

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 70°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 Agrônomo 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 dos Estados Unidos”, observa Arruda.

## CIÊNCIA

## 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 frequentemente 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 ploídia, 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-



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

sadas pelo câncer de pulmão já ultrapassam as provocadas pelo tão temido câncer de seio. A comunidade científica acredita que 90% dos casos de câncer de pulmão sejam causados pelo tabagismo (ver gráficos).

## Novas referências

As pesquisas de Vera Luiza, um ramo de estudo muito desenvolvido em países como Estados Unidos, Japão, Alemanha e Inglaterra, visam a fornecer novos elementos aos protocolos de tratamento do câncer de pulmão, ainda hoje muito dependentes de dois tipos de análise: o estadiamento do tumor (se o câncer está em estágio inicial ou desenvolvido, se está localizado em uma região ou disseminado pelo organismo) e sua classificação histológica (estudo biológico da estrutura microscópica dos tecidos).

De acordo com a classificação universalmente aceita e preconizada pela OMS, obtida a partir da microscopia de luz, há quatro grandes tipos de cânceres de pulmão: carcinoma de células escamosas (epidermóide), carcinoma de células pequenas (*oat-cell*), adenocarcinoma e carcinoma de grandes células (anaplásico). Como as diferenças entre tais tumores são, às vezes, muito tênues, dificultando assim um prognóstico da evolução da doença, essa classificação acaba sendo um parâmetro muito imperfeito. Outro problema desse tipo de classificação é que, às vezes, o material coletado para análise não é representativo de todo o tumor.

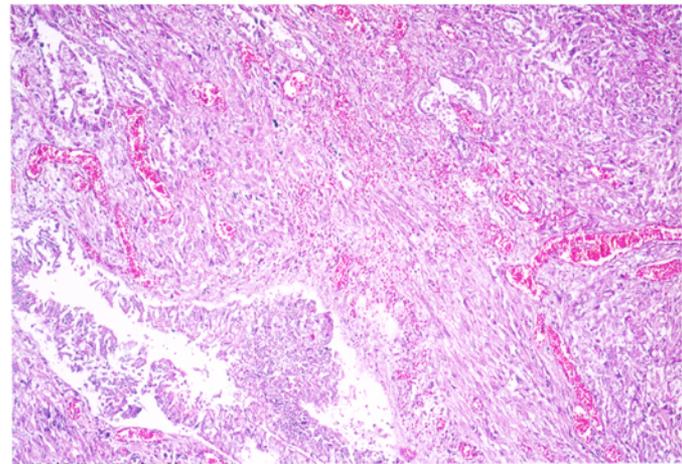
Diante de todas essas limitações na catalogação convencional de neoplasias pulmonares, Vera Luiza resolveu, então, estudar se outros fatores presentes nos tumores não poderiam servir de referência para o prognóstico da doença. Dessa inquietude intelectual da professora nasceu o projeto *Câncer de Pulmão: Aplicabilidade de Métodos Morfométricos, Histoquímicos, Moleculares e Imunohistoquímicos como Índices de Prognóstico*, no qual a FAPESP investiu R\$ 162,2 mil e que levou à criação do Labo-

ratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da USP, com equipamento próprio e permanente e material de consumo (anticorpos) cedido pela agência paulista de fomento à pesquisa.

Os estudos coordenados por Vera Luiza enfocaram basicamente um tipo de câncer do pulmão, o carcinoma de células escamosas, o mais comum deles. O tratamento ideal para esse tipo de câncer é a ressecção cirúrgica (retirada de um órgão em sua totalidade ou parcialmente a fim de extirpar o tumor). O problema é que em cerca de 30% dos pacientes operados o tumor acaba voltando a se manifestar até cinco anos após a cirurgia. Essa constatação levou à seguinte reflexão: se a ciência tivesse como prever com razoável grau de confiabilidade quais entre todos os pacientes operados tendem a apresentar uma recidiva da doença, os médicos poderiam lançar mão de terapias auxiliares (radio ou quimioterapia) nesses indivíduos com predisposição a desenvolver novo tumor, a fim de evitar que isso aconteça. Como se sabe, a radio e a quimioterapia são tratamentos agressivos contra o câncer, que não podem ser prescritos sem um rigor científico, sob pena de causar danos desnecessários aos pacientes.

## Presença de marcadores

Para melhor estudar os vários marcadores biológicos, o projeto foi subdividido em cinco projetos menores, que foram tocados por Vera Luiza e mais seis médicos que defenderam teses de doutorados sobre o tema (Heloísa Andrade de Carvalho, Olavo Ribeiro Rodrigues, Fabiola Del Carlo Bernardes, Patrícia Cury, Carmela Caporino e Lea Maria Macruz Ferreira Demarchi). Juntando todos os estudos, foram feitas análises em 45 casos de carcinomas de células escamosas de pulmões operados, 43



Os marcadores, em vermelho mais escuro, no núcleo celular: confirmação da atividade tumoral

casos de carcinomas avançados de células escamosas e 75 casos de carcinomas de células não-pequenas e linfonodos mediastinais operados.

Um dos marcadores que se mostrou mais eficaz como sinalizador do comportamento de cânceres de pulmão foi a quantificação das regiões organizadoras (NORs, em inglês *Nucleolar Organizer Regions*) por meio de técnicas argirofílicas ou AgNOR, que significa proteínas nucleolares impregnadas pela prata. Trata-se de um método histoquímico simples e barato, que pode ser empregado em diagnósticos rotineiros realizados em laboratório. Os pesquisadores da USP contaram a expressão de AgNOR em núcleos neoplásicos e concluíram que, no tipo de câncer de pulmão mais comum (carcinomas de células escamosas), os tumores em estágio mais precoce apresentam uma baixa expressão desse marcador. Já os tumores com uma alta quantidade de AgNOR eram justamente os que estavam em um estado mais avançado. Conseqüentemente, a partir da análise da quantidade de AgNOR num tumor, os médicos tinham uma boa pista de quão longa seria a sobrevida de um paciente. Pacientes com baixos índices de AgNOR sobreviviam até cinco anos após a ressecção do tumor, algo muito raro de acontecer nos doentes que apresentavam alta concentração de AgNOR.

Outro marcador biológico interessante foi a chamada análise da ploidia do DNA (número de conjuntos de cromossomos) do tumor. Nos doentes com carcinomas de células escamosas, verificou-se que, depois de operados, os pacientes com tumores aneuplóides tinham uma sobrevida menor do que os indivíduos que apresentavam tumores diplóides ou tetraplóides. A equipe de Vera Luiza testou a eficiência de outros marcadores biológicos, como as técnicas imunohistoquímicas PCNA, P53 e Ki67, nesse mesmo tipo de câncer e outros tumores de pulmão. PCNA, P53 e Ki67 são moléculas presentes nas células tumorais conhecidas como oncoproteínas, que são expressas por anormalidades no ciclo celular biológico, indicando que as células não conseguem mais parar de se multiplicar, num processo que leva ao aparecimento do câncer.

## As proteínas e as células

*Como os pesquisadores medem a presença dos marcadores biológicos dos tumores? Tudo começa a partir da realização de uma biópsia (retirada de um fragmento de tecido para estudo) do tumor a ser analisado. Inicialmente, é feita uma análise mais rotineira do tecido canceroso, com o microscópio de luz, que permite basicamente estabelecer a qual dos quatro grandes tipos de câncer de pulmão o tumor pertence. Em seguida, começa o trabalho mais apurado.*

*Lançando mão da microscopia eletrônica e trabalhando com reagentes de laboratório que identificam a presença de certas substâncias no tecido estudado, os pesquisadores quantificam uma série de parâme-*

*tros das células daquele tecido, como seu volume nuclear (aplóide, diplóide ou tetraplóide) e a expressão de proteínas (P53, Ki67, etc.).*

*Obtidos esses dados, o passo seguinte é verificar se é possível estabelecer uma relação entre, por exemplo, a maior ou menor presença de uma proteína e a evolução do tumor. Em paralelo, é feito um acompanhamento (geralmente 60 meses) dos pacientes cujos tumores sofreram biópsia. Empregando modelos matemáticos, os pesquisadores montam, por fim, equações cruzando as informações dos marcadores analisados e da evolução da doença dos pacientes.*

## Complicadas equações

Os resultados variaram de acordo com o marcador utilizado e a espécie de tumor analisado. A expressão de AgNOR, que se mostrara um bom indicador da sobrevivência de um paciente com carcinoma de células escamosas de pulmão, não foi eficaz como indicativo da sobrevivência de doentes com carcinomas de células não-pequenas de pulmão. Para montar um modelo matemático capaz de determinar com certa segurança a sobrevivência dos doentes, Vera Luiza vai juntando os marcadores que se mostram eficientes como indicadores do comportamento biológico de cada tipo de câncer de pulmão e, combinando-os, elabora complicadas equações. Quanto mais refinadas forem essas equações, com a adição de novos marcadores, mais próximas de reproduzir a realidade evolutiva do câncer elas serão. “O modelo não é 100% eficaz. Por isso, o ideal é que os médicos e as pessoas procurassem identificar um câncer ainda em seu estágio inicial. Dessa forma, é mais fácil de tratar o tumor”, afirma Vera Luiza. Por ser, em seus estágios iniciais, uma doença invisível e silenciosa, o câncer de pulmão acaba sendo detectado, em

60% dos casos, apenas quando atinge sua fase mais avançada, reduzindo, assim, o arsenal terapêutico à disposição dos médicos.

Vera Luiza conta que teve de superar algumas dificuldades iniciais para poder levar adiante suas pesquisas na área, sobretudo antes de conseguir patrocínio de agências de pesquisa, como a FAPESP. Ela começou trabalhando com equipamento emprestado e dispunha de um microscópio de apenas uma lente. Não tinha nem computador de uso exclusivo para poder rodar seus modelos matemáticos de previsão de prognóstico de câncer de pulmão. “Usávamos coisas emprestadas dos colegas”, diz a pesquisadora, que hoje conta com microcomputador exclusivo para suas pesquisas, além de um potente microscópio, com uma câmera acoplada, e de um laboratório de patologia molecular, estrutura indispensável para que seu trabalho seja bem feito.

A perseverança de Vera Luiza lhe rendeu frutos internacionais. Hoje, alguns dos trabalhos de seu grupo de pesquisadores foram publicados em revistas científicas de prestígio do exterior, como a *Chest* e *Histopathology*. Os trabalhos também ganharam reconhecimento em congressos e even-

tos internacionais. Um dos estudos sobre o papel do AgNOR como marcador biológico em alguns tipos de câncer, por exemplo, ganhou o prêmio de melhor trabalho científico no *49th Annual Meeting of the Japanese Association for Thoracic*, em Kyoto, em 1996. Um outro estudo dos pesquisadores da USP também recebeu o prêmio de melhor trabalho científico na 8ª Conferência Mundial de Câncer do Pulmão, realizada na Irlanda em 1997.

### Perfil:

Vera Luiza Capelozzi graduou-se em Medicina pela Faculdade de Medicina de Santo Amaro, fez o mestrado e doutorado em Patologia na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e o pós-doutorado no National Heart and Lung Disease – Brompton Hospital, na Inglaterra. É professora da FMUSP e diretora do seu Serviço de Verificação de Óbitos.

**Projeto:** Câncer de Pulmão: Aplicabilidade de Métodos Morfométricos, Histoquímicos, Moleculares e Imunohistoquímicos como Índices de Prognóstico.

**Investimento:** R\$ 162,2 mil

