

Oliver Smithies

Para biólogo ganhador do Nobel, sucesso na carreira científica exige paixão pelo que se faz, muito trabalho e persistência diante dos maus resultados

MARILUCE MOURA

Oliver Smithies dividiu com Martin Evans e Mario Capecchi o Nobel de Fisiologia e Medicina de 2007 por sua “demonstração de que era possível alterar um gene através da introdução de um DNA exterior”. Sem dúvida dá para dizer isso de forma um pouco mais detalhada, ou seja, que esse cientista de 82 anos, hoje professor de patologia e medicina laboratorial na Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Norte, Estados Unidos, conquistou o prêmio junto com os dois colegas por ter desenvolvido um método para introduzir modificações genéticas específicas em camundongos usando células-tronco embrionárias, o que possibilitou a criação de animais geneticamente modificados, que funcionam como modelos experimentais de doenças.

A explicação mais simples e sintética, entretanto, foi oferecida pelo próprio Smithies a um público em grande parte leigo, que o ouvia fascinado no final de uma manhã ensolarada no domingo, 12 de março. O local do encontro era o auditório do recém-reformado Pavilhão Armando Arruda Pereira, um dos prédios projetados por Oscar Niemeyer no Parque do Ibirapuera em São Paulo. E já se aproximava das 13 horas quando o bem-humorado pesquisador exortou seus mais jovens ouvintes a escolherem uma área da qual gostassem apaixonadamente, a trabalharem muito, inclusive domingos e feriados, e a serem persistentes, se quisessem ter de fato sucesso na carreira científica.

Entre a palestra que preparara, “A experiência de ser geneticista durante 60 anos”, e as respostas às perguntas do público, o professor

Oliver Smithies falara por quase duas horas sobre os momentos mais marcantes de sua trajetória científica, seus métodos de pesquisa, os grandes desafios que enfrentara, os equipamentos que inventou, e ainda fez breves referências a aspectos mais pessoais de sua vida. Era como se virasse páginas de seus cadernos de anotações, comparou, e de fato ele apresentou algumas essenciais, como a que resumia os dados do trabalho que levou até o Nobel. Mostrou no final uma foto sua em frente a um pequeno avião – pilotá-lo é seu grande *hobby* – e uma outra de sua mulher, a cientista Nobuyo Maeda, muitos anos mais jovem do que ele, depois de dizer que “um sábado perfeito inclui pilotar o avião, almoçar com a mulher e, à tarde, trabalhar no laboratório”.

O ponto de partida da fala de Smithies foram as três diferentes formas pelas quais, em sua visão, ocorrem as descobertas científicas: por acidente, oportunidade ou planejamento. “Às vezes, descobre-se algo acidentalmente. Isso ocorre frequentemente em ciência. Ao se fazer essa descoberta, surge a oportunidade para outras, decorrentes do acidente que propiciou a primeira. Por fim, embora raramente, se consegue fazer algo que foi planejado.” O pesquisador mostrou alguns exemplos dessas situações em seu trabalho, começando por apresentar sua tese de doutorado, publicada em 1952. “Fiquei muito orgulhoso dela. Vejam que minhas experiências são bastante precisas. Mas ninguém jamais utilizou o método que inventei. Eu não o utilizei. Provavelmente, ninguém leu o texto, o que acontece frequentemente, mas aprendi a fazer boa ciência.”

O pós-doutoramento, “etapa seguinte da vida de um cientista”, Smithies passou em um laboratório na Universidade de Wisconsin, onde ficou por dois anos trabalhando na aplicação de quatro métodos para analisar proteínas. O artigo relativo a essa experiência, ele diz, tampouco foi lido ou utilizado por alguém. Ele não relatava ali nenhuma descoberta, entretanto aprendeu, “assim, a fazer boa ciência”. E alguns fundamentos dos métodos que experimentava serviram, em 1972, quer dizer, quase 20 anos mais tarde, para Warren Gilson inventar

uma pipeta de precisão que o tornou milionário.

Pouco tempo depois viria uma descoberta acidental em filtração molecular. “Aqui está a primeira página de um de meus cadernos, com anotações a lápis. Vejam a data, era 1º de janeiro. Vocês não podem dormir, devem trabalhar”, insistiu Smithies. Ele estava enfrentando problemas com medições de uma proteína (“vejam como ela se parece com um tapete sendo desenrolado”), e lá para as tantas decidiu se valer de um método que alguns pesquisadores tinham criado com amido em pó, e que permitia à proteína se movimentar pela água em torno dos grãos. “Mas era muito difícil determinar até onde a proteína tinha se deslocado. Havia que fatiar o amido, separá-lo em muitas fatias para medir em cada uma delas a quantidade de proteína”, explicou. As vivências extra-acadêmicas o ajudaram a encontrar um caminho: “Lembro-me de ajudar minha mãe a lavar roupas quando criança. Antes de lavar peças coloridas, ela cozinhava o amido e preparava uma substância que todos vocês devem conhecer: goma. Depois de preparada, essa goma tinha consistência de gel. Pensei que poderia cozinhar o amido para preparar um gel que poderia ser tingido, e assim não teríamos o trabalho de fazer essas 50 fatias”, disse. Foi exatamente essa experiência que Smithies fez, ele contou enquanto exibia imagens da proteína que se movimentava numa finíssima faixa ou banda. Ele fizera um grande avanço, “mas algo inesperado aconteceu”. Ocorre que é necessária uma grande quantidade de amido para transformá-lo em gel e, dessa forma, o produto terminava ficando muito denso. Um dos resultados disso foi que as moléculas pequenas passaram a se mover rapidamente, enquanto as maiores se moviam mais lentamente, e as proteínas que ele estava pesquisando separaram-se de acordo com seu tamanho. “Acidentalmente, inventei a peneira molecular por eletroforese”, Smithies resumiu em meio a um largo sorriso.

Recombinação não-homóloga

Um dia – era março de 1954 –, ele abandonou o estudo que vinha conduzindo com aquela proteína e

decidiu usar o mesmo procedimento para analisar uma amostra de seu próprio sangue. Conseguiu identificar 11 bandas distintas na amostra de sangue. Os métodos disponíveis até então permitiam identificar só cinco bandas. “Compreendi que meu método era bom. Passei a estudar proteínas sangüíneas, já que eu sabia que havia descoberto algo inédito.” Smithies mostrou à platéia imagens das proteínas sangüíneas de dois amigos – e suas fotos – para que se observasse a similaridade dos padrões obtidos. Amostras de outras pessoas, incluindo uma mulher, foram analisadas e, observando os resultados, ele imaginou que deparara com uma importante diferença entre homens e mulheres. Tanto que durante alguns dias testou diariamente amostras deles e delas. Aparentemente foi um tiro n’água: não havia diferença no sangue de homens e mulheres. No entanto, Smithies chegara no final de 1954 à conclusão de que a diferença estava na genética, “isto é, tratava-se de uma diferença herdada”, um achado científico importante. Continuou nessa linha de trabalho junto com Norma Ford-Walker ao longo de 1955 e concluíram que o padrão mais simples encontrado indicava que havia duas cópias do gene 1, o mais complexo, duas cópias do gene 2, enquanto o padrão misto indicava que havia uma cópia de cada um dos genes. “Entendemos bastantes aspectos dessa diferença”, ele disse.

A próxima etapa era descobrir as diferenças herdadas em proteínas do plasma – e qualquer bom achado aí estaria no âmbito daquelas descobertas que resultam de uma oportunidade. Smithies juntou-se a George Connel e Gordon Dixon em 1961 e primeiro trataram de simplificar o padrão complexo. “Não vou entrar em detalhes porque isso envolve muita química, mas tivemos que usar uma substância com péssimo odor”, ele contou. Era beta-mercaptoetanol. Espirituoso, o pesquisador lembrou que deixou cair um frasco com a substância sobre seus sapatos – um desastre para quem só tinha dois pares. “Eu os coloquei na janela para que o cheiro saísse e, após uma semana, resolvi calçá-los. Tive que ir à delegacia de polícia para resolver um assunto e

Smithies com João Bosco Pesquero; no estádio do Morumbi, com a camisa do Corinthians; e durante entrevista



Anotações
que levaram
ao Nobel

13

Thurs. April 22nd

Assay for gene placement

Aim: to place corrective DNA in the right place.
Need: an assay for developing techniques.
Proposal:

Can accept non-linear → Duplication → Elimination → Gene

Transform human TK⁻ cells
a large # of transformants
Prepare DNA from TK⁺ cells
Cut with rest. enz → size to
clone in an amber phage
Plate a su^o screen with phage probe
Vary (T0)_n or single stranded ends or ur
or BUdR etc. to try to ↑ # clones
Can also treat recipient cells
as found - with agents to ↑ SCE etc.

lá duas senhoras conversavam. De repente uma delas disse: ‘Você está sentindo esse cheiro?’, e a outra respondeu: ‘Sim, sim! Você acha que é um cadáver?’. Deixei meus sapatos na janela mais um tempo, depois continuei a usá-los.”

Foi usando essa substância malcheirosa que os pesquisadores puderam mostrar que a diferença genética que haviam descoberto era mais simples do que parecia. Entretanto, descobriram também que havia três, e não só dois genes implicados na questão que investigavam. “Fizemos achados interessantes, ainda que não pudéssemos compreender nossos resultados”, disse Smithies, deixando claro o quanto é freqüente no processo da pesquisa científica esse não-saber o que se tem em mãos. Entretanto, as coisas avançam também por entre o desconhecimento. “Um dia, repentinamente, descobri o que havia acontecido. Percebi que os dois genes da haptoglobina com que trabalhávamos de algum modo se uniram e formaram um gene mais longo. É o que chamamos de recombinação.” E nesse ponto ele chamou a atenção para algo que teria relação no futuro com o Prêmio Nobel que iria conquistar: o que haviam observado era uma recombinação não-homóloga – assim eles a nomearam –, dado que os dois genes haviam se unido por locais diferentes. Àquela altura, bastante satisfeitos com seus resultados, os três decidiram

ir ao Segundo Congresso Internacional de Genética Humana, que aconteceria em Roma de 6 a 12 de setembro de 1961, e lá apresentar o trabalho “Genetic and chemical aspects of the haptoglobins” e falar de suas hipóteses. Tinham concordado em fazer um teste antes para determinar o tamanho das proteínas, imaginando que seriam menores nos genes menores e maior no G2, que era maior, e não observaram nenhuma diferença. Ainda assim decidiram “fazer algo que os cientistas fazem com certa freqüência”, ou seja, expor os resultados, a hipótese, a idéia de que os dois genes estavam unidos fazendo um gene maior, comentar os resultados dos testes que indicavam que eles não eram diferentes e finalmente dizer que não acreditavam nos resultados. “Acreditávamos que os resultados é que estavam errados, não nós”, Smithies disse com graça, expondo um pouco mais as mal conhecidas entranhas do fazer científico.

Moscas e homologia

Eles fizeram exatamente o planejado em Roma e Smithies assegurou que trabalharia em um modo de evidenciar as tais diferenças no tamanho das proteínas. Em 8 de outubro, considerando a hipótese de que num gel mais concentrado as duas moléculas menores iriam aumentar a velocidade e se movimentariam ambas da mesma forma, enquanto

a molécula maior se movimentaria de forma diferente, mais lentamente, ele traçou um diagrama do resultado que esperava encontrar. Na manhã seguinte, seu resultado era exatamente o previsto. “Meu novo método mostrou que estávamos corretos e consequentemente descobri por que o outro estava errado. Então entendemos o que estava acontecendo e qual era o processo para não ter as proteínas colando umas nas outras.”

Oliver Smithies lembrou a essa altura que fazia parte do departamento de genética da Universidade de Wisconsin. E o chefe do departamento lhe falou sobre um trabalho com moscas-das-frutas. Os pesquisadores que se dedicavam a experiências genéticas com elas trabalhavam há cerca de 20 anos para solucionar o seguinte problema: descobrira-se uma mutação que alterava o formato dos olhos da mosca, do oval para uma forma de barras, fenômeno que foi chamado de *bar mutation*. Mais tarde, outro pesquisador descobriu que algumas das moscas que tinham olhos estranhos eventualmente melhoravam, pois tinham filhotes de olhos normais, e outras pioravam. Isso ocorria repetidamente pelo seguinte: olhando-se para o cromossomo da mosca vê-se em determinado ponto que as normais têm duas bandas, as de olhos estranhos quatro e as que têm os olhos ainda piores têm seis bandas, e pode ocorrer uma variação de duas para até seis bandas e vice-versa, num fenômeno previsível. Mas o fenômeno a que Smithies quer chegar com esse relato é o da recombinação homóloga e ele se vale do movimento de unir as mãos pelas palmas, com diferentes posições dos dedos, para dar uma idéia ao público: “Vejam, ao tentar unir os genes que tenho em minha mão direita com os que tenho em minha mão esquerda, vocês podem observar que de determinada forma eles não combinam, numa segunda forma também não, mas agora combinam. Isso é o que chamamos de homologia. Quando isso ocorre, tem-se algo previsível”. Os pesquisadores passaram a compreender, ele disse, que havia algo que podiam prever muito bem, ou seja, a ocorrência da recombinação

homóloga. “Conseguimos observar nas amostras que alguns indivíduos possuíam a mesma proteína duplicada e entendemos a diferença.”

A conclusão mais importante foi a de que se poderia utilizar essa previsibilidade, a recombinação homóloga, para alterar um gene. E daí surgiu a pergunta crucial: qual gene escolher para pesquisar isso? Oliver Smithies se detém em algumas considerações sobre a anemia falciforme, uma condição em que as hemácias apresentam formas diferentes e que ocorre especialmente em afrodescendentes na África, devido a uma mutação no gene que produz a hemoglobina. “É interessante notar que tal mutação serve como uma proteção contra a malária, que causa milhões de mortes todos os anos. Dessa forma, a frequência de ocorrência do gene da anemia falciforme nessa população aumenta bastante, pois os indivíduos que o têm estão protegidos, sobrevivem, enquanto os outros morrem.” Mas há uma penalidade: quando existem duas cópias do gene, há um resultado negativo, que são essas células deformadas, descoberta feita em 1910.

Aprendido o isolamento de genes do DNA e o seqüenciamento de genes, os pesquisadores descobriram que a diferença entre a hemoglobina normal e a da anemia falciforme estava na mudança de uma única letra. E a questão que Smithies se propôs foi: “Se a alteração de uma única letra faz a diferença entre um gene normal e um que pode causar problemas, não seria interessante fazer a troca do gene defeituoso por uma cópia correta?” Foi aí que ele teve a idéia de corrigir o gene por meio do que hoje se chama *targeting* (direcionamento). “Aqui temos o gene errado, com a letra errada, e aqui temos uma parte do gene correto. Se aproximarmos o gene correto, ele pode identificar o local exato para se unir. É o que chamamos cruzamento de homólogos”, ele ilustra com as mãos, antes de exibir suas anotações da época. Oliver Smithies acreditava que se pudesse provocar o cruzamento homólogo conseguiria de fato corrigir o gene errado.

Ele mostra suas anotações numa página de 1982 e em outra de 1985, na verdade as páginas cruciais para

a conquista do Nobel. “Aqui havia uma idéia, e eu sabia como testá-la”, ele diz. “Minha idéia era a seguinte: retirar o gene bom de uma célula normal e inseri-lo em uma célula com o gene errado, observando se poderia alterá-lo. Precisaria colocar algo no DNA entrante que não estivesse presente no local de inserção, um fragmento recombinante. Se os dois se juntassem, teríamos a recombinação homóloga. Eu conseguiria fazer o direcionamento dos genes se conseguisse descobrir em que parte da seqüência os dois se combinavam.” Foi exatamente o que ele tentou nos três anos seguintes, ou seja, de 1982 a 1985.

Persistência e vitória

O primeiro experimento não deu certo. Foi num 23 de junho, “dia de meu aniversário”, Smithies comenta. Para continuar o trabalho ele inventou junto com seus colaboradores novos equipamentos. Ainda estava procurando o fragmento recombinante. “Havia um gene que nos ajudaria a realizar a experiência. Tínhamos que usar células com o

gene betaglobina, e era muito difícil penetrar neles. Para que fosse possível inserir o DNA era necessário pulsos de alta voltagem. As células eram colocadas em uma pequena câmara onde se fazia a passagem de corrente elétrica para abrir pequenos buracos na superfície da célula, e assim fazer penetrar o DNA.” Se hoje compram-se facilmente os equipamentos para esse gênero de experiência, naquele momento havia que fabricá-los. Smithies exibe uma foto de seu equipamento, cuja base era uma banheira para bebê, a que se juntam um suporte para pequenos tubos e alguns dispositivos eletrônicos comprados em lojas especializadas.

A experiência funcionou. Uma página de caderno atesta o primeiro momento no qual Smithies e sua equipe conseguiram dois resultados positivos. Depois, ao tentar repetir a experiência, ela não deu resultado. Isso aconteceu mais uma vez. “Deveria existir algo diferente nessas duas experiências comparando-as com as que havíamos feito anteriormente e há uma pequena anotação



no pé da página indicando isso”, ele diz, e imediatamente recomenda: “Como cientistas, vocês devem fazer boas anotações, pois pode haver um momento em que estejam repetindo uma experiência sem resultados e então será necessário procurar o que está sendo feito de modo diferente”. Eles continuaram com a experiência e terminaram obtendo o resultado esperado.

“Com os resultados corretos, deveríamos encontrar algumas células em que o DNA tivesse um comprimento de 8 mil bases. Com os resultados incorretos, o comprimento seria de 11 mil bases”, Smithies explica e mostra a página de 1985. “Levamos três anos entre a primeira página e esta página, que é a que explica por que eu recebi o Prêmio Nobel, pois pude demonstrar que era possível alterar um gene através da introdução de um DNA exterior.”

Oliver Smithies fala em seguida sobre a percepção de que a técnica deveria ser utilizada para outros fins que não a terapia genética, porque nesse âmbito era pouco eficiente e muito complicada. É nesse momento que começa a se articular sua pesquisa com os trabalhos das células-tronco embrionárias descobertas por Martin Evans e Matt Kaufman em 1981. “Ele descobriu que ao se fertilizar um óvulo – de rato neste caso, mas isso ocorreria da mesma forma com humanos – e deixá-lo crescer, essa célula primeiramente se divide em duas, depois em oito, 16 e continua a aumentar em número. Então elas começam a sofrer alterações.” A maior parte das células permanece em uma estrutura que se parece com uma bola de tênis oca. Essas células embrionárias, ao serem retiradas do embrião e colocadas em uma placa de cultura com algo que possa nutri-las, formam pequenas colônias. “Essa foi a descoberta de Evans com seus estudantes e ele demonstrou que, com aquelas células, era possível criar um novo rato.”

Smithies explicou que se as células forem retiradas da placa de cultura e, em seguida, implantadas nos blastos de um outro animal e, depois, recolocadas no animal como em uma fertilização *in vitro*, este animal produzirá filhotes a

partir dessas células. Tais filhotes serão “misturados”, uma parte dos genes virá daqui e a outra parte virá da célula injetada. “Temos, então, ratos criados a partir dessas células-tronco.” Dessa forma, é possível alterar os genes dessas células e criar ratos geneticamente modificados. Martin, segundo Smithies, levou suas células dentro de um tubo de ensaio no bolso, em novembro de 1985. “Passamos a utilizar essas células para provocar mutações nos ratos. Não entrarei em detalhes, mas gostaria de dizer que, para tanto, tivemos de inventar novos equipamentos, inclusive de PCR (reação em cadeia da polimerase)”, ele relatou.

Um dos primeiros modelos que eles criaram foi o da fibrose cística. Depois, ratos com aterosclerose, “que mata cerca de um terço das pessoas nas sociedades modernas”.

Smithies continuou seus estudos pesquisando pressão arterial e vieram os modelos hipertensos.

Ele chega ao final, conservando a imagem das muitas páginas percorridas. “O que há na próxima página? Eu não sei, e é isso que torna a ciência algo tão excitante.” Encerra lendo uma frase escrita por seu professor Sandy Ogston em um de seus artigos: “Porque a ciência não é somente a procura pela verdade, não é somente um jogo desafiador, ou uma profissão. Ela é uma vida levada por diversas pessoas, coletivamente, como em uma escola onde se aprende a viver em sociedade, da forma mais coletiva possível, onde somos membros uns dos outros”. Acrescenta: “Essa foi sua mensagem para mim como um jovem cientista, e essa é a mensagem que deixo para vocês, como um velho cientista”. ■

Jan Hoeijmakers

Geneticista holandês apresenta as bases moleculares do envelhecimento e os camundongos mutantes que criou para entender melhor a senilidade prematura

CARLOS FIORAVANTI

Jan Hoeijmakers não se contenta com o fato de a longevidade da espécie humana, nos últimos mil anos, ter aumentado o equivalente a 15 minutos a mais a cada hora vivida. “Mais importante do que acrescentar mais anos à vida é acrescentar mais vida aos nossos anos”, comentou o geneticista holandês durante a palestra “Envelhecimento e longevidade: quanto duram nossos genes?”, apresentada no dia 18 de maio no Parque do Ibirapuera, em São Paulo, dentro da programação cultural da exposição *Revolução genômica*. Envelhecer, lembrou ele, ainda implica a sujeição a doenças de controle árduo, quando não impossível, como osteoporose, diabetes ou Alzheimer.

Hoeijmakers persegue o ideal de um envelhecimento mais saudável aprofundando-se com sua equipe de biólogos da Universidade Erasmus, em Roterdã, na Holanda, na área em que ele é uma das maiores autoridades mundiais: o reparo da molécula de DNA, realizado por um orquestrado conjunto de proteínas incumbidas de um saneamento contínuo, já que todo dia o DNA de cada célula sofre em média 50 mil lesões, causadas por radiação solar, por compostos químicos ou pela simples colisão com outras moléculas. Quando os guardiões do DNA não conseguem mais segurar as pontas, o organismo perde o passo habitual e instaura-se um caos que poderá tanto permitir o desen-