

Projeto Genoma Humano: Impacto na Medicina

O Projeto Genoma Humano (PGH) foi um empreendimento de caráter internacional que começou oficialmente em 1990, envolvendo além dos EUA, países da Europa, Japão, Austrália e Brasil. O objetivo primordial do PGH era produzir a seqüência completa do genoma humano com taxas mínimas de erro, identificando todos os genes que compõe o DNA humano. A previsão era de que no ano de 2005 o genoma estaria decifrado, resultado que foi antecipado em 4 anos.

Evolução Histórica:

Em 1953, Watson e Crick apresentaram o modelo de estrutura do DNA em dupla-hélice, e, em 1956, foi estabelecido o número de cromossomos humanos. A partir daí a genética se estabeleceu como uma especialidade clínica, sendo em 1959 descritas as síndromes de Down, Turner e Klinefelter. No início da década de 70 ocorreram avanços importantes na identificação dos cromossomos, com a implementação das técnicas de citogenética molecular e hibridização *in situ*, permitindo também a melhor identificação de doenças genéticas. A análise de células somáticas através do uso de sondas diretamente no gene afetado foi uma das primeiras técnicas utilizadas para a localização direta de genes, a qual foi aprimorada com o desenvolvimento de dois tipos de técnicas de mapeamento:

- Mapeamento físico: é a determinação dos locais físicos exatos dos genes nos cromossomos, envolvendo técnicas de hibridização. O primeiro gene mapeado fisicamente foi o do Daltonismo.

- Mapeamento genético: também procura identificar o local cromossômico de genes em si, mas baseado em análises da frequência de recombinação entre dois locos que ocorre na meiose. Ao contrário do mapa físico, representa a posição relativa dos genes em um cromossomo, pois a sua determinação depende da distância entre eles, estimada pela frequência de recombinação.

A partir daí, várias doenças importantes puderam ser mapeadas, como em 1986 a Granulomatose Crônica e a Distrofia Muscular de Duchenne e, em 1989, a Retinoblastia e a Fibrose Cística. Com o mapeamento de genes foi possível traçar o perfil das doenças, a sua localização exata, seu padrão de transmissão e mutações correlatas. Também apenas na década de 80 se tornou possível o seqüenciamento do DNA, com o desenvolvimento, por Leroy Hood, do primeiro seqüenciador semi-automatizado.

O Projeto:

Em 1980, o Departamento de Energia (DOE) dos EUA propôs o seqüenciamento do genoma humano devido à preocupação com mutações ocorridas por causa da radiação a que seus trabalhadores estavam expostos.

Porém, apenas em 1988 começaram as discussões para o lançamento do PGH de fato. O projeto foi lançado oficialmente em 01/10/90, tendo sido inicialmente patrocinado pelo NIH (National Institute of Health) e pelo DOE, ambos dos Estados Unidos. O comitê assessor do PGH recomendou que se fizesse o seqüenciamento a partir da construção dos mapas genéticos e físicos dos cromossomos, além de modelos de outros organismos em paralelo. Entre os objetivos iniciais do PGH também estavam armazenar as informações obtidas em bancos de dados, melhorar as ferramentas para análise de dados genéticos e estudar os aspectos éticos, legais e sociais de acesso às informações genéticas.

Início do seqüenciamento e competição:

No início dos anos 90, enquanto as tecnologias de seqüenciamento eram aperfeiçoadas e o processo ainda era lento e de alto custo, foi adotada a estratégia de mapear o genoma num primeiro momento e seqüencia-lo depois. Porém, o surgimento da Celera Genomics em 1998 deu um novo rumo ao PGH. A Celera é uma empresa privada, comandada pelo Dr. Craig Venter, um dissidente do PGH. Com alto investimento e equipamentos de última geração, seu objetivo era seqüenciar o genoma humano até 2001, usando uma estratégia alternativa, com 99,9% de cobertura. Venter havia sido responsável pelo mapeamento completo da bactéria *Hemophilus influenzae*, e ameaçava patentear o genoma humano e vender os direitos de acesso aos dados.

O aumento da competitividade na corrida para decifrar o código completo do genoma humano teve um significativo impacto sobre as decisões políticas que estavam por trás da liberação de verbas de pesquisa para o PGH. Isso permitiu acelerar o projeto de modo nunca visto anteriormente. Assim, em janeiro de 2000 havia 20 centros de seqüenciamento que geravam coletivamente 1000 bases por segundo, 24 horas por dia, sete dias por semana, diminuindo o custo para a obtenção de um nucleotídeo com alta qualidade de US\$ 10,00 para US\$ 0,10.

Métodos de seqüenciamento:

O projeto genoma humano utilizou o seqüenciamento seriado de clones genômicos como sua principal estratégia para o mapeamento do genoma humano: o genoma humano foi fragmentado em diversas partes, as quais foram posteriormente inseridas, de maneira ordenada, em diferentes clones (moléculas de DNA recombinante, ou seja, DNA de diferentes origens), que depois foram mapeados (mapeamento físico). No caso do projeto genoma humano foram utilizados para montagem dos clones os BACs (cromossomos artificiais de bactérias), que têm inúmeras vantagens sobre outros tipos de moléculas. Esta estratégia garantiu a máxima cobertura com o mínimo de redundância, além de permitir a divisão ordenada do trabalho por diferentes grupos.

O grupo de Celera Genomics fez uso de uma estratégia diferente para o mapeamento do genoma, fragmentando todo o DNA humano de uma só vez, sem a separação por cromossomos ou clones genômicos (*whole genome shot-gun*), deixando a cargo dos supercomputadores a organização posterior dos fragmentos seqüenciados.

Enquanto a estratégia de *shot-gun* se mostrou mais rápida, a estratégia de BACs revelou-se mais informativa graças aos dados de mapeamento físico.

Resultados:

Em paralelo ao seqüenciamento do genoma humano, outros organismos de importância científica eram seqüenciados, como as bactérias *Hemophilus influenzae* e *Helicobacter pylori*, a levedura *Saccharomyces cereviae* (1996), o nematóide *Caenorhabditis elegans* (1998) e a mosca *Drosophila melanogaster* (2000).

Após muita discussão e controvérsias, em fevereiro de 2001 foi publicada a primeira versão completa do genoma humano, simultaneamente nas revistas *Nature* (grupo do PGH, Colins *et al.*) e *Science* (Celera Genomics, Venter *et al.*). O que o projeto genoma fez foi descobrir quais eram e colocar em ordem 97% das letras (bases) que compõem o genoma humano. O tamanho total do genoma humano foi estimado em 2,91 bilhões de bases pelo grupo da Celera e 3,29 bilhões de bases pelo consórcio internacional do PGH, valores muito próximos ao esperado, concordando com as estimativas anteriores. Entretanto, somente em abril de 2003, 13 anos após o início, o PGH anunciou o término oficial do projeto. A maior conclusão deste grande projeto foi explicar que a complexidade do ser humano está baseada na codificação de diferentes proteínas e não no número de genes. A elevada quantidade de elementos repetitivos foi uma das maiores dificuldades encontradas no seqüenciamento e montagem do genoma humano, porém o estudo desses elementos será útil para análises de antropologia molecular e estudo da genética de populações.

O potencial codificador do genoma humano, objetivo que ainda não foi atingido de maneira satisfatória, é um dos tópicos atuais de maior interesse. Uma possível classificação funcional dos supostos 30.000 genes humanos pode ser vista na tabela abaixo:

Tabela 1 Classificação Funcional dos Genes		
Função	Número de Genes	Percentual
Desconhecida	12.809	41,70%
Enzimas envolvidas com os ácidos nucléicos	2.308	7,50%
Fatores de transcrição	1.850	6%
Receptores	1.543	5%
Diversos	1.318	4,30%
Hidrolases	1.227	4%
Moléculas regulatórias	988	3,20%
Proto-oncogenes	902	2,90%
Proteínas estruturais do citoesqueleto	876	2,80%
Proteínas quinases	868	2,80%

Oxidoredutases	656	2,10%
Transferases	610	2%
Adesão celular	577	1,90%
Transporte	533	1,70%
Matriz extracelular	437	1,40%
Canais iônicos	406	1,30%
Atividade motora	376	1,20%
Moléculas sinalizadoras	376	1,20%
Transporte intracelular	350	1,10%
Sínteses e síntetases	313	1%
Proteínas estruturais do músculo	296	1%
Imunoglobulina	264	0,90%
Proteínas de transferência ou carreadoras	203	0,70%
Isomerases	163	0,50%
Liases	117	0,40%
Proteínas virais	100	0,30%
Ligases	56	0,20%
Proteína ligadora do cálcio	34	0,10%
Chaperonas	159	0,00%

Mesmo após o término do PGH, ainda faltavam algumas etapas para serem completados, como, por exemplo, o seqüenciamento do cromossomo X. Em março de 2005, 99,3% do cromossomo X havia sido seqüenciado, resultado que foi publicado pela revista *Nature*.

Brasil e o Projeto Genoma Humano:

A pesquisa para auxiliar a desvendar o genoma começou no país em maio de 1997, quando a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) organizou a Rede ONSA (do inglês, Organização para Seqüenciamento e Análise de Nucleotídeos), instituto virtual de genômica formado inicialmente por 30 laboratórios brasileiros ligados a instituições de pesquisa do Estado de São Paulo.

O primeiro projeto brasileiro decifrou o material genético da bactéria *Xylella fastidiosa*. O projeto foi concluído em novembro de 1999 e o país entrou para a história pelo primeiro seqüenciamento de um fitopatógeno de importância econômica. No Brasil também foi seqüenciado o *Chromobacterium violaceum*, de grande potencial biotecnológico por possuir compostos antibióticos e antitumorais.

O Brasil também foi responsável pelo desenvolvimento de uma técnica inédita para mapeamento de genes, a técnica de ORESTES, uma complementação importante das demais técnicas já existentes, transcrevendo regiões até então inacessíveis.

Fenótipo: o alvo da Medicina

Do ponto de vista médico, a importância do término do projeto genoma humano só pode ser comparada à publicação do primeiro tratado científico completo de anatomia humana por Andreas Vesalius, em 1543. O papel da genética na medicina mudou: hoje, o conhecimento genético é essencial para garantir a eficiência e a efetividade da medicina e da saúde pública.

A partir dos conhecimentos gerados pela genômica poderemos entender melhor as doenças complexas, que constituem a grande maioria das doenças humanas, como o câncer, doenças cardiovasculares, nutricionais, infecciosas e degenerativas. Nestes casos, o genoma não determina o fenótipo; ele apenas estabelece uma gama de possibilidades. Qual fenótipo se manifestará vai depender do ambiente e de suas interações com o genótipo (o que se chama norma de reação). O estudo dessas interações permitirá o entendimento detalhado dos mecanismos de instalação e progressão das doenças, assim como variações geneticamente determinadas na resposta aos agentes infecciosos, componentes da dieta e medicamentos.

Aplicações atuais:

Embora as pesquisas em genômica aplicada a medicina ainda estejam em desenvolvimento, alguns avanços e novas tecnologias geradas a partir do PGH já estão disponíveis para diagnóstico e tratamento de doenças, como os *biochips* e a farmacogenética.

- Farmacogenética:

A farmacogenética estuda as diferenças interindividuais na resposta a medicamentos que são determinadas geneticamente, dando ênfase à identificação de polimorfismos em um único gene. Apesar de características monogênicas serem importantes na determinação da ação de um fármaco, o efeito farmacológico como um todo é resultado da interação de vários genes, cada um codificando uma proteína envolvida em uma ou várias etapas do metabolismo, transporte, distribuição e ação do fármaco. Essas interações poligênicas são mais difíceis de quantificar do que efeitos monogênicos, mas certamente nos dão um panorama mais real sobre a resposta ao fármaco. O termo farmacogenômica foi introduzido mais recentemente e vem ganhando força na era pós-genoma, pois se aplica justamente a esse espectro mais amplo da farmacogenética (ou seja, considerar vários genes ao mesmo tempo).

Assim, a farmacogenética (ou farmacogenômica) tem como objetivo a adoção de terapias individualizadas, desenhadas em função do perfil genético do paciente ou do perfil de expressão gênica do tecido-alvo ou patógeno-alvo, permitindo a seleção da melhor droga, na melhor dose, para cada paciente. Isso já é possível em doenças como o câncer de mama, no qual a suscetibilidade a terapias hormonais pode ser detectada através de análises genéticas do tumor, possibilitando tratamentos mais específicos e com menos efeitos adversos. Também é possível, através da genotipagem do patógeno envolvido na doença, escolher o medicamento mais eficaz.

- Genotipagem do HIV:

O tratamento da AIDS a partir da genotipagem do HIV é um exemplo importante do uso da farmacogenética na medicina: através da determinação do genótipo do vírus define-se quais medicamentos o paciente deverá usar para que haja sucesso no tratamento, escolhendo-se as drogas a que o vírus é mais suscetível. A genotipagem do HIV já está disponível na prática clínica desde 2000 e vem sendo bastante utilizada, principalmente no acompanhamento de pacientes que foram expostos a diversos medicamentos. Esta estratégia influencia significativamente no aumento da sobrevida desses indivíduos, proporcionando um combate mais eficaz ao vírus.

- Biochips:

Os *biochips*, ou *microarrays*, consistem em microplacas de vidro especial onde são depositadas milhares de seqüências de DNA, correspondentes a diferentes locais do genoma. Sobre estas, são hibridizadas outras seqüências de ácidos nucleicos, marcadas com fluorescência, a qual é detectada por leitura em *scanners* a laser. O resultado permite obter dados sobre as seqüências hibridizadas no *biochip*, tanto em relação à presença de determinada porção do material genético, como em relação à expressão gênica, dependendo da amostra utilizada. Em geral, os *biochips* são empregados para análise da expressão gênica. Neste caso, extrai-se RNA do tecido de interesse, a partir do qual se gera DNA (chamado cDNA). Este, posteriormente, é submetido à hibridização com as seqüências da placa. Os pontos onde houve e onde não houve hibridização são identificados por fluorocromos de cores diferentes. A hibridização de uma determinada seqüência indica a expressão da mesma no tecido que forneceu o RNA.

Já disponível para uso em processos patológicos clonais (tumores), ainda em nível de pesquisa, o estudo do transcritoma (mRNAs) em *microarrays*, permite a identificação de quais genes estão ativos no tecido tumoral, através do estudo de milhares de genes de uma só vez. Através disso, é possível não só compreender mais sobre a base molecular daquele tumor específico, mas também identificar precocemente a atividade tumoral em determinado tecido. O uso desta tecnologia no diagnóstico e prognóstico de diferentes tipos de tumores, como câncer de mama, já está em fase de validação.

Perspectivas da Medicina genômica:

A expectativa é de que, de posse do genoma, transcritoma e proteoma (conjunto total de proteínas), possuiremos um entendimento crescente e detalhado dos mecanismos de instalação e progressão das doenças, abrindo perspectivas de melhor tratamento e até mesmo de cura. A medicina tornar-se-á mais personalizada, passando a ser baseada no conhecimento detalhado das variações genômicas de cada pessoa. A ênfase da medicina pós-genômica será principalmente preventiva: sabendo do mapa das predisposições genéticas características de cada indivíduo, será possível modificar seu estilo de vida, para que seja impedido o aparecimento da doença.

Outros exemplos de possíveis aplicações do conhecimento obtido e das tecnologias desenvolvidas com o projeto genoma humano, bem como suas conseqüências, podem ser vistas na tabela a seguir:

Tabela 11.3 Previsões sobre o Impacto da Genômica na Medicina*	
Alvo da Pesquisa Genômica	Impacto Previsto
Definir a lista completa dos genes humanos e das proteínas codificadas por eles.	Milhares de novos alvos terapêuticos para doença cardíaca, câncer, diabetes, asma, etc.
Definir os polimorfismos comuns no genoma, determinar os fatores hereditários virtualmente em todas as doenças comuns e refinar a tecnologia para a genotipagem de baixo custo.	Medicina preventiva personalizada com base no risco genético individual. Farmacogenômica para melhorar a eficácia e diminuir a toxicidade dos medicamentos. A avaliação de riscos ambientais à saúde tornar-se-á específica de cada indivíduo (medicina personalizada).
Definir os sinais regulatórios que afetam a expressão dos genes humanos nos estados normais e anormais.	Terapias para os defeitos do desenvolvimento embrionário. Oncogenômica: escolha do tratamento no câncer baseada na tipagem genômica dos tumores.
Definir as estruturas das proteínas humanas.	Medicamentos desenhados quimicamente com base na estrutura tridimensional dos alvos.
Definir necessidades, bem como desenvolver vetores seguros e específicos para a transferência dos genes exógenos aos vários tecidos.	Terapia gênica de várias doenças genéticas e de algumas doenças comuns.
Definir as implicações éticas, legais e sociais da pesquisa genômica.	Legislação para impedir a discriminação genética e proteger a privacidade da informação genômica. Mecanismos regulatórios dos testes genéticos e da prática da medicina genômica. Estabelecimento da genética como a esteio da prática da medicina e "alfabetização genética" dos clínicos e pacientes.

“A era da medicina genômica está aqui; o seqüenciamento do genoma humano apenas marca a cerimônia de início.”

Mais informações sobre o projeto genoma humano podem ser encontradas nos sites:

www.hugo-international.org

www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human

www.genome.gov