

O PROJETO GENOMA HUMANO

Maria Rita Passos Bueno

Professora Assistente do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - SP

O Projeto Genoma Humano (PGH), com uma precisão de durabilidade de 15 anos, iniciou-se formalmente nos Estados Unidos em 1990. Em seguida, vários outros países, incluindo o Brasil, passaram a participar desse projeto. Seus objetivos básicos são o mapeamento dos genes humanos e o seqüenciamento de todo o nosso genoma. O PGH tem se desenvolvido muito rapidamente e algumas das metas propostas, como o mapa genético de marcadores, já foram atingidas. Igualmente, estão sendo observados os efeitos dos novos conhecimentos adquiridos pelo PGH no diagnóstico de doenças genéticas, bem como na identificação de novos genes.

UNITERMOS - Projeto Genoma Humano, mapeamento genético, seqüenciamento genético

Introdução

O desenvolvimento embrionário e a formação de um ser humano são controlados pelos genes. O nosso material genético (o ácido desoxirribonucléico - DNA), contido nos 23 pares de cromossomos em cada uma das células, é muito complexo. O comprimento físico do DNA contido em uma célula é muito grande: teoricamente, se colocássemos as moléculas de DNA alinhadas elas formariam uma corrente de cerca de um metro de comprimento (1). A quantidade de informação codificada no genoma é ainda mais surpreendente. O número de genes nas células, o que codificam e como ocorre a regulação entre eles próprios é, como um todo, uma grande incógnita. Estima-se que o genoma humano tenha 3 bilhões de pares de bases, o que equivale a 750 megabytes de um disco de computador (2). Há, aparentemente, 50 mil a 100 mil genes estruturais, isto é, genes que codificam alguma proteína. Em média, os genes têm de 1.000 a 200.000 bases (ou 200kb); contudo, há genes muito grandes, como o da distrofina, com mais de 2 milhões de bases. As regiões que codificam proteínas representam uma pequena porção do genoma total. Alguns estudos sugerem que menos de 10% do DNA humano corresponde a estas seqüências. O restante do material genético tem função ainda desconhecida (1). Contudo, nestes últimos anos tem-se demonstrado que estas seqüências podem interferir na regulação dos genes (3). Essas observações, além de nos mostrarem a complexidade do genoma, indicam a dificuldade de tentar desvendá-lo.

Conhecer e compreender os nossos genes é uma etapa primordial para o tratamento de doenças que, primariamente e mesmo secundariamente, sejam decorrentes de alterações genéticas. Dentre essas, merecem ser citadas as diferentes formas de câncer, que geralmente são resultantes da desregulação da divisão celular. Essa questão de como identificar todos os genes e qual a função por eles desenvolvida é bastante antiga. Contudo, em meados da década de 80, alguns pesquisadores começaram a discutir idéias para respondê-la. Em 1986, é mencionada pela primeira vez, publicamente, a idéia de se seqüenciar todo o genoma: Dulbecco sugeriu que se fosse realizado o seqüenciamento do genoma humano, bem como a identificação de todos os genes estruturais, poder-se-ia acelerar a compreensão dos mecanismos responsáveis pelo câncer (4). Independentemente, já havia sido discutida a possibilidade de analisar o DNA com o propósito de detectar mutações (alteração do DNA) entre os sobreviventes da bomba atômica (5). Logo após esta proposta, surgiu o conceito de um programa para estudar o genoma humano por meio do seu seqüenciamento (6,7). Essa idéia foi levada adiante por DeLisi, coordenador do Departamento de Energia (DOE), nos EUA. Em seguida, dentro da proposta de se conhecer o genoma humano, sugeriu-se como uma estratégia importante a construção de um mapa do genoma humano, o qual incluiria a localização dos genes associados ou não com doenças genéticas (8,9,10). Nasce então, nos Estados Unidos, uma proposta de mapeamento e seqüenciamento do genoma humano, de forma sistemática, sustentada basicamente pelo National Institutes of Health (NIH) e o DOE. Esta proposta nada mais é que o Projeto Genoma Humano (PGH), iniciado normalmente em meados de 1990, com uma duração prevista de 15 anos. Os objetivos inicialmente propostos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos objetivos propostos para os primeiros 5 anos do PGH (10)

Mapa genético	Marcadores a cada 2-5 cM
Mapa físico	Marcadores a cada 100 kb

Seqüenciamento do genoma todo	Melhorar as técnicas de seqüenciamento e desenvolver novas tecnologias, bem como reduzir os custos
Organismos modelos	Mapeamento e seqüenciamento de alguns organismos: camundongo, Escherichia coli, levedura, Caenorhabditis elegans, Drosophila
Informática	Desenvolver programas e bancos de dados contendo os mapas genéticos e físicos do genoma humano e outros
Problemas éticos, legais e sociais	Desenvolver programas para estudar as implicações éticas (e outras) em decorrência do PGH
Transferência de tecnologia	Desenvolver tecnologia visando a automação do seqüenciamento de DNA e mapeamento; estimular a transferência da tecnologia para a indústria e a comunidade médica

As raízes do PGH surgiram nos EUA, no entanto o projeto é, hoje, internacional. Além do NIH e DOE, que coordenam o PGH nos Estados Unidos, há outras agências análogas coordenando esses esforços em outros países, tais como Inglaterra, França, Itália, Canadá, Japão e Brasil. No Brasil, este projeto tem recebido apoio principalmente da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT). Assim sendo, há uma colaboração internacional para o mapeamento e seqüenciamento do genoma humano, conforme a idéia preliminarmente constante no PGH.

A seguir, pretendemos discutir com maior ênfase a proposta de construção de um mapa genético, tendo em vista ser esta uma área com a qual já temos contribuído e pretendemos continuar trabalhando. Além disso, discutiremos o andamento de algumas das fases deste projeto, bem como o impacto que os conhecimentos vêm causando do ponto de vista do diagnóstico de doenças genéticas e da identificação de novos genes.

O mapa genético

Mapas genéticos (também conhecidos como de ligação) refletem a localização relativa de genes (ou marcadores genéticos) dentro de um intervalo da seqüência de nucleotídeos que compõem uma molécula de DNA. Por exemplo, o gene que quando mutado causa um dos tipos de albinismo está localizado no cromossomo 9, a 20 centimorgan (cM) do gene que pode causar galactosemia (o que equivale a cerca de 20 milhões de bases). Estes mapas são construídos por meio da análise de ligação, a qual se baseia no princípio de que dois genes se segregam juntos por meio da meiose se estiverem próximos fisicamente e quanto mais distantes estiverem, maior a chance de ocorrer recombinação entre eles e de serem transmitidos separadamente (Figura 1). Dessa maneira, a taxa de recombinação entre dois genes reflete a distância entre eles; por isso, quanto maior a distância entre dois genes maior a taxa de recombinação e, portanto, menor a chance destes genes serem transmitidos juntos. A unidade de medida dos mapas genéticos é o centimorgan (cM), onde 1 cM corresponde à probabilidade de 1% de recombinação em uma meiose. Estima-se que o genoma humano contenha cerca de 3.300 cM e que aproximadamente 1 cM corresponde a cerca de um milhão de bases.

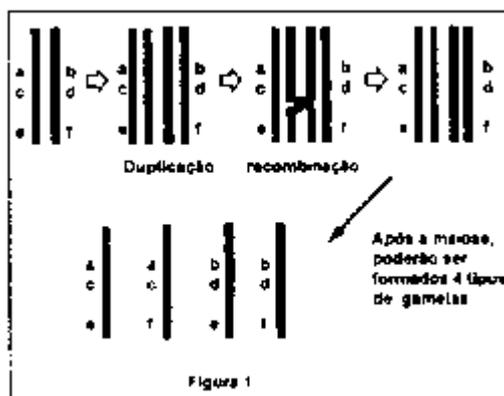


Figura 1: Esquema de um par de cromossomos homólogos, onde estão identificados três pares de marcadores polimórficos. O primeiro marcador (alelos **a** e **b**) está próximo do segundo marcador (alelos **c** e **d**); portanto, durante a divisão celular são transmitidos juntos. Por outro lado, o terceiro marcador (alelos **e** e **f**) está distante dos outros dois marcadores e existe uma grande probabilidade de ocorrer recombinação entre este marcador e os dois outros, como está exemplificado.

Dispor de um mapa genético talvez seja equivalente a termos um mapa de uma cidade grande, como por exemplo de São Paulo, que tem cerca de 15 milhões de habitantes. Suponha que você é do Amazonas e chegou a São Paulo, pela primeira vez, para procurar um amigo. De que maneira você o encontraria? É fundamental o endereço completo, incluindo o bairro, pois pode haver duas ruas com o mesmo nome. Disposto do endereço, talvez o mais prudente seria você obter um mapa da cidade. Com o nome da rua e do bairro, a utilização do mapa permitirá chegar à rua desejada com uma certa facilidade. Se você não dispusesse do mapa da cidade, como poderia chegar à rua desejada? Ou se não tivesse o endereço, como localizaria seu amigo? Este exemplo ilustra como um mapa pode nos ser de grande ajuda. De modo semelhante, seria extremamente importante dispormos de um mapa do genoma humano, isto é, de termos algum sistema que nos permita reconhecer, especificamente, cada segmento de um cromossomo. Poderíamos dizer que a cidade de São Paulo corresponde ao genoma humano (os 23 pares de cromossomos) e que cada um dos cromossomos corresponde a um bairro. Ainda, precisamos de um mecanismo que divida o cromossomo em ruas. Este mecanismo deve permitir a identificação de cada pessoa; ou seja, poderíamos dizer que estando diante de uma rua feríamos vários números, e que cada um é específico de uma casa. É a esse mecanismo que chamamos de marcador genético. Um modelo de um destes marcadores é o grupo sanguíneo ABO. Um bom marcador genético é aquele que tem um grande número de alelos (ou tipos). Exemplificando, o sistema sanguíneo ABO tem apenas 3 alelos e, portanto, as pessoas podem ser do tipo A (AA, AO), B (BB,BO), AB ou O. Isto implica que várias pessoas são iguais e não podemos distinguir uma das outras simplesmente pela análise do tipo de sangue. Assim sendo, ter um mapa genético, como já mencionamos, significa dispor de marcadores com intervalos pequenos entre si. Qual a importância de dispormos de vários marcadores ao longo do genoma? Utilizando a analogia geográfica, se tivermos só alguns marcadores isto corresponde a termos apenas um mapa com alguns dos bairros de São Paulo. Se você tiver um mapa assim, como irá localizar a rua que deseja? Possivelmente você conseguirá, porém vai levar muito mais tempo. Assim sendo, ter um bom mapa genético significa ter marcadores ao longo de cada um dos cromossomos. Em termos técnicos, equivale a dispor de marcadores a cada 2-5 cM.

Até recentemente, os marcadores disponíveis eram bioquímicas (como o grupo sanguíneo ABO) e/ou cromossômicos. Contudo, na década de 80, foram identificados os primeiros marcadores detectáveis pela análise do DNA, os RFLPs ("restriction fragment polymorphisms"), e logo em seguida os VNTRs ("variable number of tandem repeats"). Estes marcadores nem sempre apresentam um grande número de alelos, e o grande inconveniente para a sua análise é que precisam ser analisados pela técnica de Southern blot, que utiliza grandes quantidades de material genético. No início dos anos 90, foram identificadas regiões do DNA com repetições de dinucleotídeo, tri e tetranucleotídeos, que variam enormemente na população os microssatélites. Estes locos, além de serem extremamente variáveis (polimórficos), podem ser analisados pela técnica de PCR ("polymerase chain reaction" ou reação em cadeia da polimerase), a qual é bem mais rápida e realizada com pequenas quantidades de DNA. A identificação destes marcadores abriu perspectivas para se construir um mapa contendo marcadores moleculares a cada 5-10 cM ao longo do genoma. Em 1994 foi publicado o primeiro mapa contendo marcadores a cada 10-20 cM e, em 1996, foi atingida uma das primeiras etapas do Projeto Genoma Humano, o mapa genético contendo marcadores com intervalo de 2-5 cM (11,12).

O que representa um mapa com marcadores polimórficos a cada 5 cM? Um dos grandes benefícios é que podemos mapear qualquer gene mendeliano. Ou seja, se tivermos uma família com vários membros afetados, podemos realizar a análise já com marcadores espaçados inicialmente a cada 20 cM. Se observarmos uma associação entre um marcador e a doença, podemos suspeitar que tal gene está localizado próximo deste marcador. Um exemplo de uma ligação positiva, isto é, da segregação de um marcador com uma doença genética, está exemplificado na Figura 2. Além disso, dispor de um grande número de marcadores pode-se permitir mapear o gene numa região bastante específica, o que certamente facilitará sua identificação. O único fator limitante, agora, é dispor de famílias suficientemente numerosas.

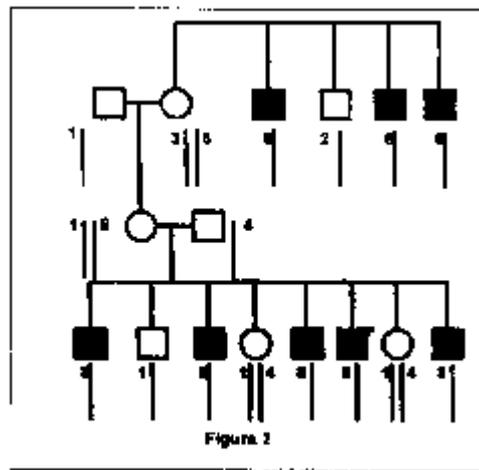


Figura 2: Esquema de uma análise de ligação entre um marcador do cromossomo X e uma doença de herança recessiva ligada ao X (neste caso, só afeta homens e o gene alterado é transmitido por mulheres clinicamente normais). Podemos observar que todos os afetados receberam o alelo 8, do marcador que está sendo testado, enquanto nenhum indivíduo normal recebeu este alelo. Isto sugere que o gene que causa esta doença está localizado no cromossomo X, próximo deste marcador. As barras correspondem ao cromossomo X de cada indivíduo, sendo que as mulheres têm dois cromossomos X, enquanto os homens apenas um. Os números representam os alelos que foram identificados em cada um dos indivíduos após a análise com o marcador em estudo

Como o Brasil pode contribuir para o Projeto Genoma Humano? Atualmente, com a existência de um mapa de marcadores polimórficos tornou-se relativamente simples localizar genes a partir de estudos de ligação. Como exemplo, nos dois últimos anos foi possível mapear três novos genes em nosso laboratório (13,14,15). O mapeamento de genes é, sem dúvida, uma grande contribuição, uma vez que a etapa seguinte permitirá a identificação de um novo gene. A identificação de um gene associado a uma doença genética é fantástica, pois sempre nos mostra um caminho para tentar descobrir qual a função do gene.

Acredita-se que, por meio do PGH, todos os genes humanos serão mapeados. Contudo, mapear e clonar um gene não implica em determinar sua função e sua regulação. Possivelmente, esta etapa entrará pelo século XXI.

Outras etapas do Projeto Genoma Humano

Além do mapa genético foi também proposta a construção de um mapa físico do genoma humano. O mapa físico do DNA consiste no estabelecimento de marcadores ao longo do genoma, definindo-se também a distância entre eles. Poderíamos dizer que dispor de um mapa físico equivale a termos um mapa indicando a distância entre as cidades. O mapa físico difere do genético por refletir a distância real, isto é, o número de nucleotídeos entre os marcadores. Já no mapa genético, como discutimos esta medida é indireta, baseando-se na taxa de recombinação entre dois marcadores. Estes dois mapas estão sendo integrados. A construção do mapa físico humano é analisada após quebrar-se o genoma em vários pedaços, o que é necessário para poder manipular o material genético humano. Contudo, se este é fragmentado, depois é necessário ordená-lo, o que não é uma tarefa fácil. Os fragmentos de DNA devem ser organizados de tal modo que um fragmento seja contíguo a outro, havendo uma sobreposição entre eles. É possível identificar a relação entre os fragmentos pelo uso de marcadores, sendo que alguns serão específicos para cada fragmento e outros comuns a dois ou mais fragmentos, isto é, nas regiões em que há sobreposição. A obtenção de vários fragmentos contíguos é chamada de contig. Uma vez dispendo de um contig, os fragmentos são ordenados de tal modo que se pode obter para cada cromossomo um conjunto de segmentos de DNA alinhados em vários contigs. Esse sistema de organização dos fragmentos não é simples e os principais métodos envolvidos para a construção de um mapa físico podem ser vistos em vários tratados (1). Contudo, julgamos importante discutir dois conceitos que surgiram em função da tentativa de construir tais mapas: STSs (sequence-tagged-sites) e ESTs (expressed sequence tags). Os STSs representam qualquer segmento único do genoma que possa ser analisado por PCR. Esta seqüência pode ou não ser polimórfica, assim sendo os microssatélites acima discutidos podem ser considerados STSs (16). Os ESTs são segmentos obtidos a partir de ácido ribonucleico (RNAm) (17). Um EST é um STS: são também segmentos únicos e podem ser analisados por PCR. Contudo, diferem da maioria dos STSs pois podem representar genes estruturais. Os STSs (incluindo os ESTs) têm sido utilizados para a construção do mapa físico e, portanto, mapas de STS representam a ordem e a distância desses marcadores em um segmento do DNA(18,19).

Atualmente, o mapa físico de vários cromossomos já está pronto e estima-se que um mapa físico preliminar do genoma humano esteja pronto nos próximos 12 meses. Esse mapa consistirá de 30 mil STSs distribuídos ao longo

do genoma em intervalos de 100 bases (20,21).

Dentre os STSs isolados, há pelo menos 16 mil ESTs mapeados nos cromossomos. Estas seqüências correspondem a genes em potencial, que deverão ser posteriormente identificados (21). Esse número é significativo, se considerarmos que deve haver de 50 mil a 100 mil genes que codificam RNAm.

Hoje, já está sendo dada atenção ao último de-safio do PGH: o de seqüenciar os 3 bilhões de pares de bases do genoma. Alguns grupos já estão iniciando esta etapa em uma velocidade de muitas megabases por ano. Até agora a maior seqüência contígua obtida foi de 695 kb do locus do receptor de célula T. Métodos de seqüenciamento, incluindo sua automação, estão sendo desenvolvidos. Além dos métodos convencionais, pesquisadores estão tentando desenvolver novas maneiras de sequenciar o genoma, incluindo um "chip de DNA" de silicone. Apesar dessa etapa ser, aparentemente, a de mais difícil consecução, acredita-se que será realizada antes do ano 2005 (10).

O mapeamento, e eventualmente o seqüenciamento do genoma humano, irá, a princípio, revelar toda a informação necessária para o desenvolvimento biológico do ser humano. Contudo, a habilidade de se interpretar a maior parte dessa informação dependerá de estudos paralelos de outros organismos. Pesquisa envolvendo seres humanos é bastante limitada, em termos práticos e éticos. Ao contrário, organismos-modelo tais como bactérias, leveduras, nematódeos, moscas e camundongos podem ser facilmente manipulados geneticamente. Além disso, os genomas desses organismos são menores que o humano, e mais fáceis de serem estudados. Apesar desses genomas serem menores, aparentemente seu conteúdo genético é bastante semelhante ao do genoma humano, o que torna o estudo desses animais ainda mais interessante (1).

Dentre os animais-modelo, o camundongo é o que tem o genoma mais semelhante ao do humano. Aparentemente, o genoma de camundongo é praticamente do mesmo tamanho que o humano e ainda, muitos genes estão conservados entre estas duas espécies, bem como a ordem dos genes ao longo dos cromossomos (22,23,24,25). O mapa físico e a seqüência do genoma de camundongo estão sendo re-alizados (26) e pretende-se estabelecer paralelo entre a seqüência de DNA do camundongo e a do homem, o que será importante para análises comparativas e para a identificação mais precisa dos genes e de seus elementos regulatórios (21,27).

Grande número desses projetos estão dirigidos para bactérias (por exemplo, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae*, *Bacillus subtilis*, dentre outras) e outros para eucariontes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* e o camundongo de laboratório). Dentre esses, o seqüenciamento do genoma de *Escherichia coli* e *Caenorhabditis elegans* deverão estar concluídos em 1998, enquanto em 1996 concluiu-se o seqüenciamento do primeiro eucarionte, o da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (28,29).

Impacto do Projeto Genoma Humano

a. Na identificação de genes

Há basicamente duas maneiras de identificar genes. A primeira pela análise da proteína; ou seja, conhecendo-se a seqüência da proteína pode-se reconhecer a seqüência de DNA correspondente. Um outro método é mapear o gene em um dos cromossomos e depois isolá-lo. Esse procedimento de mapear e clonar (identificar) um gene é chamado de clonagem após o mapeamento ou positional cloning. O primeiro método depende de conhecermos a proteína; no entanto, devemos salientar que o número de proteínas identificadas ainda é pequeno. Assim sendo, a clonagem após o mapeamento tem sido a estratégia mais utilizada e mais bem sucedida na identificação de genes.

Alguns dos genes clonados por essa estratégia estão citados na Tabela 2. Muitos desses exemplos exigiram um esforço internacional enorme. Contudo, a infra-estrutura básica que está sendo estabelecida pelo PGH, em termos de mapas, tecnologias e materiais disponíveis, está simplificando significativamente o processo. Por exemplo, o gene da fibrose cística (uma das doenças genéticas humanas mais comuns) foi, em 1985, mapeado no cromossomo 7, porém só foi donado em 1989, após grandes esforços de vários grupos internacionais (30,31,32). Em relação ao mapeamento, na época não se dispunha de um mapa genético e foi necessário isolar vários outros marcadores para restringir ao máximo possível a área candidata, para, somente então, se tentar encontrar o gene. De modo similar, para donar esse gene foi necessário o desenvolvimento de novas técnicas e estratégias para se atingir esse objetivo. Hoje, ao se mapear um gene, verifica-se se há genes candidatos na região (por meio de mapas disponíveis eletronicamente) onde o gene foi localizado; caso a busca seja positiva, verifica-se se algum desses é responsável pela doença em estudo. Vários genes foram identificados por esse processo, como, por exemplo, o gene responsável pela doença de Emery-Dreyfuss, o gene que quando mutado causa a síndrome de Crozyon, Apert, Yfeifler e muitos outros.

Tabela 2 - Exemplo de alguns genes identificados por clonagem após mapeamento(1)

Doença	Ano
Doença granulomatosa crônica	1986
Distrofia muscular	1986
Retinoblastoma	1986
Fibrose cística	1989
Tumor de Wilms	1990
Neurofibromatose tipo I	1990
Síndrome do X-Frágil	1991
Síndrome de Kallmann	1991
Distrofia miotônica	1992
Doença de Huntington	1993
Doença von Hippel-Lindau	1993

Vale a pena citar que em 1995, em colaboração com um laboratório italiano, foi possível identificar o gene que mapeamos em nosso laboratório. Assim, no final daquele ano mapeamos um gene no braço longo do cromossomo 5, por meio de estudos de li-gação em famílias brasileiras que tinham uma forma de distrofia muscular de herança autossômica recessiva (DMC-AR). Em paralelo, um grupo italia-no isolou um gene que se expressa principalmente em tecido muscular, que também foi mapeado no cromossomo 5, na mesma região em que mapeamos a forma de DMC-AR. Assim sendo, esse gene foi analisado nos pacientes brasileiros e possibilitou identificarmos uma mutação (isto é, res-ponsável pela doença) que seria responsável pelo qua-dro clínico dos afetados (33). Apesar de termos de-morado aproximadamente seis meses para mapearmos este gene, sua identificação levou ape-nas cerca de dois meses! Esse caso exemplifica como um mapa físico e genético do genoma humano vai acelerar significamente o processo de identifica-ção de novos genes, além de tornar essa etapa pos-sível de ser realizada mesmo em laboratórios de pe-queno porte, como a grande maioria dos laboratóri-os brasileiros.

b) No diagnóstico de doenças genéticas

A compreensão do genoma humano facilitará o tratamento das doenças genéticas. Apesar dos vári-os grupos que trabalham com pesquisa nessa área, esse objetivo talvez não seja atingido prontamente. Contudo, o efeito mais imediato do PGH é a dispo-nibilidade de testes genéticos. Esses testes podem confirmar diagnóstico, identificar portadores (sadi-os) de um gene patogênico e fornecer informações pré-sintomáticas, incluindo risco de doenças futuras e morte precoce. Além disso, podem também revelar informações não somente sobre o indivíduo mas sobre seus familiares. O impacto resultante dessas informações pode ser grande. Desde quando o pro-jeto genoma foi proposto houve uma preocupação com a ética, a tal ponto que 3-5% dos recursos são destinados a pesquisas sobre os efeitos desses testes genéticos (10).

Não pretendemos discutir, aqui, o aspecto ético desse projeto, que será abordado em outro artigo, mas achamos importante avaliar o efeito de alguns testes genéticos já oferecidos no Brasil às famílias com doenças genéticas.

A disponibilidade de um teste molecular para uma determinada doença genética tem sido primei-ramente importante para a confirmação do diagnós-tico. Tais testes trazem grandes benefícios, pois além de possibilitar a confirmação do diagnóstico podem evitar a realização de outros exames, inclusive mais dolorosos para o paciente. Por exemplo, na distrofia tipo Duchenne (DMD), uma doença de herança recessiva ligada ao X (afetando só indivíduos do sexo masculino), sabe-se que 60-70% dos casos têm uma deleção (falta um segmento) de DNA. Essa forma de distrofia, apesar de ser a mais comum, é clinicamente indistinguível de uma forma de distrofia de herança autossômica recessiva. A distinção entre essas duas distrofias é fundamental, pois na última apenas os pais do afetado apresentam risco de vir a ter outros filhos afetados. Já na DMD, as irmãs podem também ser portadoras do gene alterado e, portanto, apresentam risco de ter filhos afetados. Assim sendo, se ao analisarmos o DNA de um afetado por DMD e detectarmos uma alteração característica desta doença, em primeiro lugar estaremos confirmando o diagnóstico.. Para a família, o que significa termos detectado uma alteração típica da doença? Estes achados são sem dúvida alguma de grande impor-tância para a família, pois podem permitir, por meio da análise de seu DNA, por exemplo, classificar uma irmã do afetado como portadora ou não da altera-ção. A disponibilidade desses testes

representou grande avanço, pois possibilitou a detecção de certeza de portadoras quanto ao gene da DMD pertencente a estas famílias. Observamos que o fato de poder definir se uma consulente é portadora ou não da alteração específica que causa a doença (mutação) muda bastante o efeito do aconselhamento genético. Antes de dispormos dos testes de DNA, por meio da análise da genealogia e de testes bioquímicos, estimávamos o risco de uma mulher (pertencente a uma família do afetado) ser portadora do gene defeituoso. Compreender o significado de um risco é bastante difícil. Por exemplo, o que significa ter risco de 10% de ser portadora do gene defeituoso para DMD? Parece ser baixo; porém, se você tem um afetado na família, esse risco, para a maioria das pessoas, é bastante elevado. Com o teste do DNA, é possível, na maioria das famílias, dizer para uma mulher em risco de ser portadora se ela tem ou não o gene defeituoso. Assim sendo, aumenta a compreensão das consulentes e facilita a tomada de futuras decisões. Tem sido recomendado às famílias a realização dos testes de detecção de portadoras em idade próxima à reprodutiva; assim, as pessoas em risco poderão compreender melhor o significado de tais testes.

Outra situação importante a ser discutida é a realização de testes genéticos em doenças de início tardio, como na distrofia miotônica de Steinert (DMS). Essa condição é de herança autossômica dominante (risco de 50% de transmitir a doença para os descendentes) e expressividade variável. Isso significa que alguns indivíduos podem apresentar apenas alguns sinais clínicos da doença, a ponto de nem perceberem que são afetados, enquanto outros têm um quadro clínico completo da doença, já nascendo com alguns dos seus sinais. Além disso, a idade do início dos sinais clínicos é variada, podendo surgir até mesmo após a quarta década. Em situações como essa, pergunta-se: é válido realizar testes de DNA em indivíduos em risco de serem portadores do gene da DMS, porém ainda assintomáticos? Em relação a crianças, temos adotado em nosso laboratório a realização de testes somente em indivíduos com alguma manifestação clínica da doença. Nos adultos pré-clínicos discutimos em pelo menos duas sessões a validade de realização desse exame. O mesmo questionamento tem sido levantado para a grande maioria das doenças com idade de início tardio e tem sido amplamente debatido mundialmente. As medidas que temos adotado são, no momento, um consenso internacional (34,35,36).

Vale a pena, ainda, mencionar que nas doenças onde o gene foi identificado é possível, na grande maioria dos casos, realizar o diagnóstico pré-natal (isto é, no feto, durante as primeiras semanas de gestação); entretanto, cabe lembrar que o aborto terapêutico ainda não está legalizado em nosso país. A realização de diagnóstico pré-natal poderia ser vista de modo otimista, pois nos casos em que o resultado é normal o aborto será certamente evitado. Recentemente, recebemos solicitação para o diagnóstico pré-natal da síndrome de Apert. Essa síndrome é grave, porém a grande maioria dos casos é resultado de mutação nova, ou seja, o erro ocorreu na criança. Assim sendo, o risco para o casal estava apenas ligeiramente aumentado em relação à população normal. Contudo, o casal não queria correr de forma alguma o risco de ter outra criança com o mesmo problema. Assim, após longa discussão com o casal, julgamos mais prudente realizar o exame, o qual, como se esperava, foi normal. Nesse caso, a confirmação de que o feto era normal fez com que o casal ficasse tranquilo, permitindo a continuação da gestação.

A disponibilidade de testes genéticos aumenta dramaticamente, e cuidados deverão ser tomados para a aplicação correta desses testes, principalmente em nível populacional. Por exemplo, há um consenso internacional que os testes para doenças de início tardio e ainda sem tratamento não devem ser realizados em crianças assintomáticas. Contudo, verifica-se que muitas crianças vêm sendo testadas, no Brasil e no exterior. A interpretação desses testes deve ser realizada com muito cuidado. Nesse sentido, é importante destacar dois aspectos: 1) critérios rigorosos quanto à qualidade dos exames a serem realizados; 2) possuir conhecimentos suficientes do gene para serem transferidos à sociedade. No primeiro caso, vale a pena citar um exemplo que ocorreu recentemente em um diagnóstico pré-natal, "parcialmente" realizado no nosso laboratório: uma consulente, seguramente portadora do gene da DMD, coletou material das vilosidades coriônicas (feto) para a realização de análise de DNA. A coleta da amostra do feto e a extração de DNA foram realizadas em outro laboratório e posteriormente enviadas ao nosso laboratório, para análise. Identificamos uma alteração no material do feto, diferente da encontrada no menino com DMD pertencente a essa família. Como você interpretaria esse resultado? Será que o feto também teria essa distrofia, porém decorrente de um erro diferente? Levando-se em conta que a probabilidade dessa ocorrência é extremamente baixa (menor do que 1 :10.000), levantamos a suspeita de que a amostra de DNA (preparada em outro laboratório) não havia sido processada de maneira adequada e o resultado obtido era um artefato. Depois de vários testes, verificamos que o feto era normal. Esse exemplo mostra como os exames devem ser de boa qualidade, pois um erro pode causar danos irreparáveis a um indivíduo e/ou sua família.

Na segunda situação, é interessante verificar alguns dos conhecimentos que dispomos sobre o câncer de mama. Em famílias com câncer de mama hereditário (o que corresponde a menos de 10% do total de casos), há uma grande associação entre alterações no gene BRCA1 (85% dos casos) e a ocorrência da doença. Algumas mulheres pertencentes a estas famílias têm realizado mastectomia profilática quando descobrem ser portadoras de alterações no gene BRCA1. Contudo, realizar a mastectomia não significa eliminar o risco, mas apenas reduzi-lo (34,37). A atuação torna-se ainda mais incerta quando mulheres não pertencentes a essas famílias são testadas para BRCA1 e verifica-se que são portadoras de alterações neste gene. Qual o risco delas virem a desenvolver o câncer? No momento não podemos responder a essa pergunta, pois está se verificando que este gene pode

apresentar inúmeras alte-rações, e não se sabe ainda quais estão associadas com o desenvolvimento do câncer. Assim, o estudo dessas alterações em várias populações será funda-mental para nos possibilitar uma melhor compreen-são da associação entre esse gene e o desenvolvi-mento desse tipo de cancer. No entanto a interpre-tação desses testes poderá se complicar, ainda mais, uma vez que outros genes, como o BRCA2, também associados com cancer de mama, estão sendo identi-ficados. Diante desses questionamentos, é válido, no momento, realizar tais testes comercialmente?

Além de decidir se um teste está em condições de se tornar disponível para a sociedade, existe ou-tro questionamento: a população está pronta (ou interessada) para compreender e realizar esses tes-tes? Recentemente, foram publicados na revista Science alguns resultados preliminares sobre o inte-resse da população americana em ser testada para o gene da fibrose cística (FC). Essa condição, a mais comum entre caucasóides, tem herança autossômica recessiva: os pais dos afetados são portadores do gene e apresentam 25% de risco de vir a ter outra criança com o mesmo problema. Assim, o teste ob-jetiva precipuamente a ide notificação dos portadores sadios do gene da FC. Porém, se os portadores ca-sarom com indivíduos também portadores do gene da FC terão risco de ter filhos afetados pela doença. Foram obtidas informações de 20.000 pessoas; sur-preendentemente, a grande maioria delas não apresentou interesse em ser testada, especialmente se a realização do teste causar alguma inconveniência ou custo. Observou-se, ainda, que grande parte das pessoas não compreendeu o resultado do teste, ou seja, muitos indivíduos com resultado normal continuavam achando que teriam risco de vir a ter filhos afetados por essa condição (38).

Recentemente, aplicamos um questionário para cerca de 200 alunos de medicina. Nesse questionário perguntamos se os mesmos demonstrariam interesse em saber se eram portadores de algum gene alterado, que pudesse dar origem à manifestação de alguma doença genética (como, por exemplo, coréia de Huntington, câncer, Alzheimer, etc.) ou aumentar o risco (ou a probabilidade) de ter filhos com problemas (exemplo: portador do gene alterado para fibrose cística). Ressalte-se que todas as doenças incluídas no questionário haviam sido anteriormente discutidas em aula. Ao final, verificamos que a grande maioria não gostaria de ser testada, a não ser para câncer.

Esses resultados, embora ainda preliminares, sugerem que a população não está interessada em "conhecer" os seus próprios genes.

Conclusões

O Projeto Genoma Humano, cuja conclusão está prevista para o ano 2005, vam se desenvolven-do rapidamente; há, inclusive, perspectivas de que seja concluído até mesmo antes dessa data.

A aquisição de novos conhecimentos tem sido fantástica, e a disponibilidade das informações via Internet tem auxiliado sua rápida disseminação. Os mapas físicos e genéticos, por exemplo, podem ser obtidos facilmente por via eletrônica.

Os conhecimentos adquiridos por esse projeto, além de contribuir para a compreensão do nosso genoma, têm uma significativa aplicação no que concerne ao diagnóstico de doenças genéticas. Em alguns casos, a realização de testes genéticos é de grande valia para a família. Contudo, a aplicação de tais testes, principalmente em nível populacional, deverá ser cuidadosa. Esses testes devem ser reali-zados em centros de pesquisas, ou laboratórios vin-culados a tais centros, uma vez que a interpretação errônea dos seus resultados pode levar a conclusões inadequadas.

Julgo que a contribuição científica brasileira ao PGH é ainda modesta, porém apresentamos grande potencial para contribuir com esse projeto por meio do mapeamento de novos genes. Nesse sentido, uma co-laboração nacional mais efetiva seria de grande valia.

Apesar de todos os avanços do PGH, estamos ainda distantes de compreender completamente o genoma humano; talvez essa compreensão ainda não seja possível apenas pelo mapeamento, clonagem e seqüenciamento do genoma.

Abstract - The Human Genome Project

The Human Genome Project (HGP), which is projected to last 15 years, was oticially initiated in the United States in 1990. Soon thereafter, others countries, including Brazil, began to participate of this project. The basic objectives of the HGP are the mapping of human genes and the sequencing of our entire genome. The HGP has developed very rapidly and some of the objectives proposed, such as the genetic map of markers, have already been reached. Likewise, the etiects of new knowledge acquired by the HGP in the diagnosis of genetic diseases, as well as in the identification of new genes, are being observed.

Referências Bibliográficas

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. Metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
2. Olson MV. The human genome project. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:4338-44.
3. Chu CS, Trapnell BÇ Murtagh Jr, Moss J, Dalemans W, Jallat S, et al. Variable deletion of exon 9 codign sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. EmboJ 1991;10:1355-63.
4. Dulbecco R. Aturning point in cancer research: sequencing the human genome. Science 1986;231:1055-56.
5. Cook-Deegan RM. The Alta Summit, December 1984. Genomics 1989;5: 661-3.
6. Sinsheimer RL. The Santa Cruz Workshop, May 1985. Genomics 1989;5: 954-6.
7. DeLisi C. The human genome project. Am Sci 1988;76:488-493.
8. National Research Council. Committee on Mapping and Sequencing the Human Genome: mapping and sequencing the human genome. Washington, National Academy, 1988. Citado em Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. Op.cit. 1995.
9. Otiice of Technology Assesment Mapping our Genes. Genome projects: how big? how fast? Washington DÇ 1988. Citado em Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. Op.cit. 1995.
10. Collins FS. Evolution of a vision: genome project origins, present and future challenges and far-reaching benefits. HGN 1995;7:3.
11. Gyapay G, Moreisette J, Vignal A, Dib Ç Fizames Ç Millasseau P, et al. The 1993-1994 généthon human genetic linkage map. Nature Genet 1994;7 (2 spec n.): 246-339.
12. Dib Ç Fauré S, Fizames Ç Samsoon D, Drauot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5.264 microsatellites. Nature 1996,380:152-4.
13. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. Hum Mol Genet 1996;5:815-20.
14. Sertié AL, Quimby M, Moreira ES, Murray J, Zatz M, Antonarakis SE, Passos-Bueno MR. A gene which cau-ses severe ocular alterations and occipital encephalocete (Knobloch syndrome) is mapped to 21q22.3. Hum Mol Genet 1996;5:843-7.
15. Moreira ES, Vainzof M, Marie S, Pavenello RÇ Zatz M, Passos-Bueno MR. A new gene causing Limb-Girdle Muscular dystrophy is mapped. Trabalho em preparação-
16. Olsen M, Hood L, Cantor Ç Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. Science 1989;245:1434-5.
17. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xião H, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science 1991;252:1651-6.
18. Green ED, Olson MV. Chromosomae region of the cystic fibrosis gene in yeast artificial chromosomes: a model for human genome mapping. Science 1990;250:94-8.
19. Green ED, Green P? Sequence-tagged site (STS) content mapping of human chromosomes: theoretical considerations and early experiences. PCR Methods Appllc 1991;1:77-90.
20. Jordan E, Collins FS. A march of genetic maps. Nature 1996;380:111-3.
21. Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, et al. A gene map of the human genome. Science 1996;274:540-6.
22. O'Brien SJ, Womack JE, Lyons LA, Moore KJ, Jenkins NA, Copeland NG. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. Nature Genet 1993;3:103-12.
23. Cox RD, Lehrach H. Genome mapping: PCR based meiotic and somatic cell hybrid analysis. Bioessays 1991;13:193-8.
24. Nadeau JH. Maps of linkage and syntenly homologies between mouse and mand. Trends Genet 1989;5:82-6.
25. O'Brien SJ. Mammalian genome mapping: lessons and prospects. Curr Opin Genet Dev 1991;1:105-11.
26. Dietrich W, Katz H, Lincoln SE, Shin H, Friedman J, Dracopoli NÇ Lander ES. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. Genetics 1992;131:423-47.
27. Hood L. Koop B, Goverman J, Hunkapiller T. Model genomes: the benefits of analysing homologous human and mouse sequences. Trends Biotechnol 1992;10:19-22.
28. Jones SJM. An update and lessons from whole-genome sequencing projects. Curr Op Genet Dev 1995;5:349-53.
29. Gotieau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldman H, et al. Life with 6000 genes. Science 1996;274:546,563-7.
30. Eiberg H, MohrJ, Schiegelow K, Nielsen LS, Williamson R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with

- others markers: indication of PON-cystic fibrosis syntenry. Clin Genet 1985;28:265-71.
31. Rommens JM, Zengerling S, Burns J, Melmer G, Kerem BS, Plavsic N, et al. Identification and regional localization of DNA markers on chromosome 7 for the cystic fibrosis gene. Am J Hum Genet 1989;43:645-63.
 32. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;245:1066-73.
 33. Nigro V, de Sá Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, et al. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in -sarcoglycan gene. Nature Genet 1996;14:195-8.
 34. Beardsley T. Vital data. Scient Amer 1996;274: 100-5.
 35. Michie S, McDonaldo V, Bobrow M, McKeown Ç Marteau T. Parents' responses to predicitive genetic testing in their children: report of a single case study. J Med Genet 1996;33:313-8.
 36. Berry AC. Predictive genetic testing in children [Letter, comment]. J Med Genet 1996;33:806-7.
 37. Kahn P. Coming to grips with genes and risk. Science 1996;274:496-8.
 38. Marshall E. The genome program's conscience [News]. Science 1996;274:488-90.

Endereço para correspondência:

*Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Biologia
Rua do Matão - Trovessa 14, n° 321
Cidade Universitária
05508-900 São Paulo - SP*

Agradecimentos

Agradeço o apoio e idéias da prof^o. Mayana Zatz e dr^a. Mariz Vainzof.