

O propósito deste projeto é identificar e analisar molecularmente os genes relacionados com a virulência da *X. fastidiosa*. Normalmente, genes são identificados por meio da análise do DNA ou RNA. Planeja-se então usar um procedimento reverso, ou seja, analisar primeiramente, por meio de gel 2-D, as proteínas resultantes dos genes bacterianos expressos durante a interação pera-*X. fastidiosa*. Algumas dessas proteínas podem estar envolvidas na incidência da clorose variegada de citros (CVC). Uma vez obtidas, elas terão o N^o-terminal sequenciado e a resultante sequência de aminoácidos permitirá localizar os correspondentes genes no banco de dados da *Xylella*. Depois, esses fragmentos de DNA serão subclonados e analisados para se verificar suas funções e desenvolver mecanismos de controle à CVC.

247 Análise genômica funcional e comparativa em *Leishmania* spp.

Luiz Ricardo Orsini Tosi
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 1998/09805-0
Vigência: 1/12/1998 a 29/2/2004

A obtenção da sequência do genoma de vários organismos vem enfatizar a necessidade da análise funcional de genes desconhecidos. O objetivo deste projeto é o uso do sistema Mariner de transposição *in vitro* na identificação de genes do parasita *Leishmania major*. Transposons contendo um gene-repórter serão inseridos aleatoriamente em bibliotecas genômicas cromossomo-específicas possibilitando a expressão de proteínas de fusão. A caracterização funcional será feita com base na sequência desses genes e na localização subcelular de seus produtos. A expressão desses genes será acessada por RT-PCR, usando-se como molde mRNAs de diferentes fases do ciclo de vida de diferentes espécies do parasita.

248 Estudo da evolução das *Attini* derivadas e isolamento dos seus fungos simbioses

Mauricio Bacci Junior
Instituto de Biociências de Rio Claro
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Processo 1997/13383-0
Vigência: 1/4/1998 a 31/3/2002

Serão isolados fungos simbioses e coletadas amostras de DNA de dez espécies de *Attini* derivadas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* de diversas regiões do país. Sequências de regiões codificadoras nucleares (ITS2 e rRNAs ribossômicos 5,8S e 28S) e mitocondriais (citocromo-oxidase II) serão utilizadas para a reconstituição da história evolutiva das formigas, utilizando como raiz sequências obtidas de

formigas primitivas dos gêneros *Apterostigma*, *Mycetarotes* e *Mycocepurus*.

249 Microssatélites como marcadores genéticos no amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) e em espécies silvestres relacionadas

Marcos Aparecido Gimenes
Instituto de Biociências de Botucatu
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Processo 1997/13127-4
Vigência: 1/10/1998 a 30/6/2003

O gênero *Arachis* é composto de nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Trierectoides*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Triseminatae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes* e *Rhizomatosae*). A seção *Arachis* é a mais importante do gênero, porque contém o maior número de espécies (27) e o amendoim cultivado, *A. hypogaea* (alotetraploide – AABB). Esta espécie é muito importante na América Latina e África, onde tem sido cultivada para consumo direto e produção de óleo, e onde se sabe que a carência de proteínas na dieta é grande. Os programas de melhoramento de *A. hypogaea* têm conduzido a ganhos genéticos significativos. No entanto, estes poderiam ser maiores, ou alcançados mais rapidamente, caso as espécies selvagens relacionadas fossem utilizadas mais eficientemente, pois estas possuem várias características agrônomicas de interesse, principalmente resistência a doenças que afetam *A. hypogaea*. Outro fator que auxiliaria no melhoramento de *A. hypogaea* seria a detecção de polimorfismo nesta espécie, uma vez que baixa variabilidade tem sido detectada na mesma utilizando-se vários marcadores (proteínas de reserva, isoenzimas, Rapd, RFLP), o que, conseqüentemente, reduz a possibilidade de seleção assistida por marcadores. Microssatélites têm demonstrado ser mais eficientes que os demais marcadores moleculares na detecção de polimorfismo e para a análise das relações e variação genéticas em várias espécies de plantas e ainda não foram testados em *A. hypogaea* e espécies relacionadas. Por conseqüente, os objetivos deste trabalho serão a avaliação de microssatélites na detecção de polimorfismo em *Arachis hypogaea*, utilização destes na análise das relações entre o amendoim cultivado e espécies diploides da seção *Arachis*, bem como a análise da variabilidade genética dentro e entre os acessos dessas espécies.

250 Pesquisa da etiologia genética da perda fetal no primeiro trimestre de gestação

Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini
Faculdade de Ciências de Bauru

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
 Processo 1997/06292-9
 Vigência: 1/3/1998 a 31/5/2002

Estima-se que, aproximadamente, 50% dos fetos abortados espontaneamente durante o primeiro trimestre de formação apresentem malformações. A etiologia mais comum é genética, mais especificamente citogenética, envolvendo cromossomopatias. Estas originam-se de erros na gametogênese ou podem ser herdadas dos pais. Ambas as situações envolvem risco de recorrência para novos abortamentos ou para nascimento de concepto anormal. Nos casos em que o exame citogenético do feto abortado é normal, devem ser consideradas outras causas, como, por exemplo, mutações gênicas. O exame clínico dos pais e de outros filhos do casal deve ser realizado para investigação de sinais clínicos que podem indicar espectro fenotípico de síndromes. Agentes teratogênicos também podem fazer parte da etiologia da perda fetal. Portanto, a exposição a fatores físicos, químicos e biológicos durante o período da embriogênese deve ser investigada. O objetivo deste trabalho é detectar causas genéticas da perda fetal durante o primeiro trimestre de formação, uma vez que é durante esse período que a perda fetal é mais frequente. Anomalias genéticas graves impedem o desenvolvimento do concepto, culminando em aborto espontâneo precoce. A pesquisa envolverá a análise citogenética de tecido fetal proveniente de vilosidades coriônicas. Esse material será obtido de pacientes do Hospital Maternidade Santa Isabel que forem internadas por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) devido a processo de abortamento espontâneo de primeiro trimestre e que tiverem interesse em participar do projeto. Resultados que revelarem anomalias cromossômicas estruturais indicarão exame citogenético de sangue periférico dos pais. Todas as avaliações citogenéticas (tecido fetal e sangue) envolverão técnicas convencionais, de bandamento C, G, NOR e de alta resolução. Casos que gerarem dúvidas quanto à anomalia cromossômica estrutural serão enviados para outros centros de pesquisa nos quais já haja estabelecimento de métodos mais sofisticados, como a de hibridização *in situ* (Fish). Todos os casais receberão aconselhamento genético que informará sobre diagnóstico, prognóstico e riscos de recorrência de novos abortamentos ou de nascimento de criança malformada. Trabalhos com esse enfoque são muito escassos no Brasil, as referências que se têm são, em sua grande maioria, de pesquisas internacionais. O conhecimento sobre a etiologia da perda fetal é extremamente limitado e os aspectos genéticos são negligenciados devido, principalmente, à falta de informação da classe médica.

251

Desenvolvimento e avaliação de novos vetores para terapia gênica do câncer e doenças degenerativas

Sérgio Ulhoa Dani
 Centro de Terapia Gênica
 Associação dos Amigos dos Portadores
 de Distrofia Muscular (AADM)
 Processo 1997/06229-5
 Vigência: 1/1/1998 a 31/3/2002

Novos vetores de transferência gênica, incorporando as regiões ITR do genoma do vírus adeno-associado, encapsulados em lipossomos, e vetores plasmidiais, encapsulados em mitocôndrias, serão desenvolvidos, para se estudar a eficiência da transferência gênica, a estabilidade dos transgenes e o seu efeito sobre a expressão gênica global em modelos de reposição gênica nuclear (genes p53, p21, kai1 e gene da distrofina) e citoplasmática (reposição de DNA mitocondrial e do gene-repórter LacZ no citoplasma por meio da administração de DNA encapsulado em mitocôndrias ao cérebro, músculo-esqueleto e células neoplásicas), e em um modelo de marcação gênica usando os genes HSV-tk e neoR.

252

Mecanismos envolvidos na gênese dos rearranjos do DNA mitocondrial

Célia Harumi Tengan
 Escola Paulista de Medicina
 Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)
 Processo 1997/06160-5
 Vigência: 1/10/1997 a 30/11/2001

A principal alteração detectada em pacientes com uma doença mitocondrial é a deleção do DNAm_t. A gênese desse rearranjo ainda não está esclarecida. Acredita-se que seja originada de recombinação anômala durante a replicação, favorecida por repetições diretas ou outras alterações, como sequências palindrômicas, genes de RNAt, alterações conformacionais por alta tensão helicoidal e radicais livres. Devido ao aparecimento de dois rearranjos (duplicação e deleção) num mesmo paciente, foi sugerido que o DNAm_t duplicado seria um precursor do DNAm_t deletado. No entanto, a real frequência da duplicação em pacientes com deleção do DNAm_t ainda não está definida. As deleções podem ser encontradas, também, no envelhecimento normal, e sugere-se que seu aparecimento esteja relacionado à lesão por radicais livres provenientes da cadeia respiratória mitocondrial. Porém, em estudo anterior, verificou-se que pacientes com deficiência na cadeia respiratória, que teoricamente geraria mais radicais livres, não acumulam essa deleção de forma mais acelerada. O objetivo deste projeto é tentar elucidar os mecanismos envolvidos na gênese dos rearranjos do DNAm_t. Na primeira parte do trabalho, será analisada a presença de duplicação em pacientes com deleções do DNAm_t por meio de *Southern blotting* e sequenciamento, e será realizada correlação genotípico-fenotípica. Na se-