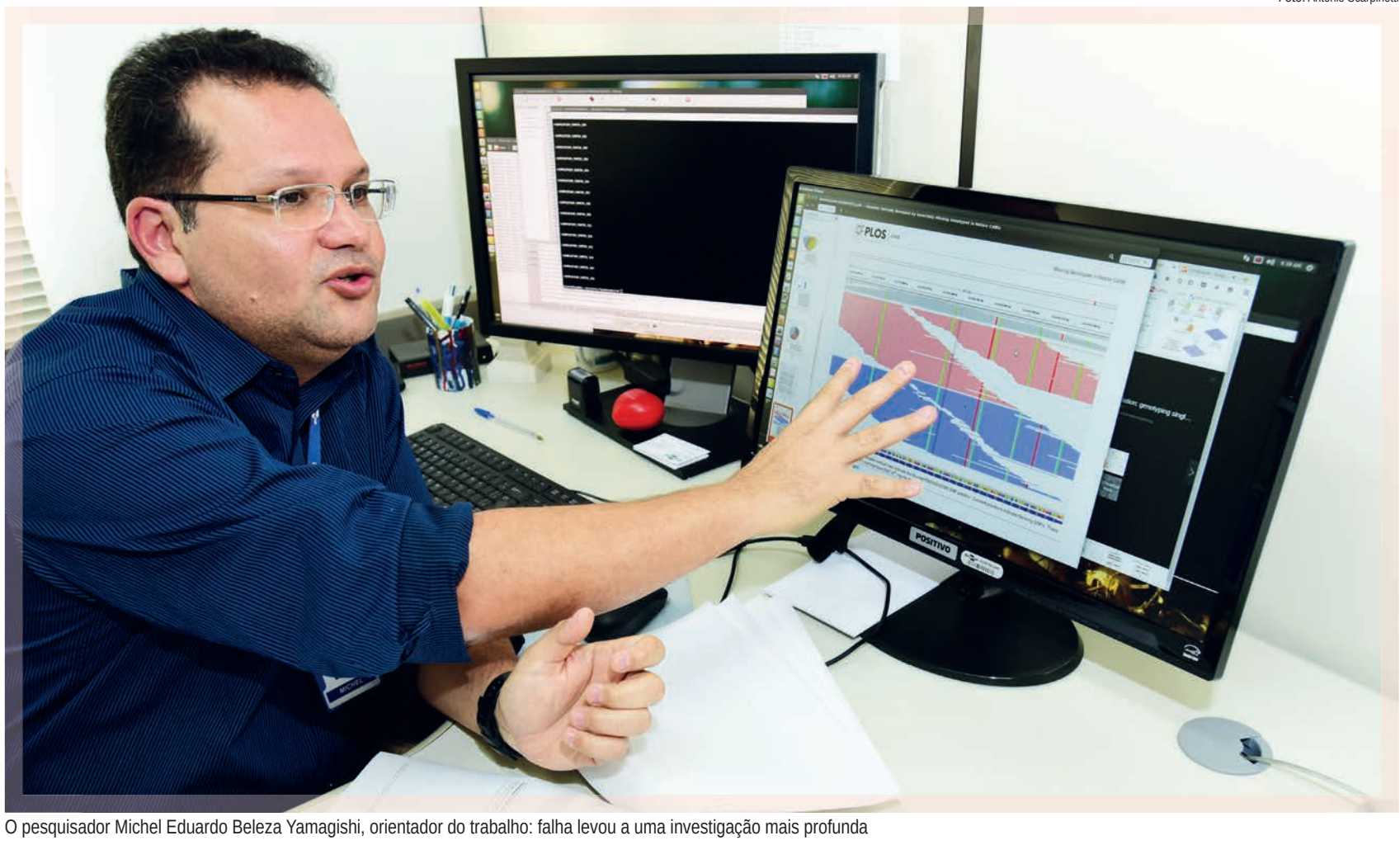
Análise de DNA de gado abre caminho para detecção de variações no genoma humano

Procedimento, que ocorreu causalmente, foi descrito em artigo no periódico "PLOS ONE"

CARLOS ORSI
carlos.orsi@reitoria.unicamp.br

Foto: Antonio Scarpinetti



O pesquisador Michel Eduardo Beleza Yamagishi, orientador do trabalho: falha levou a uma investigação mais profunda

Uma falha surpreendente, num procedimento comum de análise do DNA de gado nelore, abriu caminho para a descoberta de uma metodologia que pode revelar variações raras no genoma humano, ligadas a diversas doenças. O artigo que descreve o novo procedimento tem, como autor principal, o doutorando do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp Joaquim Manoel da Silva, e foi publicado no periódico online *PLOS ONE*.

O orientador de Silva e coautor do artigo na *PLOS*, pesquisador Michel Eduardo Beleza Yamagishi, do Laboratório Multiusuário de Bioinformática da Embrapa, conta que a descoberta aconteceu depois de um trabalho de genotipagem de nelore, realizado para identificar, numa população de animais, a presença de um tipo de variação genética já reconhecida na literatura – um SNP, ou *snip*, sigla em inglês para polimorfismo de nucleotídeo único –, apresentar resultado 100% negativo para alguns *snips*.

"A gente estava trabalhando com uma coleção de cerca de 1.700 animais, bovinos da raça nelore, que é importante para a pecuária nacional", lembrou o pesquisador. "E o Joaquim chegou para mim e disse: 'Olha, Michel, tem aqui uns *snips* que estão falhando em toda a população'. Perguntei: 'Como é que é?' E ele: 'Sim, tem *snips* que estão falhando em toda a população'. E eu: 'Não pode ser'".

Yamagishi lembra que o DNA é formado por uma fita dupla espiralada, composta por sequências complementares de nucleotídeos normalmente denominados pelas letras A,T,G e C. As duas metades da fita se ligam porque o nucleotídeo A se prende ao T, e o G, ao C. Os chamados chips de genotipagem contêm *probes* – "sondas", em inglês – com sequências de nucleotídeos que capturam as sequências complementares, presentes no material sob análise, e anunciam a detecção com um sinal luminoso. No caso da busca por *snips*, os *probes* contêm trechos de DNA construídos para detectar e capturar as variações desejadas.

"Com isso, você vai lá direto no *snip*, sem necessidade de um trabalho dispendioso de leitura do genoma inteiro", explica Yamagishi. "No nosso caso, esse é um trabalho de bioinformática, uma ciência relativamente nova, e que utiliza essa ferramenta, os chips de genotipagem. Temos o *probe* com a combinação das letrinhas, e aí o DNA, que tem a complementaridade, vai lá e hibridiza, gruda. E aí emite um sinal de luz. E é esse sinal de luz que depois é lido e transformado no que chamamos de genótipo".

Água do banho

"Em alguns casos, por diferentes motivos, há *probes* que não encontram o alelo complementar, não hibridizam", descreve o orientador. "Isso pode acontecer por uma série de motivos: erro na preparação da amostra, defeito de fabricação do chip, por exemplo. Então, o que se faz? O que vinha sendo feito até hoje? A gente usa métodos de imputação – ou seja, com a informação que temos das sequências ao redor, inferimos qual seria o genótipo naquela posição. E era esse o trabalho do Joaquim. Ele estava estudando imputação".

Surpreendente, a falha generalizada na detecção de alguns *snips*, difícil de explicar como simples erro ou evento fortuito, levou a uma investigação mais profunda. "A gente acreditava que o *snip* falhava por um problema na preparação do DNA, ou eventualmente um problema na placa... Então, fomos investigar isso, porque é algo muito difícil de acontecer. E descobrimos que os *snips* perdidos tinham informação relevante. Por quê? Porque estavam falhando de hibridizar justamente porque existia outra alteração na região do *probe*. Uma variação até então desconhecida, e inesperada, próxima da variação conhecida que estávamos tentando detectar."

Essa descoberta, alerta Yamagishi, mostra que a prática de descartar os resultados de genótipos perdidos, atribuindo a falha na hibridização dos *snips* a erros laboratoriais ou do chip, pode estar levando à destruição de informação genética relevante, incluindo a eventual descoberta de novos *snips*. "Estão jogando a criança fora com a água do banho", resumiu.

Potencial humano

No artigo publicado na PLOS, Silva, Yamagishi e demais autores propõem formas de pôr esse resultado – o de que "falhas" de genotipagem podem esconder descobertas genéticas relevantes – a serviço da saúde humana.

"Se pegar o título do *paper*, ele fala em nelore, porque aqui é a Embrapa, certo? Meu aluno é da Unicamp, mas ele está fazendo o trabalho dele na Embrapa, no projeto Genômica Animal II, e a gente tinha dados de gado", conta o orientador. "Mas este é um *paper* de metodologia, e se você for olhar lá na discussão, a gente mostra no que esse nosso trabalho pode ser útil para seres humanos".

O pesquisador lembra que mudanças de um único nucleotídeo na sequência de DNA podem alterar a produção de proteínas nas células humanas, ou o funcionamento de outros genes. Alterações assim podem estar associadas a doenças, e a pesquisa biomédica realiza uma busca constante pela base genética de uma série de problemas de saúde.

"Muitas doenças raras têm causas genéticas", disse Yamagishi. "São pequenas mutações, um *snip* que mudou um aminoácido e complicou a vida de alguém. Como essas doenças são raras, há poucos indivíduos afetados, então aí é difícil conseguir recurso para pesquisa, porque do ponto de vista econômico não é atraente".

Mas, explica ele, se a busca pela variação genética responsável puder ser feita por meio do processo de genotipagem, utilizando-se chips que leem sequências específicas de DNA, e não pela leitura completa do DNA do paciente, o processo torna-se muito mais rápido e barato. "Pois bem. Se a mutação que causa essa doença rara estiver próxima a um *snip* que está no chip, essa nossa metodologia se aplica perfeitamente. Então, você, com pouco recurso, consegue identificar a mutação causativa da doença rara".

"Mas você pode me dizer, ah, legal, mas aí você tem uma restrição muito forte, que é que a mutação ocorra próximo de um *snip* conhecido", disse o pesquisador. "Isso é uma limitação muito forte, a gente reconhece no *paper*. Só que tem um detalhe: no caso de humanos, os chips de genotipagem têm uma densidade muito maior do que em bovino. Bovino tem por volta de 700 mil marcadores. Em humanos, tenho mais de 2 milhões".

Yamagishi propõe que chips contendo todas as regiões não-repetitivas do genoma humano poderiam ser usados para detectar os *snips* raros e desconhecidos. "Se em cada região não-repetitiva do genoma eu colocar um *probe* lá, pronto: a metodologia é poderosíssima, acaba essa limitação".

"A importância das regiões serem não-repetitivas é que tem muita repetição no genoma humano, às vezes aparecendo em cromossomos diferentes. Se você constrói um *probe* em cima dessa região repetitiva, você fica sem saber de onde ela veio", explicou ele.

Câncer

Outra aplicação possível, derivada da descoberta metodológica apresentada na *PLOS*, é a detecção das mutações iniciais que aparecem na origem de certos casos de câncer. "Muitos tipos de câncer têm origem em mutações somáticas", disse ele. Essas mutações ocorrem após o nascimento, e portanto não são herdadas dos pais.

"Então, imagine uma única célula que sofre uma mutação. A célula vai se dividindo, e todas as células filhas têm essa mutação. Dependendo da gravidade de onde tenha ocorrido essa mutação, pode desencadear o que chamamos de câncer", explica. "O problema é que, no câncer, pode acontecer uma instabilidade do genoma", o que leva a um acúmulo de novas mutações, dificultando a tarefa de detectar a alteração original, ou as alterações originais, que realmente causou o desenvolvimento do tumor.

"As mutações supostamente causativas vão estar em todas as células filhas. O problema é que ocorrem mutações sucessivas, ou subsequentes, e as células filhas de uma que sofreu uma mutação subsequente vai herdar essa mutação, e assim por diante", descreve Yamagishi. "Isso é ruim para quem estuda câncer, porque há uma infinidade de mutações, posteriores à causativa, e é difícil separar o sinal do ruído".

"Veja só, agora, quando uma limitação é uma vantagem", disse ele, referindo-se ao fato de que os *probes* de DNA dos chips de genotipagem só são capazes de detectar sequências que sejam seus complementos perfeitos. "O *probe* contém trechos da sequência: A,T,C... Quando ele dá o sinal luminoso? Quando vem um DNA que tem a sequência complementar".

"Imagine, agora, que estou com um tipo de câncer e quero tentar descobrir as mutações causativas. Pego lá o tecido cancerígeno, extraio o DNA. Se a mutação causativa ocorreu próximo de um *snip* do *probe*, nenhuma das células do tecido, por mais diferentes que sejam, vai fornecer DNA que não tenha essa mutação específica. Então, o resultado do *probe* vai ser de genótipo perdido, zero, porque não vai ter *probe* para ligar ali".

Esse resultado, supostamente "falho", pode indicar aos pesquisadores o ponto do genoma onde há mais chance de encontrar a mutação causativa, e isolá-la das subsequentes. Assim como no caso das doenças raras, disse Yamagishi, a criação de chips com *probes* para todo o genoma humano não-repetitivo poderia expandir enormemente a aplicação da técnica.

"Eu gostaria que as empresas que manufaturam o chip se convencessem a fabricar esse chip que cubra toda a região não-repetitiva do genoma. Aí a aplicação se torna fantástica, imediata. E não é uma coisa difícil de fazer", declarou ele.