda não fazem parte da literatura médica internacional. Os pacientes serão, principalmente, pessoas que têm parte do fígado extraída devido a vários fatores, como tumores irreversíveis. As experiências, iniciadas há três anos, contaram com um investimento de R\$ 369,7 mil da FAPESP, dentro do projeto temático *Transplante Experimental de Fígado*

e *Regeneração Hepática*, coordenado pelo professor Castro e Silva.

Quarta parte

“Conseguir acelerar a regeneração do fígado é fundamental”, diz o médico sobre os pacientes submetidos a esse tipo de cirurgia. “Com isso, proporcionamos ao fígado



Castro e Silva: estudos em animais servem de preparo para testes em humanos

remanescente melhores condições de adaptação ao organismo e melhor recuperação do paciente”, acrescenta. Há casos em que os médicos tiram até 75% do fígado do paciente. O restante, a quarta parte do órgão, é capaz de regenerar-se, se estiver em boas condições. Gradualmente, o fígado volta a exercer todas as suas funções.

A fase crítica ocorre nos primeiros dias depois da operação. Mesmo com um acompanhamento médico intensivo, o paciente sofre bastante. A mudança que ocorre no metabolismo de captação e excreção gera um desconforto muito forte. Se for possível acelerar essa regeneração, o paciente vai passar mais depressa por essa fase. Além de ter o desconforto aliviado, ficará menos tempo internado e terá a recuperação abreviada.