

Brasil se afirma no seleto clube da genômica mundial

MÔNICA TEIXEIRA

Antes do previsto, está sendo concluído o seqüenciamento genético da bactéria Xylella fastidiosa



OS PARTICIPANTES DO GENOMA XYLELLA

Uma equipe de 161 integrantes...

Addolorata Colariccio, Adilson Leite, Adriana Fumie Tateno, Adriana Matsukuma, Agda Paula Facincani, Alda Maria B.N. Madeira, Alessandro Paris, Aline Maria da Silva,

Ana Cláudia Rasera da Silva, Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento, Ana Paula Moraes Fernandes, Anamaria Aranha Camargo, Anderson Ferreira da Cunha, André Luiz Vettore,



Laranjeira e folha afetadas...

pela bactéria *Xylella fastidiosa*.

Elas bloqueiam o xilema da planta...

prejudicando a circulação da seiva

MIGUEL BOYAYAN

Os pesquisadores da rede Onsa (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis* ou Organização para Sequenciamento e Análises de Nucleotídeos) preparam-se para anunciar à comunidade científica brasileira e internacional que o genoma completo da bactéria *Xylella fastidiosa* já está completamente sequenciado. O anúncio da conclusão do projeto pioneiro do Programa Genoma-FAPESP faz do Brasil o único país do Hemisfério Sul a ter lugar no seletivo núcleo que detém a tecnologia que mais promete conquistas para o século 21. O genoma da *Xylella* será o quinto mais extenso já sequenciado completamente e o primeiro de um organismo causador de uma doença em plantas.

Os laboratórios paulistas reunidos neste importante esforço científico completam o trabalho antes do prazo previsto no cronograma, o que é excepcional, e não a regra em projetos genoma. E mesmo com imprevistos nos custos, mantiveram-se no limite do orçamento estabelecido. O DNA da bactéria causadora da Clorose Variegada de Citros é um terço maior do que o esperado; exigiu, por isso, a determinação de um número 30% maior de bases nitrogenadas. Até novembro, as duas principais revistas científicas haviam publicado 24 seqüências completas de genomas microbianos; assinam os *papers* que as apresentam – europeus, norte-americanos, japoneses. O fim do projeto da *Xylella fastidiosa* torna a rede Onsa o décimo quinto grupo de pesquisadores do mundo a se apropriar desta *expertise*. Um feito.

O começo do fim - “*What a wonderful question. I wish I knew. We have probably only two gaps now but lots of*

Andréa de Assis Souza, Andrew John George Simpson, Anita Wanjtal, Antônio Carlos Boschero, Antônio Carlos Maringoni, Antônio Nhani Jr., Ari José Scattone Ferreira, Arthur Gruber,

Artur Jordão de Magalhães Rosa, Augusto Etchegaray Jr., Carlos A. Colombo, Carlos F. M. Menck, Cássia Docena, Cássio da Silva Baptista, Catalina Romero Lopes, Celso Luiz Marino, Christian Claudino

Greggio, Cláudia de B. Bellato, Cláudia de Barros Monteiro-Vitorello, Cláudio M. Costa-Neto, Cristina Lacerda S. P. Silva, Cristina Miyaki, Dario Palmieri, David H. Moon, Dirce Maria Carraro

puzzles still. Lets say next month and hope. Andy.” Andy é Andrew John George Simpson, coordenador de DNA do projeto Genoma *Xylella fastidiosa*; as frases curtas da mensagem ecoam o tom inconfundível – irônico, risonho, bem humorado – com que este admirável pesquisador lidou com a “maravilhosa pergunta”, que ouviu incontáveis vezes: quando, afinal, terminaria o seqüenciamento da *Xylella*? Ao longo do último ano e meio, Simpson riu de si próprio nas várias vezes em que o prazo sobreveio, mas não a seqüência completa. “Vamos dizer no mês que vem”, previu no e-mail datado de 27 de setembro, “e ter esperança”.

Pois ali o cientista chegou bem perto da resposta certa: precisamente um mês depois, no dia 27 de outubro, uma pequena expedição integrada por ele próprio e por sua fiel escudeira Anamaria Camargo, do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, e Mariana de Oliveira, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), partiu de São Paulo rumo à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). De Piracicaba, veio Cláudia Monteiro-Vitorello, do Centro de Energia Nuclear para a Agricultura (Cena), da USP. Encontraram-se no laboratório de bioinformática, o centro nevrálgico da rede de pesquisadores constituída em dezembro de 97 para levar a cabo a tarefa de revelar a ordem dos (pensava-se então) 2 milhões de nucleotídeos que caracterizam o material genético da *Xylella*. João Setúbal e João Kitajima – o terceiro João do laboratório, que tem também João Meidanis – esperavam por eles. No dia anterior, a equipe de jovens doutoras, que permaneceu debruçada durante meses sobre 14 renitentes *gaps*, percebeu que talvez todas as peças do quebra-cabeça tivessem, finalmente, se encaixado.



MIGUEL BOYATAN

Andrew Simpson: entusiasmo na coordenação de DNA do projeto

Gaps, buracos, são interrupções da seqüência total do genoma que podem significar, por exemplo, que pedaços do cromossomo da bactéria ainda escapavam ao meticuloso trabalho dos pesquisadores. De fato, a estratégia inicial de seqüenciamento escolhida não cobria 9% das bases do material genético da bactéria. O grupo reuniu-se em Campinas para examinar as novas idéias com os Joões. A reunião marcou o começo do fim do *finishing* do projeto – a fase do seqüenciamento completo em que se busca preencher os *gaps* e aperfeiçoar a qualidade das seqüências obtidas.

“(…) *Andy e meninas vieram aqui e fizemos uns processamentos eletrônicos que aproximadamente confirmaram a hipótese de fechamento virtual. Mas nesse dia ainda faltavam pelo menos três confirmações de ligação, que apareceram nos dias subseqüentes, a última delas no dia 10 de novembro (...)*” O relato traz a marca da precisão de João Setúbal; mas, apesar do comedimento que fez dele uma das referências de equilíbrio dentro da rede Onsa, a notícia do fechamento virtual (mesmo sem as três confir-

mações) começou a correr já na manhã de 28 de outubro. Dizer que o genoma fechou virtualmente significa que os pesquisadores não têm mais dúvidas importantes sobre a ordem com que se apresentam os trechos de seqüências da molécula de DNA determinadas pelos laboratórios; além disso, quer dizer também que os pesquisadores já dispõem das evidências de que precisam para afirmar que todos os pedaços da molécula já estão de posse dos laboratórios de seqüenciamento.

Como João, houve outro no firmamento das lideranças do projeto que preferiu se manter cético. “(…) *Para mim trata-se apenas de uma hipótese. Estou tentando confirmá-la, pois a notícia foi dada pelo Simpson que (...) tem um otimismo tão irresponsável quanto o meu! Fiquei tão entusiasmado quanto incrível*”, escrevia na sexta, 29 de outubro, o físico José Fernando Perez – diretor científico da FAPESP e principal articulador de todo o Programa Genoma paulista. Mas, na véspera da reunião do comitê internacional que monitora e orienta os esforços brasileiros no

Pereira, Edson Kemper, Eduardo Formighieri, Edviges Maristela Pituco, Eiko Eurya Kuramae Izioka, Eliana G. de Macedo Lemos, Elizabeth A. L. Martins, Elza Maria Frias

Martins, Emmanuel Dias Neto, Eric D’Alessandro Bonaccorsi, Fabiana Kühne, Felipe Rodrigues da Silva, Fernando Augusto de Abreu, Fernando Ferreira Costa, Fernando Reinach,

Flávio Vieira Meirelles, Francisco G. da Nóbrega, Gilson Soares Baia, Gislayne F. L. Trindade Vilas Bôas, Gonçalo Guimarães Pereira, Guilherme Pimentel Telles, Gustavo de Faria

mundo da biologia molecular aplicada ao seqüenciamento, mesmo o ponderado Setúbal sorriu francamente e comemorou: às 17h46 da terça-feira, 9 de novembro, entrou no banco de dados da *Xylella* a leitura de 700 bases que fechou o último *gap*. Perez e Simpson foram avisados no dia seguinte. Era 10 de novembro, uma importante quarta-feira na vida da FAPESP.



João Meidanis (à esquerda) e João Setúbal: competência em bioinformática

A reunião com o Comitê: A notícia do fechamento virtual chegou ao comitê internacional que assessora o seqüenciamento do genoma da *Xylella* (*Steering Committee*) através do coordenador de DNA, antes que os três cientistas que o integram – Steve Oliver, da Universidade de Manchester; o belga André Goffeau, que coordenou o seqüenciamento completo do genoma da levedura, terminado em 1996; e o bioinformático John Sgouros, de Londres – desembarcassem no Brasil para a reunião do dia 11 de novembro.

Não foi dos encontros de maior quórum do comitê. Do meio do primeiro semestre de 99 para cá, a audiência a essas conversas públicas entre os pesquisadores brasileiros e os três *experts* internacionais diminuiu e transformou-se. A partir de março, a maior parte do trabalho de determinação da ordem das bases nitrogenadas já terminara; começou a predominar, nas reuniões, o debate sobre os problemas do *finishing* e da anotação – o trabalho de identificar e refletir sobre a função dos genes revelados pelo seqüenciamento. A mudança de fase fez mudar

também a audiência; apareceram caras novas, e muito jovens. No auditório do quarto andar do prédio da FAPESP, no Alto da Lapa, havia talvez 30 pessoas, as mais comprometidas com a finalização do projeto, quando os três do *Steering Committee*, ladeados por Simpson, Fernando Reinach (chefe do laboratório que produziu o maior número de bases) e João Setúbal desceram as escadas do anfiteatro.

Eletrizante: Respirava-se contentamento quando os trabalhos se iniciaram. Simpson abriu a reunião, historiou as várias etapas do projeto, elogiou e destacou o trabalho de alguns dos presentes – Jesus Ferro, de quem disse ter sido “magnífico”; Edson Kemper e André Luiz Vettore, do Centro de Biologia Molecular da Unicamp, elogiados pela persistência; e Anamaria Camargo, uma das mascotes do projeto (tem 26 anos), a quem atribuiu o *insight* que resultou no fechamento virtual do genoma.

João Setúbal falou em seguida. Retraçou os fatos dos dias anteriores; escreveu numa transparência os nomes das seis doutoras do fechamen-

to: Marilis do Valle Marques, Cláudia Monteiro-Vitorello, Ana Cláudia Rasera da Silva, Elizabeth Martins, Mariana de Oliveira e Anamaria. A estas, Simpson acrescentou o nome de Marie-Anne Van Sluys. Em seguida, Setúbal contou que o *read* salvador, aquele que preencheria o último *gap* dois dias antes, contendo uma seqüência que ainda não tinha aparecido nunca, veio do laboratório JJ: Jesus e

seus extraordinários colaboradores da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (Unesp), de Jaboticabal, “representaram o melhor espírito do projeto”, nas palavras de João, e receberam aplausos generosos dos colegas. Jesus produziu muito – não só seqüências. Empenhou-se em todas as outras tarefas – clonagem, bibliotecas, montagem –, com a diligência de seu bem orquestrado laboratório. Terminadas as merecidas comemorações, começaram as apresentações de resultados, que duraram todo o dia.

O parecer: No dia seguinte, o veterano André Goffeau transmitia alegria ao avaliar o encontro. Escolheu *smart* para qualificar as *well trained young ladies*. Admirou-se com o *good spirit* reinante; confidenciou que, no campo científico, os homens são um pouco paranóicos; e elogiou o coordenador de DNA por ter sempre ressaltado o crédito de cada um das (dos) participantes. O parecer assinado por ele, Oliver e Sgouros transpira entusiasmo:

“O Comitê impressionou-se muito com os progressos do projeto de seqüen-

Theodoro, Gustavo Henrique Goldman, Haiko Enok Sawazaki, Hamza Fahmi Ali El-Dorry, Haroldo Alves Pereira Jr., Helaine Carrer, Helena C. F. Oliveira, Héliana Maria dos Reis, Homero Pinto

Vallada Filho, Humberto Maciel França Madeira, Izaura Nobuko Toma, Jane Silveira Fraga, Jeanne Blanco De Molfetta, Jesus Aparecido Ferro, João Bosco Pesquero, João Carlos

Campanharo, João Carlos Setúbal, João Meidanis, João Paulo Kitajima, Joaquim A. Machado, Joaquim Mansano Garcia, Jomar Patrício Monteiro, José Eduardo Krieger, José Franco da Silveira,

ciamento do Genoma *Xylella* desde a última visita. Agora, está confiante de que o projeto terminará com êxito, dentro de um período muito curto de tempo (...)

1. A seqüência do genoma está virtualmente completa, graças às seguintes medidas:

a) uma volta ao uso extensivo de shotguns de clones de plasmídeos;

b) a delegação, a uma série de excelentes jovens cientistas, da responsabilidade de fechar um ou mais dos 14 gaps remanescentes da seqüência;

c) a construção de novas bibliotecas de fago-lambdas, por Edson Kemper e André Vettore, no laboratório de Paulo Arruda;

d) o reconhecimento, por Anamaria Camargo, do fato de que havia dois conjuntos de genes de r RNAs, e a elucidação da posição que ocupam um em relação ao outro.

2. Construiu-se um excelente espírito de grupo dentro da rede da *Xylella* como resultado de:

a) O modo entusiasmado, positivo e acolhedor com que Andrew Simpson exerceu seu papel de coordenador de DNA;

b) o excepcionalmente alto nível de competência profissional demonstrado pelos dois coordenadores de bioinformática, João Setúbal e João Meidanis, combinado com a disposição, sempre, de ajudar a resolver os problemas;

c) o compartilhamento não egoísta, entre o grupo de jovens e capazes cientistas brasileiros, das diferentes tarefas de seqüenciamento, construção de bibliotecas, mapeamento e fechamento de gaps;

Em geral, o Comitê considera que a decisão de estruturar a rede para seqüenciar o genoma tem funcionado em São Paulo ainda melhor

do que funcionou na Europa. A FAPESP deveria esforçar-se para assegurar que tudo de positivo que listamos acima seja incorporado a outros projetos genoma que ela venha a apoiar no futuro”.

O Comitê destaca, em seu relatório, também o trabalho de outros seis pesquisadores: Ari Scattone Ferreira (“a talented young graduate student by Hamza El-Doury”), Ronaldo Quaggio e Marilis do Valle Marques, todos do Instituto de Química da USP; Eiko Izioka, da Unesp de Botucatu; Cláudia Vitorello; e João Kitajima. O parecer estimava para o Natal a obtenção da seqüência do genoma completa e finalizada – quer dizer, completamente comprovada na bancada dos laboratórios, com a ordem das bases determinadas uma a uma e aceita pelos dois Joões – de *benign and helpful attitudes*, mas implacáveis com os critérios de qualidade. Pelo cronograma sugerido pelo Comitê, o *paper* – com a seqüência e todas as

descobertas sobre os genes encontrados nela, trabalho do grupo de anotação – deverá ser submetido à aprovação da revista *Nature* em março, para ser publicado em julho.

Pós-reunião: A aprovação efusiva do *Steering Committee* aos resultados injetou ainda mais vibração nos núcleos de *finishing* e anotação da rede Onsa. Um aliviado e exultante Andrew Simpson organizou logo o encontro dos que se concentraram no estudo dos genes responsáveis pela doença nos laranjais – que aconteceu na terceira semana de novembro. Houve resultados animadores, sobre os quais pesa o embargo de se manterem inéditos até a publicação. Meidanis, o coordenador da anotação, já está mais confiante – no dia da reunião do *Steering Committee*, mesmo com clima tão favorável, preocupava-se muito com o pouco tempo

Steve Oliver, John Sgouros e André Goffeau: São Paulo pode vir a dominar a análise genômica de patógenos de plantas



José Odair Pereira, Kelly Santos, Laurival Antônio Vilas Bôas, Lin Tzy Li, Luci Deise Navarro Cattapan, Lúcia M. Carareto Alves, Luciana Cezar de Cerqueira Leite, Luciane Prioli Ciapinaf,

Luciano Takeshi Kishi, Lucienne Medeiros, Luís Eduardo Aranha Camargo, Luís Eduardo Soares Netto, Luís Roberto Furlan, Luiz Lehmann Coutinho, Luiz R. Nunes, Luíza Carla Duarte,

Lyndel Meinhardt, Manoel Victor F. Lemos, Mara Lúcia Zucheran Silvestri, Marcelo Brocchi, Marcelo R. S. Briones, Márcia Heloísa Iquegami, Márcio de Castro Silva Filho, Márcio Rodrigues Lambais,

que resta para definir muito sobre os milhares de genes da *Xylella fastidiosa*.

Do lado da finalização de *gaps*, tudo corre melhor que o esperado. Um vento de felicidade varreu o muitas vezes tedioso e desanimador cotidiano dos últimos meses, enquanto as doutoras do fechamento preparavam persistentemente a hora em que todos os enigmas se encaixariam – o que aconteceu quando Anamaria percebeu “que eram dois os conjuntos de genes ribossômicos, e sua posição relativa”, como descreveu o parecer internacional.

“Estou me sentindo tão importante”, diz uma emocionada Cláudia, que descobriu dados sobre a história evolutiva da *Xylella*, também considerados notáveis pelo Comitê. “É mesmo um grande quebra-cabeça. Tenho certeza de que todos nós tínhamos que gostar de quebra-cabeça quando crianças”, lembra Elizabeth Martins, do Instituto Butantan, que se sente, agora, inserida na ciência do mundo. Na sexta-feira, dia 26 de novembro, José Fernando Perez acreditava num encurtamento do cronograma do *Steering Committee*. O texto do anúncio à imprensa deveria estar pronto já em dezembro.

Pós-genoma: “Impressiona o Comitê a combinação única de expertise que foi construída ao longo dos últimos dois anos. A rede explorou quase todas as estratégias de clonagem, mapeamento e seqüenciamento, assim como usou e desenvolveu quase todas as técnicas de bioinformática relacionadas com essas estratégias. Essa expertise acumulada não pode ser desperdiçada. Nós estamos convencidos de que São Paulo pode vir a dominar o campo da análise genômica de patógenos de plantas.”

O item seis do parecer do comitê internacional aponta para o futuro e traz à tona uma discussão que já vem sendo feita. Qual o melhor destino

Marco Antônio Zago, Marcos A. Gimenes, Marcos Antônio Machado, Marcos Macari, Marcos Oliveira, Marcos Renato Rodrigues Araújo, Maria Aparecida Nagai, Maria Florência Terenzi, Maria Helena de Souza

Jovens e talentosas cientistas

Durante meses, essas jovens doutoras debruçaram-se sobre 24 renitentes interrupções da seqüência total do genoma da *Xylella*, os chamados *gaps*, que paralisavam o projeto. Elas conseguiram fechar os *gaps*, permitindo a conclusão do seqüenciamento



Anamaria Camargo

FOTOS: MIGUEL BOYFAN



Cláudia Monteiro-Vitorello



Elizabeth Martins



Mariana de Oliveira



Marie-Anne Van Sluys



Marilis do Valle Marques



Ana Cláudia Rasera

Goldman, Maria Heloísa Tshako, Maria Inês Tiraboschi Ferro, Maria Júlia Gobbo Beretta, Maria Rita Passos-Bueno, Mariana C. de Oliveira, Mariângela Cristofani, Marie-Anne Van Sluys,

Marília Caixeta Franco, Marília Dias Vieira Braga, Marilis do Valle Marques, Mário Henrique de Barros, Marli de F. Fiore, Mayana Zatz, Nalvo Franco de Almeida Jr., Nirlei Aparecida Silva, Paula Azevedo



Jesus Ferro: empenho; Reinach: o primeiro a acreditar; Arruda: laboratório elogiado

FOTOS: MIGUEL BOYVAN

Simpson para conversar sobre o futuro da rede Onsa. O diretor científico da FAPESP está entusiasmado com o largo caminho que se abre à frente, inclusive na área de genoma estrutural. Sua confiança vem de avaliar outras aquisições que também brotaram da decisão de seqüenciar o genoma completo da *Xylella*. Trabalhar na fronteira do conhecimento, remeter-se a um problema específico, mobilizar a capacidade já instalada – tudo isso beneficiou

para a *expertise* e para a capacidade instalada da rede Onsa, que não se quer ociosa? Fernando Reinach, o primeiro a pensar na idéia de seqüenciar um genoma completo de bactéria e acreditar na sua factibilidade, quase três anos atrás, também enxerga na especialização em patógenos de plantas a vantagem comparativa de São Paulo – ainda mais porque o projeto *Xanthomonas citri*, que causa o cancro cítrico, deve oferecer a seqüência completa de seu genoma daqui a um ano e meio. Fernando e Jesus respondem por mais esta empreitada de seqüenciamento completo, outra parceria da FAPESP com o Fundecitrus, orçada em US\$ 5 milhões.

Como parte da rede Onsa enceta também o Genoma Cana, sob a coordenação de Paulo Arruda, acentua-se mais a ligação com o mundo da agricultura. Simpson concorda com a força da vertente agrícola; mas sua idéia passa pela criação de um grande centro de seqüenciamento, financiado inclusive por fontes privadas, atuante em outras duas áreas: projetos como a Cana e o Câncer, que querem descobrir genes, não fornecer seqüências completas; e estudos que aliem nossa biodiversidade às tecnologias de *ex-*

pertise da rede Onsa. “Dominamos uma atividade de valor comercial. Somos um dos líderes do mundo nesta área. O fato de haver tantas empresas no setor mostra que podemos ganhar dinheiro com isso”, diz ele.

O coordenador de DNA ressalta uma tendência importante para a discussão do futuro: o centro, afirma, estará na bioinformática. No cenário antevisto por Simpson, as idéias serão geradas *in silico*, no trabalho com programas de computador, nas consultas a bancos de dados internacionais, na comparação de informações. Experimentos na bancada virão depois, para validar *in vitro* os resultados. Mas reforçar a bioinformática é estimular a criação de novos centros, óu fortalecer um só? João Setúbal oscila entre as duas possibilidades e observa que elas não são excludentes.

Quanto a novos seqüenciamentos, porém, este politécnico não vacila: põe sua cruzinha num eucarioto (quer dizer, um organismo com célula nucleada) simples, com tamanho entre 10 e 50 milhões de pares de bases – há muito maiores dificuldades técnicas para a montagem de genomas assim.

O maior saldo: José Fernando Perez sentou-se há 15 dias com Reinach e

a biologia molecular no Estado, objetivo primeiro da decisão de montar a rede Onsa e enfrentar o primeiro seqüenciamento. Mas assinala outro impacto do projeto, talvez o maior de todos, resultado da estrutura em que foi concebido: a importância do trabalho cooperativo.

O fato de não participar diretamente das atividades da rede não tolda a fina sintonia do diretor: se houvesse uma enquete, 10 entre 10 pesquisadores perguntados concordariam com ele. Nas conversas de balanço, o destaque vai para a coesão entre os laboratórios, o exercício da amizade, da troca de experiências, a velocidade e o novo gosto que a colaboração intensa imprimiu ao trabalho. Parece que os cientistas de São Paulo se descobriram uns aos outros; descobriram, também, as delícias do convívio, do tititi no *site* da rede Onsa. A todos eles, especialmente a elas neste fechamento, *congratulations*.

E do diretor científico, fica um recado: “Vamos consolidar nossa liderança em patógenos, para dar novos saltos. Nos inserirmos em um contexto que exige ousadia e agressividade crescentes. E o futuro, mais que promissor, é exigente”.

Kageyama, Paulo Arruda, Paulo Inácio da Costa, Paulo Lee Ho, Regina L. Costa de Oliveira, Regina Yuri Hashimoto, Renata Guerra, Renato Alvarenga, Roberto Vicente Santelli, Ronaldo Quaggio, Sérgio Furtado

dos Reis, Sérgio Verjovski-Almeida, Silvana Bordin, Sílvia A. Lopes, Siu Mui Tsai, Suely Lopes Gomes, Suzelei de Castro França, Thiago Claudino Gréggio, Wagner Katsumi Okura, Vanderlei Rodrigues, Vânia

Fernandes, Vera Ferreira, Vicente Eugênio de Rosa Junior, Walter José Siqueira, Wanderley Dias da Silveira, Weber A. N. do Amaral, Wilson Araújo Silva Jr, Wilton J. R. Lima, Zanoni Dias