Mudou sua vida?

Muda sua vida ao abrir oportunidades. Algumas delas, ou muitas delas, você tem que controlar, porque se não o fizer, não terá vida nenhuma. O que muda são as oportunidades para interagir com outras pessoas e outras coisas.

As idéias a respeito da evolução dos genes mudaram a partir de sua descoberta. Ouvi de um biólogo molecular a afirmação de que o ser humano pode ser visto como um verme tetraplóide *(risos gerais)* Como o senhor vê esta questão?

A questão é a seguinte: vamos dizer que cem mil seja o conjunto de genes onde nós buscamos nossas funções. Então, de onde eles vêm, do ponto de vista do estudo da evolução, é de fundamental importância, não? Quando alguém olha um organismo simples como a *C. elegans,* um verme do solo, vê um genoma em que um certo número de genes está presente uma vez. Eles realizam funções determinadas, como comandar a cópia de genes, por exemplo. Quando olhamos nossa seqüência de DNA, encontramos, em muitos casos, não uma cópia de determinados conjuntos de genes, mas três ou quatro. Isto sugeriria uma maneira simples de olhar para a evolução do genoma humano: imaginar que, em algum estágio, esse conjunto de genes foi duplicado três vezes, ligado todo junto, e a partir daí evoluiu. Eu duvido seriamente de que tenha sido simples assim. Suspeito que o conjunto de genes que nós temos veio de fusões de diferentes genomas, e de alguma duplicação. O lento curso da evolução, depois disso, fez nascer o conjunto de genes que nos permite ter todos os tecidos diferentes do corpo: a pele, os ossos, os olhos e tudo o mais... Quando você olha para a evolução dos genes, tem que olhar para a estrutura de íntrons e exons, e perguntar: de onde veio este padrão? Veio de um gene muito antigo, foi feito de pedaços que foram ligados juntos, ou é alguma coisa que chegou mais tarde, quando as seqüências foram absorvidas dentro do genoma e partes diferentes do gene duplicaram-se para fazer um novo gene? Nós podemos ver na evolução de genes esses padrões e, à medida que tivermos mais dados de genomas, poderemos fazer afirmações mais completas sobre como o genoma humano evoluiu – você sabe, de onde ele veio entre os sistemas biológicos. Neste momento, temos uma suspeita real que um conjunto de genes "informacionais", que estão envolvidos em copiar o gene em RNA e expressá-lo, veio de um conjunto de organismos, e que genes metabólicos vêm de outro. A estrutura de exons e introns vai nos contar sobre eles. Hoje, já temos com certeza dois tipos diferentes de íntrons, dois tipos de sistemas de *splicing,* agora temos que perguntar: qual é a origem evolucionária desses dois sistemas de *splicing?* Tudo isso é fascinante....

GENOMA CANA

Resultados antecipados

Os pesquisadores identificaram milhares de genes importantes

O Projeto Genoma Cana, lançado em abril deste ano pela FAPESP, está apresentando resultados surpreendentes. Como se pretendia, mas num ritmo mais intenso do que o imaginado, a pesquisa levou até o momento à identificação de 5.244 genes da cana-de-açúcar relacionados ao metabolismo dos açúcares e à resistência a doenças, que poderão resultar, com o tempo, em variedades mais produtivas e rentáveis. Trata-se de um avanço sem precedentes na pesquisa da cana, na avaliação do biólogo Paulo Arruda, coordenador de DNA do projeto e diretor do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Com um orçamento de US$ 8 milhões da FAPESP e US$ 400 mil da Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Coopersucar), o Genoma Cana representa o esforço conjunto de 28 grupos de pesquisa, distribuídos nas três universidades públicas estaduais, USP, Unicamp e Unesp, três particulares, em Ribeirão Preto, Mogi das Cruzes e São José dos Campos, o Instituto Agronômico de Campinas e o Centro de Tecnologia da Coopersucar (CTC). Participam também dois consultores internacionais, especialistas em genoma de plantas.

No total, cerca de 150 pesquisadores estudam a constituição genética da cana, uma das principais culturas agrícolas do Estado de São Paulo. Regularmente, encontram-se para atualizar as descobertas e as técnicas de trabalho – a próxima reunião geral será nos dias 22 e 23 de novembro, na FAPESP. "Não conheço nenhum outro país com tantos pesquisadores estudando o genoma da uma única planta", observa William Burnquist, gerente de fitotecnia do CTC e responsável pelo intercâmbio internacional. "Passamos, de um pulo só, a Austrália e os Estados Unidos, que têm tradição nessa área", diz. Até o projeto ser constituído, lembra ele, havia no máximo uma dezena de investigadores da genética da cana.

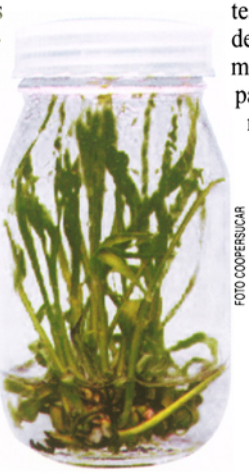


FOTO COOPERSUCAR

Cultura de tecido: para experimentos

Seqüências inéditas

Do total de genes identificados, 37% (ou 2.024) são absolutamente novos, sem semelhantes em nenhum outro organismo *(ver tabela)*. A princípio, pode residir nesses genes inéditos parte essencial da identidade da cana, que a diferencia dos outros seres. Essas novas estruturas, lembra Arruda, podem estar associadas à produção de proteínas importantes, embora ainda não se saiba o que, especificamente, elas fazem. Comparando, seria como se um arqueólogo descobrisse uma cerâmica antiqüíssima e verificasse que se trata de um objeto de uso humano, sem saber para que era usada.

Os outros genes, que têm similares ou homólogos aos seqüenciados em outras espécies, também têm valor. Exatamente por já serem conhecidos, é muito mais fácil saber quais realmente são importantes – e, a partir daí, serem utilizados rapidamente para pesquisas acadêmicas ou aplicadas. O pesquisador Antonio Figueira, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP, por exemplo, identificou dezenas de genes envolvidos na absorção e no transporte de nutrientes, que servirão de base para o desenvolvimento de variedades de plantas mais eficientes na absorção iônica. É uma forma de reduzir o uso de fertilizantes químicos e, conseqüentemente, o impacto ambiental da agricultura. Seria também um caminho para permitir que as plantas possam se desenvolver em solos pobres em nutrientes ou com concentrações elevadas de íons tóxicos.

No centro de pesquisas da Coopersucar, o pesquisador Eugênio Ulian não esconde o entusiasmo com a descoberta dos genes envolvidos no metabolismo de carboidratos (açúcares). Já são conhecidos 25% (ou 57, em número absoluto) dos genes já identificados em outras plantas, que

AS DESCOBERTAS ATÉ AGORA

Os genes seqüenciados pelo Projeto Genoma Cana de julho a setembro

Clones Processados	Seqüências com boa qualidade	Índice de sucesso	Genes únicos	Homólogos no GenBank	Genes novos sem homólogos no GenBank
8.511	7.081	83.2%	5.244	3.219	2.024

Fonte: CBMEG

FOTO EDUARDO CESAR

Arruda, com clones do material genético da cana: trabalho conjunto de 28 grupos

viabilizam a fixação de dióxido de carbono, a síntese de amido e sacarose e o metabolismo de frutose e manose – processos vitais para a planta, que a tornam mais ou menos interessante do ponto de vista econômico. A base de dados do Genoma Cana ganha volume também com o trabalho dos pesquisadores Luís Camargo, do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, e Marie-Anne Van Sluis, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, ambos da USP.

Também contando as descobertas em mais de uma mão, Camargo e Marie-Anne encontraram dezenas de genes da cana homólogos (semelhantes) a outros, de outras espécies, que conferem resistência a bactérias, fungos e vermes nematóides. Por analogia com o material e os mecanismos genéticos de outras plantas, esses genes podem ser empregados como marcadores moleculares para o desenvolvimento de variedades de cana resistentes a pragas. O grupo da botânica da USP estuda também os retrotransposons, seqüências de DNA capazes de saltar de um local para outro no genoma e, em conseqüência, modificar a expressão gênica. Marie-Anne está admirada com a quantidade de retrotransposons expressos na cana, cujo estudo permitirá ao grupo entender melhor a natureza da variabilidade genética da cana.

A prioridade é a identificação dos genes ativos ou expressos, diretamente associados ao metabolismo da planta. São poucos. O genoma da cana pode ser tão vasto quanto o humano – recentemente redimensionado para 100 mil a 140 mil, pelo menos 20 mil a mais do que se imaginava – e os genes que interessam não passam de 5% do genoma de um organismo. Além do porte, o genoma da cana tem outra peculiaridade. Cada um de dez cromossomos (as imensas moléculas de DNA enoveladas, de tamanhos variados, que contêm os genes) repete-se oito vezes no núcleo das células. Pode tratar-se de um resultado da combinação de espécies, já que as variedades de cana utilizadas atualmente resultam do cruzamento de duas espécies, *Saccharum officiarum* e *Saccharum robustum*. Poucas espécies são assim. Na maioria dos animais e dos vegetais, há apenas um par de cada cromossomo.

Busca e checagem

Por essa razão, lembra o pesquisador da Unicamp, a quantidade e a variedade de genes a serem analisadas é essencial, porque cada tipo de célula vai expressar genes específicos. Numa célula da folha verde da cana, por exemplo, mais da metade dos genes expressos corresponde a não mais de dez proteínas envolvidas na fotossíntese. "Cada tipo celular produz em média 30 mil tipos diferentes de proteínas", diz Arruda. Entretanto, boa parte dos 30 mil compostos químicos produzidos pela raiz são diferentes dos 30 mil elaborados pelas folhas, por sua vez distintos dos 30 mil das flores e assim por diante. "Queremos localizar tudo o que é importante na cana-de-açúcar", comenta. O plano é identificar 10 mil genes ativos nos diversos tecidos da planta até o final do ano e 50 mil até o final do trabalho, em 2003.

Para chegar aos resultados pretendidos, o processo é longo. Arruda conta que o projeto segue em parte o modelo estabelecido para o projeto genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, que integra o Programa Genoma-FAPESP, mas algumas inovações procuraram tornar a estrutura mais ágil na análise das seqüências e no intercâmbio de informações e resultados entre os laboratórios. Para identificar os genes da cana, os pesquisadores se valem da técnica EST (*Expressed Sequence Tags* ou etiquetas de seqüências expressas), desenvolvida para estudar o genoma humano e utilizada atualmente para conhecer o genoma de dezenas de organismos, com destaque às plantas economicamente mais importantes, como arroz, milho, trigo e soja. A EST acelera as descobertas, por identificar apenas os trechos dos genes expressos, que codificam proteínas, fazendo uma filtragem razoável do que realmente interessa aos pesquisadores.

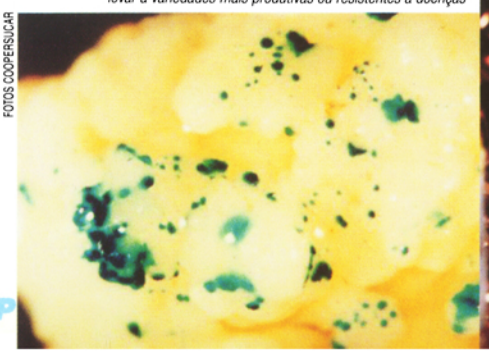
Inicialmente, no estudo do genoma da cana, os estudantes do CBMEG Edson Kemper, André Vettore e Felipe da Silva sintetizam moléculas de cDNA (DNA complementar) a partir de RNA

A etapa seguinte

O caminho de pesquisa do genoma da cana-de-açúcar mostra-se claro. Dia a dia, os mecanismos mais íntimos da planta tornam-se mais conhecidos. Mas, vencido o desafio de identificar os genes, impõe-se outro: como lidar com esses genes para fazer com que a cana-de-açúcar, além de açúcar, produza vitaminas, aminoácidos, enzimas de uso agroindustrial ou mesmo fármacos de uso humano? Arruda conta que, por exemplo, bastaria modificar uma das enzimas envolvidas na biossíntese de sacarose, um tipo de açúcar formado por glicose e frutose, para a cana produzir mais frutose, que poderia servir de alimento energético, como já se faz nos Estados Unidos, a partir de amido de milho.

Segundo ele, substâncias de alto valor nutritivo também poderão ser produzidas pela cana. Sua própria equipe está empenhada em verificar a possibilidade de desenvolver uma cana com maior teor de lisina, cuja síntese é controlada por duas enzimas produzidas pelos genes. Uma delas, a aspartato-kinase, já se encontra na base de dados do projeto. O gene que leva à formação da outra, a dihidropicolinato-sintetase, ainda não foi encontrado, mas Arruda confia que logo aparecerá. O plano da equipe é produzir uma pequena alteração nessas duas enzimas de tal forma que elas se expressem no colmo da cana e acumulem o aminoácido em quantidades significativas, permitindo a produção, por exemplo, de rapaduras mais nutritivas.

Produtos desse tipo têm interesse comercial, como indicam duas empresas norte-americanas que devem lançar em breve um milho com maior teor de lisina, esperando causar um impacto sem precedentes na alimentação animal. "Não vamos mudar a cana colocando genes estranhos à planta, mas alterando a expressão do gene, fazendo com que seja mais ou menos ativo, para produzir o que nos interessa", diz. "Se não fizermos isso agora, teremos que comprar essa tecnologia daqui a alguns anos."



FOTOS COOPERSUCAR

Perspectivas: estudos de transformação genética da cana (abaixo, cultura de células com o gene da glucuronidase, enzima atuante no metabolismo de sacarose), que podem levar a variedades mais produtivas ou resistentes a doenças

mensageiro (RNAm) extraídos de diferentes tecidos da cana. As moléculas de cDNA são ligadas em vetores chamados plasmídeos, que são DNA circulares e não alongados, como os habituais. Em seguida, as moléculas de cDNA são clonadas em milhares de bactérias. Cada bactéria, que recebe o nome de clone, possui uma única molécula de cDNA correspondente a uma proteína codificada por um gene da cana.

Os clones são em seguida ordenados em placas, replicados e armazenados a uma temperatura de 70º C negativos. Nesse momento, estão prontos para serem distribuídos entre os 23 laboratórios que fazem o seqüenciamento do genoma da cana. Nesses centros, por meio de seqüenciadores automáticos de DNA, os pesquisadores determinam a seqüência de parte da molécula de cDNA, sempre composta de quatro moléculas, os chamados nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) que se repetem num formato único de cada gene. Como cada três nucleotídeos na seqüência do cDNA correspondem a um aminoácido na proteína, sabendo a ordem de nucleotídeos é possível determinar a seqüência das proteínas que cada gene vai formar.

O fluxo da informação

Os laboratórios de seqüenciamento determinam as seqüências dos clones de cDNA e as enviam para o Laboratório de Bioinformática (LBI) da Unicamp, que realiza o controle de qualidade das seqüências e uma série de análises. A mais importante é a busca de homologia com as seqüências depositadas no banco de dados internacional GenBank, que contém milhões de seqüências determinadas dos mais diversos organismos, rastreado por meio de programas de computador como o Fasta, o mais conhecido conjunto de dispositivos de busca de homologia entre seqüências de proteínas e de DNA. Os dados processados são armazenados na base de dados do projeto e, a partir daí, podem ser consultados pelos 12 laboratórios de *data mining* (ou prospecção de dados), que analisam as informações colhidas.

O avanço contínuo do projeto pode ser acompanhado na página da FAPESP na Internet, que acumula as informações das seqüências e os relatórios dos grupos de *data mining*, produzidos ao longo do trabalho. O desempenho de cada laboratório participante pode ser verificado diariamente. Até agora, o índice geral de sucesso, que reflete o número de seqüências aproveitáveis em relação ao número total de clones processados, é de 83%.

A habilidade em encontrar genes em meio aos ESTs chega às vezes a 90,6%, como aconteceu com a equipe do pesquisador Walter Siqueira, do Instituto Agronômico de Campinas, ou de 90,3%, da equipe de Maria Inês Ferro, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, em Jaboticabal. "Esse resultado é resultado igual ou até melhor do que o obtido por alguns grandes centros de seqüenciamento de DNA da Europa e dos Estados Unidos", observa Arruda.

MEDICINA

Melhores prognósticos

Marcadores biológicos permitem prever a evolução do câncer de pulmão

Há treze anos, desde que defendeu sua tese de doutorado, Vera Luiza Capelozzi, professora associada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), se dedica a uma tarefa pioneira na ciência nacional: pesquisar marcadores biológicos de prognósticos que possibilitem prever, com um bom grau de certeza, a evolução do câncer de pulmão, uma das neoplasias de mais difícil controle para os oncologistas, e estimar a sobrevida dos pacientes. Marcadores biológicos são moléculas contidas na célula tumoral cuja detecção pode ser efetuada por simples técnicas laboratoriais, como a histoquímica e a imunohistoquímica.

Hoje, graças aos estudos da pesquisadora e sua equipe nessa área, patrocinados em parte e nos últimos três anos pela FAPESP, já é possível estimar com 70%, às vezes 80% de exatidão, como será o comportamento de um tumor nesse órgão, sobretudo dos casos em que o câncer está presente em apenas um dos pulmões e o paciente pode ser submetido a uma cirurgia para eliminar esse mal. Essa previsão também fornece importantes informações para o médico sobre a maior ou menor possibilidade de a doença voltar a se manifestar após a operação, norteando, assim, o uso de tratamentos auxiliares como radio ou quimioterapia. A metodologia de análise vem sendo empregada com sucesso em pacientes de câncer do pulmão que foram operados no Hospital das Clínicas de São Paulo.

"Um dos principais objetivos dessas pesquisas era diminuir a subjetividade na avaliação dos tumores de pulmão", diz Vera Luiza. Muitas vezes, baseados apenas na análise do estágio do tumor e de sua disseminação no tecido, os médicos chegam a resultados discrepantes sobre a evolução de um câncer. Isso porque eles freqüentemente carecem de outros dados, como os marcadores de prognósticos, capazes de auxiliá-los a traçar um quadro evolutivo mais realista da doença. Seguindo uma linha de pesquisa internacional, a professora da USP analisou se havia alguma correlação entre vários marcadores biológicos (DNA ploidia, AgNOR, PCNA, P53, Ki67, entre outros) e a progressão do tumor. O objetivo final do trabalho era chegar a uma espécie de "modelo matemático para prever sobrevida".

Do ponto de vista epidemiológico, os estudos sobre o comportamento biológico do câncer de pulmão são mais do que justificáveis. A doença acomete milhares de pessoas em todo o mundo e é um dos poucos tipos de neoplasias cuja curva de incidência ainda não dá sinais consistentes de queda ou estabilização nem em países desenvolvidos, como os Estados Unidos. "Entre os cânceres, o de pulmão é hoje o mais significativo em termos de impacto sobre os indivíduos (mortes e perda de qualidade de vida). Quase todos os cânceres de pulmão são causados pelo fumo", diz o relatório deste ano sobre a saúde no mundo (World Health Report 1999) da Organização Mundial da Saúde (OMS). Só no Brasil, 20.000 novos casos desse tipo de câncer foram detectados no ano passado e 12.700 pessoas morreram por causa desse problema de saúde (9.400 homens e 3.300 mulheres). Entre os homens brasileiros, é o tipo de câncer com maior incidência e o quinto mais comum entre as mulheres. Nos Estados Unidos, assim como em outros países industrializados, onde, nas últimas décadas, as mulheres passaram a fumar em grande quantidade, as mortes cau-

FOTOS EDUARDO CESAR

Vera Luiza: estudos iniciados há 13 anos permitem o acompanhamento de pacientes