

# Biologia

PROFESSOR FLÁVIO LANDIM



## TESTE DE DNA E PROJETO GENOMA

### EXAME DE DNA

O exame de DNA foi desenvolvido em 1984 pelo pesquisador inglês Sir Alec Jeffreys na Universidade de Leicester, na Inglaterra, e utiliza como principais ferramentas as enzimas de restrição e a técnica de eletroforese.

#### COMO É FEITO O EXAME DE DNA

Tanto o espermatozoide quanto o óvulo, possuem apenas um cromossomo de cada par existente normalmente nas demais células corporais diploides. Assim, na formação do zigoto na fecundação, de cada par de cromossomos da criança, um cromossomo é de origem paterna e outro de origem materna.

Estes dois cromossomos que a criança tem (cromossomos homólogos), não são exatamente idênticos aos que o pai e a mãe têm, pois pode ter havido crossing-over (recombinação) durante a meiose paterna e materna, bem como acúmulo de mutações. Isto levaria a pequenas diferenças entre os cromossomos parentais e os do filho, mas estas diferenças são insignificantes no que diz respeito ao teste descrito a seguir.

O teste do DNA se inicia com o corte do DNA dos indivíduos envolvidos (criança, mãe e suposto pai) com **enzimas de restrição**. Os fragmentos gerados no corte serão separados através da técnica de eletroforese e posteriormente comparados.

## ASSUNTOS DA AULA.

Clique no assunto desejado e seja direcionado para o tema.

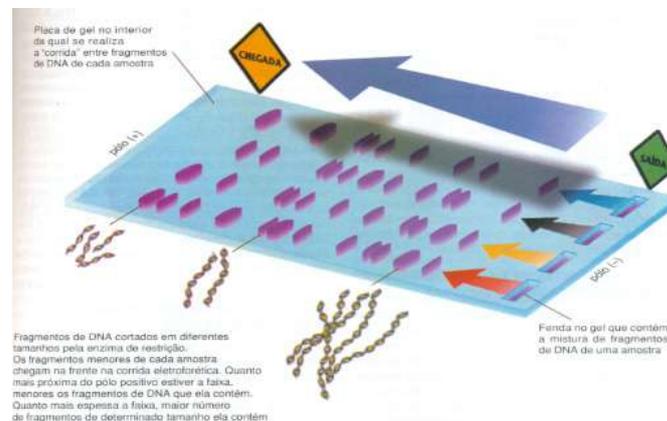
- [Exame de DNA](#)
- [Identificação de pessoas pelo DNA](#)
- [Detecção de fragmentos específicos de DNA](#)
- [As sequências de DNA utilizadas na identificação de pessoas](#)
- [Determinação de paternidade pela análise do DNA](#)
- [Exame de paternidade sem o pai](#)
- [Projeto Genoma Humano](#)
- [A técnica de sequenciamento](#)
- [Aconselhamento genético e prevenção de doenças hereditárias](#)

O processo de eletroforese é realizado em uma placa de gelatina especial (gel); a solução contendo os fragmentos de DNA é colocada em fendas em uma das extremidades do gel, à qual é conectado o polo negativo de uma fonte geradora de corrente elétrica; ao polo oposto do gel é ligado o polo positivo da fonte. A aplicação de uma diferença de potencial na placa de gel faz os fragmentos de DNA se deslocarem em direção ao polo positivo, uma vez que eles possuem carga elétrica negativa. O deslocamento dos fragmentos de DNA no gel é comparável a uma corrida de obstáculos (estes são representados pelas fibras que formam o gel); o DNA movimenta-se entre as fibras do gel e, quanto menor o tamanho dos fragmentos, maior a velocidade com que eles se deslocam.

Quando o campo elétrico é desligado, fragmentos de mesmo tamanho "estacionam" juntos em determinada posição na placa de gelatina, formando uma faixa, ou banda. A placa de gelatina é, então, tratada com uma solução de brometo de etídio ( $C_{21}H_2BrN_3$ ) que adere às moléculas de DNA, formando um complexo que emite luz quando iluminado com raios ultravioleta; assim, as bandas formadas pelos fragmentos de DNA podem ser visualizadas. Fotografias do gel obtidas sob iluminação ultravioleta, permitem aos pesquisadores analisar a posição de cada banda. Pela medida da distância relativa de migração das bandas, é possível calcular o peso molecular, e conseqüentemente o tamanho, dos fragmentos de DNA que as constituem.

## SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE FRAGMENTOS DE DNA

Os fragmentos de diferentes tamanhos, gerados pelo corte de um DNA com determinada endonuclease de restrição, podem ser separados uns dos outros por meio de uma técnica denominada eletroforese (do grego *phoresis*, ação de transportar, migração).



## IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS PELO DNA

A análise do padrão eletroforético de fragmentos de DNA, originados pelo corte com enzimas de restrição, é hoje o método mais seguro para identificar pessoas, sendo largamente utilizado em investigações policiais e em processos judiciais.

A comprovação de que era possível caracterizar moléculas de DNA por meio do padrão de fragmentos gerados pela digestão com endonucleases de restrição, levou a se pensar no emprego dessa metodologia para identificar pessoas. O raciocínio foi o seguinte: como as pessoas diferem entre si quanto ao material genético que possuem (com exceção dos gêmeos univitelínicos), a digestão do DNA de uma pessoa com uma endonuclease de restrição produzirá um padrão de fragmentos típico dela, comparável a um "código de barras" ou uma "impressão digital" molecular.

## DETECÇÃO DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS DE DNA

Nos organismos eucarióticos, o corte do DNA total do genoma por uma endonuclease de restrição produz tantos fragmentos, de tantos tamanhos diferentes, que é impossível visualizar bandas individuais na separação eletroforética: elas estão tão próximas umas das outras que aparecem como uma banda contínua ao longo do gelo. Por isso, é necessário utilizar técnicas especiais para evidenciar apenas certos tipos de fragmentos.

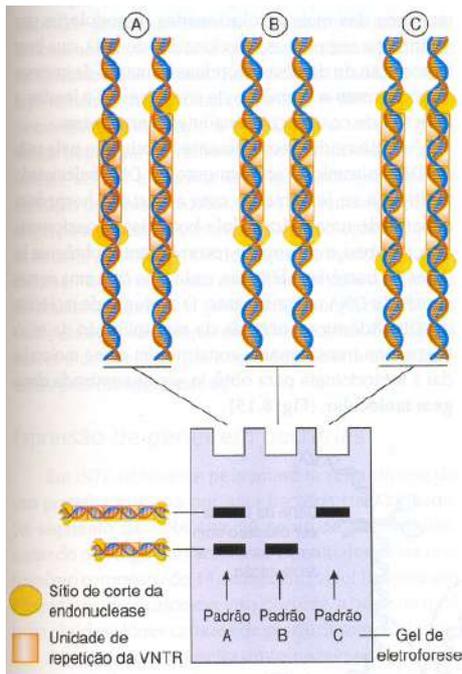
Uma dessas técnicas, chamada **hibridização molecular**, consiste em tratar o gel de modo a separar as cadeias duplas dos fragmentos de DNA e, em seguida, colocar sobre ele moléculas detectoras de sequências específicas, as chamadas **sondas de DNA**. Com isso, apenas determinadas bandas são evidenciadas e podem ser analisadas.

Tome nota:

## AS SEQUÊNCIAS DE DNA UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS

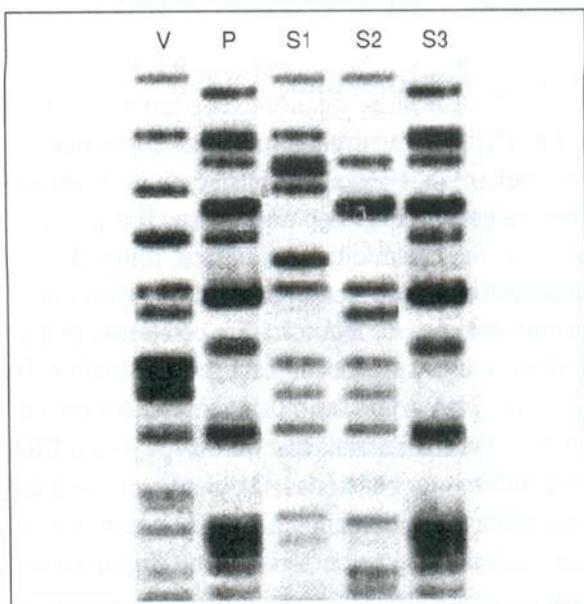
Os testes de identificação de pessoas pelo DNA utilizam sondas capazes de detectar trechos do DNA humano que variam muito entre as pessoas de uma população. Essas regiões, conhecidas pela sigla VNTR, iniciais da expressão inglesa variable number of tandem repeats (número variável de repetições em sequência), são constituídas por sequências curtas, de até algumas dezenas de pares de nucleotídeos, que se repetem ao longo de trechos da molécula de DNA. É o número dessas repetições que varia entre as pessoas, daí esses trechos do DNA serem chamados de VNTRs. Cerca de 50% do genoma humano é de VNTRs.

Suponha, por exemplo, que uma pessoa possua, em determinada região de um de seus cromossomos, um trecho VNTR com cinco repetições e no cromossomo homólogo, na região correspondente, um trecho com apenas três repetições. Ao ser cortado com uma enzima de restrição que atua sobre sequências que delimitam essas VNTRs, o DNA dessa pessoa produzirá fragmentos menores, correspondentes ao trecho com três repetições, e fragmentos maiores, correspondentes ao trecho com cinco repetições. Uma sonda que identifique essas VNTRs revelará, na separação eletroforética do DNA, duas bandas de tamanhos diferentes. Uma outra pessoa que possua em ambos os cromossomos VNTRs com três repetições, com a utilização da mesma sonda, apresentará apenas uma banda. Uma terceira pessoa com cinco repetições em cada cromossomo também apresentará uma única banda, porém localizada mais próximo do polo negativo, pois terá se deslocado menos durante a eletroforese devido ao seu maior tamanho.



Representação da detecção de VNTRs com diferentes quantidades de unidades de repetição em três pessoas. A pessoa A é heterozigótica quanto à VNTR, apresentando em um dos cromossomos 3 unidades de repetição e no cromossomo homólogo, 5 unidades. A pessoa B é homozigótica, apresentando em ambos os cromossomos homólogos 3 unidades de repetição. A pessoa C, também homozigótica, apresenta 5 unidades de repetição em cada um dos cromossomos do par de homólogos. Abaixo, representação da separação eletroforética dos fragmentos de DNA das três pessoas, gerados pela digestão com uma endonuclease cujos sítios de corte franqueiam a VNTR.

Em certos casos, um mesmo tipo de unidade de repetição está presente em diversas regiões do genoma, formando VNTRs de diversos tamanhos. Assim, quando se utiliza uma sonda capaz de revelar a sequência de bases dessas VNTRs, obtêm-se diversas bandas na separação eletroforética. É a combinação dos diversos tipos de bandas que caracteriza cada pessoa. Por exemplo, na figura é mostrado o padrão de bandas do DNA da vítima de um crime (V), do DNA extraído de um fio de cabelo encontrado no local do crime, tomado como prova (P), e dos DNAs de três suspeitos de terem cometido o crime (S1, S2 e S3). Nesse caso, as quatro amostras de DNA foram digeridas com a mesma endonuclease, e a separação eletroforética foi tratada com um mesmo tipo de DNA sonda, obtendo a imagem mostrada na foto. Observe que o padrão de VNTRs da prova é idêntico ao do suspeito 3 (S3), indicando que o fio de cabelo pertencia a ele. Essa técnica é conhecida como DNA fingerprint (ou "impressão digital" de DNA).



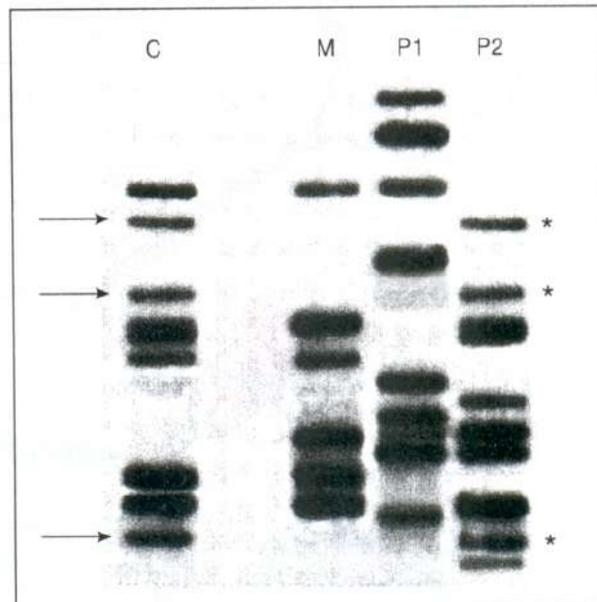
Padrões de VNTRs de quatro pessoas envolvidas em uma investigação policial e de uma prova encontrada no local do crime: (V) vítima; (P) prova; (S1, S2 e S3) suspeitos.

## DETERMINAÇÃO DE PATERNIDADE PELA ANÁLISE DO DNA

O exemplo anterior mostra que o teste de identificação de pessoas pelo DNA tem implicações éticas profundas: seu resultado pode ser fundamental na decisão de um julgamento ou na definição da paternidade de uma criança. O teste de paternidade foi um dos principais fatores de popularização da sigla DNA, mas hoje já se questiona se esse tipo de exame deve ser realizado livremente pelas pessoas. Em alguns países, a realização de tais exames sem solicitação explícita da justiça está sendo proibida com a justificativa de que os danos psicológicos que os resultados de tais testes

podem gerar aos envolvidos superam, em muitos casos, os benefícios que eles possam trazer.

A figura a seguir mostra o resultado de um teste de DNA de uma mulher (C), mãe de uma criança (M) cuja paternidade é disputada por dois homens (P1 e P2). Amostras de DNA dos quatro envolvidos foram tratadas com uma mesma enzima de restrição, submetidas à eletroforese em uma mesma placa de gel e tratadas com uma sonda para revelar um certo tipo de VNTR, o que resultou nos padrões de faixas mostrados na fotografia.



Padrões de VNTRs de quatro pessoas envolvidas em um teste de paternidade: (C) criança; (M) mãe; (P1 e P2) suspeitos de serem o pai.

Note que diversos fragmentos de DNA da criança (assinalados com as setas à esquerda) não estão presentes no DNA de sua mãe e, portanto, só podem ter vindo do pai. Apenas um dos homens (P2) apresenta esses fragmentos (assinalados com asteriscos à direita), o que indica ser ele o pai da criança. Com base na estimativa da frequência de cada tipo de VNTR na população e do número utilizado em diagnóstico (três, em nosso exemplo), pode-se estimar o grau de confiabilidade do teste, em geral bastante alto, ultrapassando os 99,9%.

## EXAME DE PATERNIDADE SEM O PAI

Da mesma maneira que o material genético do filho é proveniente do material do pai, havendo profundas semelhanças entre estes materiais genéticos (aliás, a diferença existente entre os cromossomos do filho e do pai e mãe diz respeito apenas ao *crossing-over* e eventuais mutações), o material genético do filho é proveniente do material do avô ou avó. Desta maneira, a análise do DNA destes parentes (ou mesmo de tios, cujo material genético em um cromossomo é bastante semelhante ao do pai) pode fornecer um esclarecimento sobre a paternidade da criança. O ideal seria um irmão do suposto pai ou um filho do suposto pai, o que seria melhor que um pai do suposto pai, por exemplo. Isto porque do suposto avô até o indivíduo, tem-se duas passagens onde pode haver variação (avô-pai e pai-filho). Com o suposto tio, só há uma passagem de variação (pai-filho), sendo mais exata esta comparação.

## OUTRAS UTILIDADES PARA O EXAME DE DNA

Esta mesma técnica de teste de DNA por hibridização tem outras utilidades:

- Identificação de relações evolutivas entre espécies: a hibridização de DNA entre espécies distintas pode mostrar o grau de coincidência entre os materiais genéticos, e, conseqüentemente, o grau de parentesco evolutivo.
- Identificação de cadáveres mutilados ou carbonizados: simplesmente compara-se o DNA do cadáver com de um suposto parente próximo, se há hibridização entre os DNA, o parentesco é confirmado.
- Identificação de criminosos por porções do corpo como dentes, esperma ou fios de cabelo; compara-se o DNA do pedaço com o do suspeito; se há hibridização, pode-se confirmar a origem do material encontrado. Esta técnica de identificação é conhecida como **DNA fingerprint** (ou "impressão digital" de DNA), sendo extremamente precisa.

Tome nota:

### Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida em 1985 pelo bioquímico Kary Mullis. Essa técnica propiciou um aumento muito grande na eficiência da análise do material genético. Pela PCR promove-se a duplicação de trechos do DNA *in vitro*, usando polimerases do DNA. A **Taq DNA polimerase**, também denominada **Taq polimerase** ou apenas **Taq**, é uma DNA polimerase termoestável, utilizada na na amplificação de fragmentos de DNA na técnica de PCR. O seu nome é devido a ter sido identificada pela primeira vez na bactéria *Thermus aquaticus*, uma extremófila encontrada em fontes hidrotermais. A Taq polimerase suporta as elevadas temperaturas usadas em PCR, tendo uma meia-vida enzimática de 40 minutos (a 94°C).

Antes da PCR, para se detectar genes ou DNA lixo havia necessidade de grande quantidade de DNA-alvo, o que nem sempre era possível. Essa dificuldade foi resolvida com a introdução da técnica de PCR, que possibilitou a obtenção de quantidades muito grandes de fragmentos específicos do DNA por meio da amplificação em ciclos.

## PROJETO GENOMA HUMANO

O Projeto Genoma Humano teve início oficialmente em outubro de 1990, com a publicação de um plano de pesquisa cujo objetivo era determinar a sequência de todos os nucleotídeos dos 24 cromossomos constituintes do genoma humano (os 22 autossomos e os cromossomos sexuais X e Y). Além disso, outro objetivo do projeto era identificar todos os genes humanos. No plano inicial estava previsto o desenvolvimento de técnicas para análise dos dados e de normas para os problemas éticos, legais e sociais que certamente iriam surgir com o aumento de conhecimento na área. Previa-se, também, o sequenciamento do genoma de organismos usados como modelo na investigação biológica, como a bactéria *Escherichia coli*, o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans*, a mosca *Drosophila melanogaster* e o camundongo *Mus musculus*, entre outros.

O projeto foi iniciado por duas agências governamentais norte-americanas, o Departamento de Energia e o Instituto Nacional de Saúde (NIH), com a participação de universidades e institutos de pesquisa de diversos países. Em maio de 1998, uma companhia particular fundada especialmente para esse fim, a Celera Genomics, entrou na disputa pela pesquisa sobre o sequenciamento do genoma humano, prevendo completá-lo em apenas três anos, o que significava quatro anos antes do previsto pelo consórcio público. A principal diferença entre os dois projetos era o método utilizado para a determinação das sequências de nucleotídeos.

A estratégia do consórcio público era dividir cada cromossomo em grandes fragmentos e determinar a sequência de nucleotídeos de fragmentos adjacentes. A Celera adotou a estratégia de partir todo o genoma em pequenos fragmentos, sequenciar cada um deles e, em seguida, ordená-los por meio da sobreposição de suas extremidades, o que demandaria a utilização de poderosos computadores e sofisticados programas de computação. Outra diferença é que a Celera não pretendia tornar públicos os dados obtidos, mas patenteá-los e comercializá-los.

Tendo em vista a possibilidade de uma empresa particular tornar-se proprietária exclusiva de um patrimônio da humanidade - o genoma humano -, o consórcio público redobrou os esforços para concluir

o projeto em menor tempo. Finalmente, em 26 de junho de 2000, os pesquisadores Francis Collins (líder do consórcio público) e Craig Venter (presidente da Celera Genomics) anunciaram na Casa Branca, sede do governo dos Estados Unidos da América, na cidade de Washington, a conclusão de um esboço geral do genoma humano. Os trabalhos relatando a conclusão do sequenciamento foram publicados nas revistas científicas *Science* (a parte realizada pela Celera) e *Nature* (a parte realizada pelo consórcio público) em fevereiro de 2001.

O genoma humano é constituído por cerca de 3 bilhões de pares de nucleotídeos. Para se ter idéia do que isso representa, se escrevêssemos a sequência de iniciais das bases (A, T, C e G) de apenas uma das cadeias do DNA humano em tipos bem pequenos, preencheríamos mais de 200 volumes equivalentes a grossas listas telefônicas.

Apenas 3% dos 3 bilhões de pares de bases do genoma humano correspondem a genes; 97% são sequências não-codificantes, isto é, não transcritas para moléculas de RNA. O número total de genes humanos - entre 30 mil e 40 mil - é bem menor do que se imaginava. Isso nos coloca em pé de igualdade com os camundongos e pouco acima das moscas quanto ao número de genes, cujo genoma possui apenas 13 mil genes. Assim, a quantidade de genes não é o que faz a diferença, e sim como eles funcionam e suas relações entre si e com o ambiente.

O sequenciamento do DNA humano revelou que muitos de nossos genes são semelhantes aos de bactérias e de vírus. Cerca de 40% de nossos genes são semelhantes aos dos vermes nematódeos, 60% são semelhantes aos de moscas e nada menos que 90% de nossos genes são semelhantes aos dos camundongos. Diferimos de nosso parente mais próximo, o chimpanzé, em apenas 1% das sequências de DNA, ou seja, em apenas um par de bases nitrogenadas a cada 100 pares.

Os esforços para o sequenciamento do genoma humano têm levado a um grande desenvolvimento tecnológico, o que facilita o sequenciamento de genomas de outras espécies de interesse. No Brasil, o primeiro genoma a ser totalmente sequenciado foi o da bactéria *Xyella fastidiosa*, espécie que causa a doença dos laranjais conhecida como amarelinho. Outros projetos genomas têm sido desenvolvidos em diversos esta-

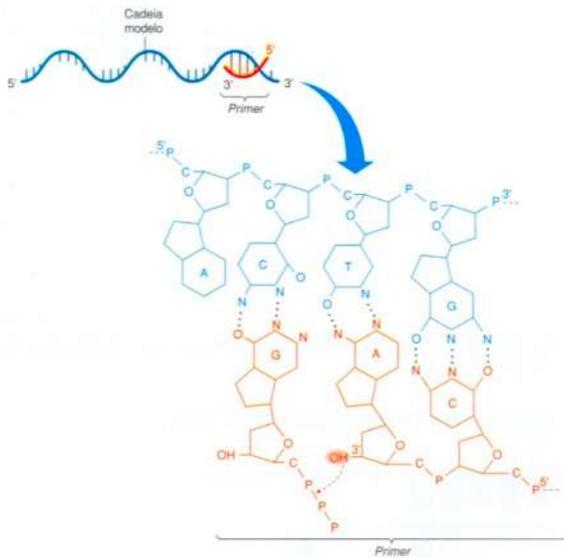
## A TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO

A determinação da sequência de bases nitrogenadas de uma cadeia de DNA baseia-se em princípios engenhosos, que apresentamos a seguir. Como ponto de partida, vamos lembrar como ocorre a síntese da cadeia complementar de nucleotídeos durante a duplicação do DNA. A síntese do DNA é catalisada por uma enzima denominada DNA polimerase, que orienta o emparelhamento de nucleotídeos livres a uma cadeia modelo de DNA, unindo os nucleotídeos à medida que eles são ordenados.

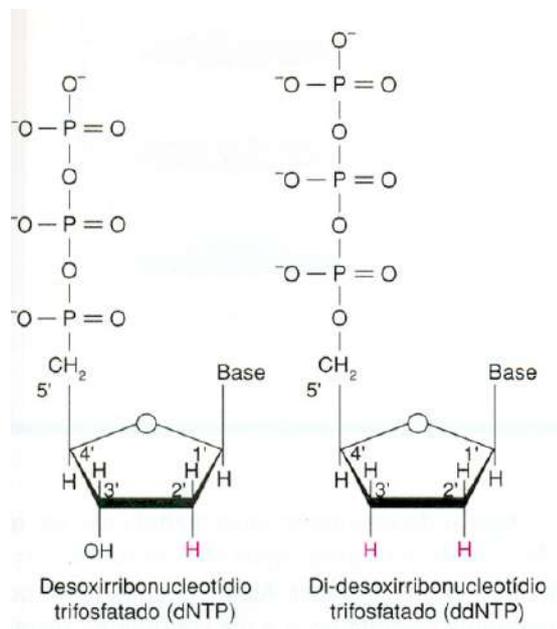
A polimerase do DNA não consegue iniciar, sozinha, a síntese de uma cadeia de DNA. Ela necessita de uma pequena cadeia de nucleotídeos, denominada sequência primer, emparelhada à cadeia modelo, para promover a incorporação de nucleotídeos livres a uma das extremidades do *primer*, onde se encontra a hidroxila (-OH) livre do carbono 3' da desoxirribose do último nucleotídeo.

A hidroxila livre do carbono 3' participa da ligação ao nucleotídeo seguinte, que permite a cadeia crescer. Se o último nucleotídeo de uma cadeia de DNA em processo de síntese não possuir uma hidroxila no carbono 3', a síntese será interrompida, pois não há como ligar o nucleotídeo seguinte.

O sequenciamento de uma cadeia de DNA baseia-se justamente na interrupção da síntese da cadeia complementar, pela incorporação de nucleotídeos modificados quimicamente. Esses nucleotídeos diferem dos normais por não possuir a hidroxila no carbono 3' de suas pentoses, que são, portanto, didesoxirriboses (possuem dois átomos de oxigênio a menos que a ribose).



Representação da síntese de uma cadeia de DNA complementar a uma cadeia-modelo a partir de *primer*. Acima, visão geral da cadeia-modelo associada ao *primer*. Abaixo, detalhe da região de incorporação dos novos nucleotídeos.



À esquerda, estrutura molecular de um desoxirribonucleotídeo normal e, à direita, de um didesoxirribonucleotídeo utilizado para interromper a síntese do DNA nas reações de sequenciamento.

Tome nota:

Um didesoxirribonucleotídeo, quando incorporado a uma cadeia polinucleotídica por ação da polimerase do DNA, impede a incorporação do nucleotídeo seguinte, interrompendo a síntese da cadeia nesse ponto. A razão dessa interrupção deve-se ao seguinte: como é a hidroxila do carbono 3' da pentose que estabelece a união com o fosfato do próximo nucleotídeo a ser incorporado na cadeia em crescimento, sua ausência no didesoxirribonucleotídeo impede a reação de união, e a síntese da cadeia é interrompida.

Em linhas gerais, o processo de sequenciamento consiste na síntese de cadeias complementares aos segmentos de DNA cuja sequência de bases nitrogenadas se quer determinar, na presença de pequenas quantidades de cada um dos tipos de di-desoxirribonucleotídios, misturados aos nucleotídios normais. Após algum tempo, a reação é interrompida e o meio é alcalinizado, o que desfaz as pontes de hidrogênio e separa as cadeias modelos das cadeias complementares sintetizadas. Essas serão de diversos tamanhos, em decorrência da incorporação aleatória dos di-desoxirribonucleotídios e da consequente interrupção da síntese em diferentes pontos da cadeia.

O passo seguinte é organizar, pelo tamanho, os fragmentos de DNA obtidos na reação de sequenciamento, o que é feito por meio da técnica de eletroforese. A técnica de eletroforese utilizada no sequenciamento é sensível a ponto de separar fragmentos que diferem em tamanho por um único nucleotídeo.

Cada um dos quatro tipos de didesoxirribonucleotídeo da mistura de reação está unido a um tipo particular de fluorocromo, uma substância que emite luz de uma cor específica quando excitado por laser. Em geral, o fluorocromo associado à timina emite luz vermelha, o associado à adenina emite luz verde, o associado à citosina emite luz azul e o associado à guanina emite luz amarela. Dessa maneira, é possível identificar, pela cor que o fluorocromo emite quando excitado por laser, qual foi o último nucleotídeo incorporado em um fragmento de DNA cuja síntese foi interrompida. Assim, se um fragmento emitir luz vermelha, saberemos que o didesoxirribonucleotídeo que interrompeu sua síntese possuía a base timina. Se determinarmos o tamanho desse fragmento de DNA, saberemos a posição dessa timina na cadeia; por exemplo, se ele tiver oito nucleotídios, saberemos que a oitava base nitrogenada da cadeia é a timina. Suponha que na síntese interrompida de um segmento de DNA foram obtidos os seguintes fragmentos: de cor verde com seis nucleotídios, de cor vermelha com sete nucleotídios, de cor vermelha com oito nucleotídios, de cor azul com nove nucleotídios e de cor amarela com dez nucleotídios. Pode-se concluir, então, que a sequência de bases nitrogenadas nas posições 6, 7, 8, 9 e 10 da cadeia que está sendo sintetizada é ATTCG e que na região correspondente da cadeia-modelo a sequência é TAAGC.

Quando são iluminados por raios laser, as faixas correspondentes aos fragmentos de diferentes tamanhos brilham em diferentes cores, indicativas do último nucleotídeo marcado incorporado. Com isso, determina-se a sequência de bases da cadeia sintetizada e, conseqüentemente, da cadeia modelo, que lhe é complementar.



Representação da técnica de sequenciamento do DNA por meio da interrupção aleatória da síntese da cadeia complementar pela incorporação de didesoxirribonucleotídios.

## LEITURA COMPLEMENTAR

---

### Projeto Genoma Humano

"Enfim, a longo prazo, digamos, 30 anos, o sonho dos cientistas é poder 'consertar' o que houve de errado no genoma humano. Todos esses avanços trarão, certamente, inúmeras questões de ordem ética, moral, filosófica, cultural e religiosa, as quais deverão ser transpostas pelo conhecimento a ser ainda adquirido".

Decifrar códigos sempre foi um desafio para a espécie humana; por isso, 12 de fevereiro de 2001 ficará marcado por décadas e talvez até séculos na história da humanidade, haja visto que neste dia foi revelado o segredo da constituição humana - a ordem correta das substâncias bioquímicas que compõem o seu código genético.

Resultado de uma jornada de 15 anos de pesquisas em centenas de laboratórios espalhados por mais de 20 países do mundo todo, com o mesmo objetivo: decifrar o código da vida.

O ser humano, quando recém-nascido, tem 26 bilhões de células; já o adulto, cerca de 50 trilhões. No centro de cada uma delas, está o nosso genoma.

O termo genoma refere-se ao conteúdo total de material genético de um organismo, seja este uma bactéria ou um ser humano. Desvendar os segredos do genoma humano, por razões óbvias, era um projeto ambicioso, mas um projeto que concentrou toda a energia da comunidade científica para dentro de nós mesmos – ou melhor ainda, para o centro de cada das células que compõem o organismo humano.

Com esta missão, um grupo de pesquisadores liderados pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) e pelo Departamento de Energia Norte Americano (DOE) se uniram para realizar uma jornada que, de tão ambiciosa, acabou se transformando em um dos maiores marcos científicos de todos os tempos: o sequenciamento do genoma humano.

Imagine um livro - o Livro da Vida - ou enciclopédia de 23 volumes, com um total de três bilhões de letras, todas exclusivamente A, C, T e G. O longo texto desta enciclopédia é composto por essas quatro letras, que se estendem por todos os volumes, e a maior dificuldade para sua leitura consistiria em que os textos não vêm com as habituais separações de parágrafos e pontuações: a leitura seria contínua e sem interrupções. Agora, imagine que apenas 5% desses três bilhões de letras impressas realmente contivessem a mensagem fundamental do livro, e os outros 95% fossem compostos por enormes parágrafos desnecessários.

De forma didática, nosso genoma pode ser comparado a esta grande enciclopédia. Cada um dos 23 volumes seria um de nossos 23 cromossomos. Cada capítulo representaria um fragmento de DNA, porém 95% dos capítulos não teriam grande interesse (os chamados introns), já que somente 5% deles trariam a mensagem fundamental do enredo da vida, ou seja, os genes. Portanto, só 5% do nosso genoma realmente codifica para proteínas, sendo considerado os carros-chefe da maioria das funções biológicas.

O primeiro passo para desvendar este mistério seria: descobrir em qual ordem a natureza posicionou esta sequência de três bilhões de A, C, T e G, segredo guardado a sete chaves por milhões de anos de evolução.

Após 15 anos de trabalho, dos quais 5 anos foram resultantes de iniciativas isoladas de pesquisadores e dez, de uma colaboração científica internacional coordenada pelo Human Genome Organization (HUGO), esta ordem foi finalmente revelada em 12 de fevereiro de 2001. Inicialmente, o prazo previsto para a conclusão do trabalho deste grupo colaborativo - que começou a trabalhar oficialmente em 1990 - era de 15 anos, ou seja, 2005. Esta meta tomou ares de competição há três anos, com a entrada de uma empresa privada na corrida pelo ouro genético, a CELERA, que como o próprio nome diz, veio com a proposta de aCELERAR o processo de sequenciamento. A empresa não apenas conseguiu isto, como fez o projeto público, conhecido como Projeto Genoma Humano propriamente dito, acelerar seus passos, sob pena de inutilizar os três bilhões de dólares investidos no HUGO.

Em junho de 2000, os líderes de ambos os grupos, Francis Collins (público) e Craig Venter (privado), concordaram em revelar, juntos, para o mundo, que tinham praticamente concluído suas tarefas. Fazendo uso das duas mais importantes revistas científicas internacionais – *Science* e *Nature* – colocaram na Internet, e portanto, à disposição de qualquer pessoa, as respectivas sequências do genoma humano. Se não existisse o Projeto Genoma Humano, muito possivelmente não teríamos acesso, hoje, às páginas deste livro, que certamente estariam coladas pelas amarras do patenteamento.

As descobertas são muitas. As estimativas quanto ao número de genes da espécie humana giravam em torno de cem mil. Porém, o número de genes encontrados por ambos os grupos de pesquisa do genoma humano é de 30 mil, ou seja, 1/3 do que sempre foi estimado. Atualmente, já é possível saber se um indivíduo nascerá ou nasceu com: predisposição a ter filhos com determinada(s) doença(s), ou se ele mesmo desenvolverá esta(s) doença(s). Existem pelo menos 12 mil doenças genéticas diferentes, das quais, com certeza, a maioria delas a sociedade nunca ouviu falar -, como consequência futura, a Medicina, que hoje é quase na totalidade uma medicina terapêutica, se tornará uma ciência preditiva.

Num segundo momento, em torno de dez anos, o conhecimento completo do material genético permitirá medicações individualizadas a cada paciente. Saberemos se a pessoa vai aceitar ou não o medicamento, que poderá ser mais específico e com menos efeitos colaterais.

Enfim, a longo prazo, digamos, 30 anos, o sonho dos cientistas é poder 'consertar' o que houve de errado no genoma humano. Todos essa avanços trarão, certamente, inúmeras questões de ordem ética, moral, filosófica, cultural e religiosa, as quais deverão ser transpostas pelo conhecimento a ser ainda adquirido.

Acredito que boa parte das respostas para os enigmas mais cruciais do ser humano - "De onde viemos", "Quem somos" e "Para onde iremos" - poderão ser, pelo menos, parcialmente respondidas quando compreendermos a real mensagem que este "livro da vida" chamado genoma pode nos revelar.

Jornal do Conselho Federal de Medicina. nº 132; janeiro/ fevereiro de 2002

Por Salmo Haskin - membro do HUGO - Human Genome Organization

**Tome nota:**

## E AGORA?

O **Projeto Genoma Humano** entrou hoje numa nova fase: o Projeto Proteoma Humano, que tem por objetivo identificar cada uma das proteínas codificadas por cada um dos genes humanos. Como existem 20 aminoácidos na composição das proteínas, deve ser bem mais complicado do que o mapeamento do DNA. O primeiro desafio do Projeto Proteoma é identificar todas as proteínas que estão efetivamente em atividade em uma célula, tecido ou órgão, no seu estado normal, e depois analisar as suas variações nas diferentes situações fisiológicas ou patológicas. Isto será uma tarefa simples de resolver com as técnicas já dominadas pelos cientistas hoje. A tarefa mais difícil, e ainda muito longe de ser alcançada, será o entendimento das vias e circuitos de integração que as células usam para enviar mensagens da membrana para o núcleo e do núcleo para outros compartimentos celulares e vice-versa. Assim, os benefícios palpáveis advindos do sequenciamento do genoma humano, como a terapia genética, a fabricação de medicamentos específicos para cada paciente e a fabricação de medicamentos que alterem o DNA demorarão um certo tempo para serem evidenciados.

O aspecto ético, inclusive, ainda tem muito que ser debatido. Por exemplo, o mapeamento genético de um indivíduo pode indicar doenças futuras

que podem se desenvolver ou não. Há genes para propensão ao câncer ou ao alcoolismo que podem ou não conduzir às respectivas doenças. Será que não haveria uma discriminação aos portadores de tais genes ao se tentar, por exemplo, uma vaga num emprego? Será que não estaremos criando uma nova modalidade de discriminação, a discriminação genética? E nos casos dos genes que levam a doenças genéticas letais e incuráveis? Será que você iria querer saber precocemente que seu material genético está determinando, inexoravelmente, a sua morte em alguns anos?

Quanto ao mapeamento genético para a detecção de genes defeituosos em embriões usados em fertilização *in vitro*, quem determinará quais genes deverão ser considerados defeituosos ou não? De repente, será eticamente correto descartar um embrião por ele ter um gene para albinismo? Ou para calvície? Ou mais à frente, será que o embrião não será descartado simplesmente por ter genes para olhos castanhos quando os pais queriam olhos azuis?

Há certo receio de que se instituem em algumas sociedades preceitos de **Eugenia** baseados em análises de genomas, tema muito explorado na ficção científica em livros e filmes como GATTACA (que fica aqui como sugestão para quem quer dar uma descansada depois de estudar...).

Tome nota:

## Eugenia

O termo **Eugenia** (do grego “bem-nascido”) foi cunhado em 1883 pelo inglês Francis Galton para definir o estudo dos agentes sob o controle social que podem melhorar ou empobrecer as qualidades raciais das futuras gerações, seja física ou mentalmente. Na prática, a Eugenia visa a eliminação de defeitos genéticos de uma população.

Mesmo com a cada vez maior utilização de técnicas de melhoramento genético usadas atualmente em plantas e animais, ainda existem questionamentos éticos quanto a seu uso com seres humanos, chegando até o ponto de alguns cientistas declararem que é de fato impossível mudar a natureza humana.

Eugenia é um tema bastante controverso, sendo considerada prática de eugenia a eliminação de recém-nascidos com deficiências físicas em sociedades tão distintas quanto a da cidade-estado de Esparta, na Grécia Antiga, e a de várias tribos indígenas na América. Princípios eugenistas foram utilizados de maneira radical e deturpada na Alemanha Nazista das décadas de 1930 e 1940, com sua política de “higienização racial” que promovia a esterilização compulsória de diversos grupos considerados inadequados para a reprodução, como criminosos, deficientes mentais e deficientes físicos. A Eugenia nazista acabou culminando com a eliminação sistemática de vários grupos considerados racialmente inferiores pela ideologia de pureza racial de Hitler, levando ao Holocausto judeu na Segunda Guerra Mundial.

Desde seu surgimento até os dias atuais, diversos filósofos e sociólogos declaram que existem diversos problemas éticos sérios na eugenia, como a discriminação de pessoas por categorias, pois ela acaba por rotular as pessoas como aptas ou não-aptas para a reprodução.

# ACONSELHAMENTO GENÉTICO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS

## ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Diversas doenças humanas são hereditárias. O estudo dos genótipos de um casal e de seus parentes permite, em certos casos, estimar a chance de uma criança ser afetada por uma doença já manifestada em alguns membros da família. Pelo estudo dos heredogramas, especialistas no campo da Genética Humana podem orientar um casal sobre os riscos de virem a ter filhos com alguma doença hereditária; esse tipo de orientação constitui o aconselhamento genético.

Um casal só deve se preocupar em procurar aconselhamento genético se já teve alguma criança com problemas ou se tiver parentes próximos afetados por doenças genéticas. Mulheres com mais de 35 anos que desejam engravidar devem procurar um serviço de aconselhamento genético, pois o risco de gerar filhos com número anormal de cromossomos aumenta significativamente depois dessa idade.

## IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE ALELOS DELETÉRIOS

Alelos que causam doenças, ou que diminuem a taxa de sobrevivência ou de reprodução de um organismo, são genericamente chamados de alelos deletérios. Muitos alelos deletérios presentes nas populações humanas surgem por mutações de alelos normais, comportando-se como recessivos. Para calcular o risco de uma doença genética recessiva se manifestar, os geneticistas tentam descobrir se os pais são ou não portadores do alelo para a doença. A maioria das crianças com problemas causados por alelos recessivos têm pais normais. Todas as pessoas têm pelo menos alguns alelos deletérios, os quais só não se manifestam porque estão em dose simples, isto é, na condição heterozigótica.

Atualmente já é possível, em relação a algumas doenças genéticas, descobrir se uma pessoa é portadora ou não de um alelo deletério recessivo em condição heterozigótica. Por exemplo, um teste bioquímico relativamente simples permite descobrir se uma pessoa normal é portadora do alelo recessivo que condiciona a doença de Tay-Sachs, uma enfermidade fatal. Pessoas heterozigóticas para anemia falciforme também podem ser identificadas em um exame de sangue simples e barato, o que ajuda a evitar o nascimento de crianças afetadas por essa enfermidade.

É cada vez maior o número de genes deletérios identificados pelas novas técnicas de análise do DNA, o que vem se constituindo em uma poderosa ferramenta de auxílio ao aconselhamento genético. Nesses casos, a partir de uma única célula de um embrião, pode-se determinar se ele terá ou não uma doença genética grave. Nos casos de fertilização *in vitro*, em que existe chance de os filhos terem herdado determinado alelo deletério, costuma-se realizar exame de DNA de uma célula dos embriões antes da implantação no útero da mãe. Dentre os embriões analisados, o especialista escolhe apenas os geneticamente saudáveis para serem implantados.

## CONSANGUINIDADE

A probabilidade de alelos deletérios recessivos encontrarem-se, originando uma pessoa homozigótica doente, aumenta nos casamentos consanguíneos, em que as pessoas que se casam são parentes próximos, tais como primos em primeiro grau. Pessoas aparentadas, por terem herdado seus genes de ancestrais comuns, têm maior chance de possuir um mesmo tipo de alelo "familiar" que pessoas não-aparentadas.

Diversas culturas têm leis que proíbem ou desaconselham o casamento entre parentes próximos. Essas leis surgiram, provavelmente, da observação empírica de que defeitos presentes ao nascer são mais comuns nos casamentos entre parentes. Problemas causados por casamentos consanguíneos também podem ser observados nos animais domésticos e de zoológico, cuja pequena quantidade leva parentes próximos a serem cruzados entre si.

Tome nota:

## LEITURA COMPLEMENTAR

---

### Novo teste 'diferencia' gêmeos e pode solucionar casos de estupro e paternidade

Já se sabe que gêmeos idênticos não são totalmente iguais. Mas, até agora era quase impossível diferenciar o DNA destes gêmeos. Mas, um laboratório da Alemanha elaborou um novo exame de DNA que seria capaz de fazer essa diferenciação e que promete ajudar a esclarecer crimes não solucionados ou questões de paternidade.

Um exemplo de crime que pode ser resolvido com o novo teste é o caso dos estupros de seis mulheres em Marselha, sul da França, ocorridos no fim de 2012. As provas, inclusive amostras de DNA, levaram a polícia a dois suspeitos, os gêmeos idênticos Elwin e Yohan, que não tiveram os sobrenomes revelados. As vítimas reconheceram os gêmeos, mas não conseguiram identificar qual dos dois tinha sido o estuprador. Os dois estão presos desde fevereiro de 2013; ambos se dizem inocentes e se recusam a culpar o outro. Quando foram presos, a imprensa deu a entender que os testes para determinar qual dos gêmeos deveria ser acusado seriam caros demais. Mas isso pode mudar, com ajuda dos cientistas especializados em pesquisa de genoma no laboratório Eurofins, em Ebersberg, Alemanha.

"O genoma humano é formado por um código alfabético de três bilhões de letras", explicou Georg Gradl, especialista em sequenciamento genético do laboratório. "Se o corpo está crescendo, ou um embrião está se desenvolvendo, então todos as três bilhões de letras precisam ser copiados". "Durante este processo de cópia no corpo acontecem 'erros de digitação'", disse o cientista se referindo a pequenas mutações.

Em exames de DNA tradicionais apenas uma pequena parte do código é analisada, o suficiente para diferenciar duas pessoas consideradas normais, mas não para diferenciar gêmeos idênticos. Gradl e sua equipe recolheram amostras de um par de gêmeos idênticos e analisaram toda a sequência de três bilhões de letras. Com isso, encontraram algumas dezenas de diferenças no DNA. Os cientistas também analisaram o filho de um dos homens e descobriram que ele herdou cinco destas mutações do pai. Após analisar os resultados, eles afirmam que agora podem diferenciar qualquer gêmeo idêntico do outro e os filhos destes gêmeos. A rapidez do resultado é importante nesses casos; o teste alemão leva um mês para ser concluído. Institutos de Criminalística da Europa, América Latina e Estados Unidos já pediram ajuda à Eurofins para solucionar dez casos diferentes. Gradl afirma que casos de estupro ou violência sexual envolvendo gêmeos são "mais frequentes do que nós esperávamos". Com frequência há vestígios de sêmen e, "nestes casos, nós podemos diferenciar".

A empresa não pode revelar em quais casos está trabalhando, mas Gradl admite que o caso de Marselha é "certamente um destes que gostaríamos de ajudar... e estamos convencidos que vamos conseguir (um resultado)".

(...)

Para Laura Walton-Williams, do Departamento de Ciência do Crime e Criminalística da Universidade de Staffordshire, na Grã-Bretanha, o teste de DNA da Eurofins é um grande avanço, e poderia ser usado até para descobrir se um gêmeo está envolvido no assassinato de um irmão idêntico, pois, pela primeira vez, será possível diferenciar o DNA da vítima e do suspeito. Mas, a especialista acredita que a Justiça precisará saber se este exame foi rigorosamente testado, e se o custo poderá influenciar na decisão de usá-lo ou não.

Até o momento a Eurofins não divulgou quando este exame de DNA vai custar

*Alison Gee do Serviço Mundial da BBC, 16 janeiro 2014.*



### NOTA DO PROF. LANDIM

“

O exame em questão não é um exame DNA fingerprint convencional, mas um mapeamento de DNA dos envolvidos para procurar discrepâncias através de mutações. Assim, continua valendo a ideia de que exames de DNA (DNA fingerprint, o exame de DNA convencional) não diferencia gêmeos univitelinos.”

Tome nota: