



Construção de sistema Multiplex utilizando cinco marcadores genéticos do tipo mini-STR (short-amplicons) para identificação humana por análise de DNA¹

Luciana de Andrade Agostinho¹, polucita@yahoo.com.br; **Eduardo Ribeiro Paradela**²;
Carmen Lúcia Antão Paiva³, **André Luis Figueiredo**⁴

1. Mestre em Neurologia pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), RJ; professora na Faculdade de Minas (FAMINAS), Muriaé, MG;
2. Mestre em Biologia pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), RJ; membro da Sociedade Internacional de Genética Forense;
3. Professora associada III do Departamento de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ;
4. Mestre em Morfologia pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), RJ; coordenador do curso de biomedicina da Universidade Severino Sombra (USS), Vassouras, RJ.

Artigo protocolado em 14 fev. 2012 e aprovado em 11 abr. 2012.

RESUMO: O desenvolvimento de um novo sistema Multiplex, utilizando marcadores genéticos do tipo mini-STRs, tem como objetivo a realização de testes de identificação humana por análise de DNA a partir de evidências biológicas degradadas com uma eficiência superior a dos métodos aplicados em laboratórios forenses. Neste estudo, o sistema Multiplex foi construído baseado em cinco *loci* do

1. Este artigo é resultante de pesquisa desenvolvida no Departamento de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO.
- 
- 

tipo mini-STRs, são eles: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX e D21S11. Os *primers* utilizados foram analisados de acordo com sua especificidade e sensibilidade na detecção dos alelos de cada *locus* selecionado. Os *primers* foram testados, inicialmente, em reações separadas, e depois, em reações multiplexes. Esses iniciadores apresentaram eficiência na amplificação dos *loci*, e, o sistema multiplex de maior eficiência possuía concentração de 1,0 ng/μL de cada *primer*. Este trabalho demonstra que o sistema em questão pode ser útil, econômico e rápido para a rotina de laboratórios forenses.

Palavras-chave: Multiplex, mini-STRs, DNA degradado, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, D21S11, STR, *loci*.

RESUMEN: La construcción del sistema Multiplex con cinco marcadores genéticos de mini-STR (short-amplificados) para la identificación humana mediante análisis de ADN. El desarrollo de un sistema multiplex nuevo, usando marcadores genéticos mini-STR, tenía como meta la realización de la identificación humana mediante análisis de ADN mediante el uso de degradados evidencias biológicas, con una mejor eficacia que otros métodos de la literatura forense. En el presente estudio, el sistema multiplex fue diseñada con 5 mini-STRs loci: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX y D21S11. Los cebadores utilizados se analizaron mediante pruebas de la sensibilidad y especificidad en la detección de los alelos de cada locus seleccionado. Los cebadores fueron probados, en primer lugar, en reacciones separadas, y después, en las reacciones múltiplex. Estos cebadores mostraron una alta eficiencia en la amplificación de loci, y el sistema multiplex que había estaba compuesta la mejor eficiencia de 1,0 ng/μL de cada cebador. Este trabajo muestra que este sistema de producción Multiplex puede ser útil, económico y muy rápido a la rutina em laboratories forense.

Palabras llaves: Multiplex, mini-STRs, DNA degradado, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, D21S11, STR, *loci*.

ABSTRACT: Construction of Multiplex system using five genetic markers of mini-STR (short-amplicons) for human identification by DNA analysis. The development of a new multiplex system, using genetic mini-STRs markers, had as a target as the accomplishment of Human identification by DNA analysis by using degraded biological evidences, with better efficacy than other methods of the forensic literature. In the present study, the multiplex system was designed with 5 mini-STRs *loci*: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX and D21S11. The *primers* used were analyzed by testing the sensibility and specificity on allele detection of each selected *locus*. The *primers* were tested, firstly, on separated reactions, and after it, on multiplex reactions. These *primers* showed high efficiency on the *loci* amplification, and the multiplex system that had the best efficiency was composed by 1,0 ng/ μ L of each *primer*. This work shows that, this Multiplex system production may be useful, economical and very fast to Forensic Laboratories routine.

Keywords: Multiplex, mini-STR, degraded DNA, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, D21S11, STR, *loci*.

Introdução

A estrutura do DNA

Em 1953, no laboratório Cavendish, na Inglaterra, Francis Crick e James Watson concluíram que a molécula do DNA possui uma estrutura em dupla hélice, uma descoberta que daria novos rumos à ciência (WATSON; CRICK, 1953). A representação a que chegaram Crick e Watson é a de uma longa molécula, constituída por duas fitas enroladas em torno de seu próprio eixo, como se fosse uma escada do tipo caracol.

A ligação entre elas é feita por pontes de hidrogênio, que são ligações químicas fracas, isto é, que se rompem com alguma facilidade, ficando as bases

nitrogenadas com o papel de “degraus” de uma escada circular (WATSON; CRICK, 1953).

A unidade estrutural do DNA é representada pelos desoxirribonucleotídeos, que, por sua vez, são formados por um açúcar, a desoxirribose, por um grupo fosfato e por uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas encontradas na molécula de DNA podem ser classificadas em purinas, como a adenina (A) e a guanina (G), e em pirimidinas, como a timina (T) e a citosina (C) (DAHM, 2005).

O DNA tem como unidade funcional o gene, que é constituído por centenas de nucleotídeos em seqüência, exercendo funções codificantes e reguladoras. Dessa forma, o gene traz a informação que codifica uma determinada proteína e também regula a sua expressão. Os genes são divididos em regiões promotoras e ORFs, a ORF possui duas regiões distintas, as que não codificam proteínas que são chamadas de introns e as que codificam, denominadas exons (GILBERT, 1978).

Embora as proteínas sejam um conjunto de 100 ou mais aminoácidos, é importante ressaltar que a seqüência de cada aminoácido é codificada por um alfabeto de apenas quatro letras A, T, C e G, no qual se encontra armazenada toda a informação genética de um organismo (DAHM, 2005).

A maior parte das células de um corpo humano contém o mesmo conjunto de genes, também chamado de genoma. Todavia, os genes expressos em cada grupo celular podem variar (ELSTON; STEWART 1971; CANNINGS et al. 1976).

Os cromossomos são representados por filamentos encontrados nos núcleos celulares, e possuem atividade funcional quando o material genético encontra-se na forma filamentosa. Nos cromossomos, além dos genes, existem também segmentos de DNA sem função específica (CHAMBON, 1981).

O genoma humano, caracterizado pelo conjunto de cromossomos, consiste de três bilhões de nucleotídeos e informação para um total de aproximadamente 25.000 genes. E, cerca de 10% do genoma, são regiões codificadoras de proteínas. Todo o restante trata-se de seqüências repetitivas que têm função estrutural (GÓES, 2002).

Variações nas regiões codificadoras do genoma podem alterar a estrutura de proteínas, podendo ou não ter efeito deletério para o organismo. Entretanto, variações que ocorrem em regiões não codificadoras não possuem efeito deletério, e não sofrem pressão seletiva, tornando-as regiões absolutamente úteis para genética forense (MCKUSICK, 1999).

A variabilidade genética entre os indivíduos é tão grande que dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente em uma de cada 500 bases do DNA (nucleotídeos). Como o genoma humano tem cerca de 3×10^9 bases, conseqüentemente, podem existir seis milhões de diferenças entre duas

teste de paternidade. A genética forense, contudo, não se limita a isso, podendo ser aplicada também na identificação ou individualização de animais, plantas e microorganismos (DOLINSKY, 2007).

No entanto, a ciência forense vem, gradativamente, conquistando seu espaço nas investigações criminais e nos testes de identificação por DNA, justamente por empregar uma ferramenta com alto poder de discriminação comparada a outras ferramentas científicas empregadas pela justiça. Porém, os operadores da lei e a comunidade científica devem estar atentos ao fato, de que, os testes de DNA absolutamente não são infalíveis, como ocorre com qualquer outra atividade humana (PARADELA, 2007).

Obviamente a análise de DNA não pode, por si só, provar a culpabilidade criminal de uma pessoa ou inocentá-la, mas pode estabelecer uma conexão irrefutável entre essa pessoa e a cena do crime (LYNCH, 2003; WALSH, 2004).

Os métodos analíticos utilizados nas análises criminais são os mesmos dos testes de paternidade, e ambos utilizam princípios da genética de populações (MARIUZZO, 2007). Estudos de genética de populações são, de maneira geral, a base científica para a afirmação da ocorrência de um vínculo genético entre indivíduos. Pois os genes que constituem o patrimônio genético, que é o conjunto de todos os genes presentes numa população num dado momento são transmitidos de geração em geração, ao acaso e em novas combinações alélicas. Portanto, é do patrimônio genético dos progenitores que deriva o patrimônio genético dos descendentes (YONG, 1988; TRIGGS; BUCKLETON, 2002).

A herança genética de uma população e a existência de um perfil genético único para cada indivíduo acabaram se tornando revelações conceituais valiosas no auxílio às técnicas de identificação por DNA, não só nas investigações forenses convencionais, como também na solução de crimes (HILL et al. 2008).

I – Revisão de literatura

1.1 – As técnicas de identificação por DNA: breve histórico

Apontada como a maior revolução científica na esfera forense, desde o reconhecimento das impressões digitais como uma característica pessoal, as técnicas de identificação fundamentadas na análise direta do DNA ostentam pelo menos duas vantagens sobre os métodos convencionais de identificação: a estabilidade química do DNA, mesmo após longo período de tempo, e a sua ocorrência em todas as células nucleadas do organismo humano (DOLINSKY, 2007).

No início da década de 80, Wyman e White descreveram o uso de seqüências polimórficas do DNA para diagnosticar doenças. Em 1984, Jeffreys desenvolveu o primeiro teste para identificação humana por DNA, através da

técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), sendo alvo de estudo a análise de regiões do tipo VNTRs (Variable Number of Tandem Repeat) (JEFFREYS; BROOKFIELD; SEMEONOFF, 1985; JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985).

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi criada em 1985, pelo Doutor Kary Mullis, nos Estados Unidos. Essa técnica foi uma das grandes responsáveis por todo o avanço na área de biomedicina destes últimos 20 anos (MULLIS, 1990). Em 1989, James Weber e Paula May descrevem os STRs (Short Tandem Repeats) (WEBER; MAY, 1989).

Em 1990, foi publicado o primeiro artigo que citou o uso de marcadores do tipo STR (BUTLER, 2006).

No Brasil, o exame de DNA chegou aos tribunais em 1994, quando dois peritos criminais da Polícia Civil do Distrito Federal foram enviados aos Estados Unidos a fim de realizar o exame do DNA extraído do material biológico relacionado a dois crimes perpetrados em Brasília (ALVES, 2009).

Em 1995, foi criado no Reino Unido um banco de dados genético. Em meados de 1998, foram desenvolvidos os marcadores genéticos do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism), conhecidos como polimorfismos de base única (Syvanen, Landegren et al. 1999).

Em 1998, o CODIS (Combined DNA Index System), um banco de dados de DNA criminal foi desenvolvido pelo FBI (Federal Bureau of Investigation), nos Estados Unidos (ASAMURA et al., 2007).

Apesar da existência de inúmeras técnicas para a identificação humana a partir de DNA nuclear, é importante ressaltar que o DNA mitocondrial também pode ser uma alternativa para a individualização humana em casos forenses, quando o material biológico encontra-se degradado, ou, principalmente, quando não apresenta DNA nuclear suficiente, como, por exemplo, nos fragmentos de cabelo sem bulbo (STRACHAN; READ, 1999).

Devido a esses e demais avanços nas técnicas de testes por DNA, o tempo necessário para determinar uma amostra de DNA passou para algumas horas ou, até mesmo, alguns minutos, o que antes eram dias ou meses (BUTLER et al., 1999).

1.2 – RFLP

A fim de reconhecer os *loci* alvos de mutações foi desenvolvida a técnica conhecida pela sigla RFLP, ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RENWICK, 1969; CHEMELLO, 2007).

Esse método se baseia na existência de regiões do DNA que consistem em unidades polimórficas, denominadas VNTRs, regiões que ainda têm sua

função desconhecida. O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA, de indivíduos geneticamente distintos, difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita e, por essa razão, essas regiões podem ser usadas como marcadores genéticos na identificação humana (FISCHER, 2000).

O polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA, obtido através do tratamento do material genético com enzima de restrição, é observado através de uma seqüência de passos que tornam a técnica robusta, mas ao mesmo tempo trabalhosa. A base genética do polimorfismo observado resulta de mutações nos sítios de restrição ou de inserções, deleções e rearranjos entre esses sítios (GRIFFITHS, 1999).

A técnica de RFLP desenvolve-se na seguinte ordem: após a extração, o DNA dos indivíduos é tratado com enzima de restrição que o corta em um grande número de pontos (sítios de restrição), gerando uma grande quantidade de fragmentos, dependendo do tamanho do genoma. As diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos resultam na clivagem de fragmentos de tamanhos distintos, que são separados através de eletroforese em gel de agarose. As diferenças nos tamanhos dos fragmentos não podem ser visualizadas diretamente no gel (FISCHER, 2000).

Para efetuar a detecção dos marcadores RFLP, os fragmentos separados no gel pela eletroforese são transferidos para uma membrana de nylon (ou nitrocelulose) por capilaridade ou a vácuo através de um processo denominado Southern Blot. Como a membrana é colocada sobre o gel, a ordem dos fragmentos separados por eletroforese é mantida na transferência. Depois, os fragmentos são fixados, covalentemente, na membrana através de alta temperatura em forno a vácuo ou com luz ultravioleta (FISCHER, 2000).

Por fim, a visualização de fragmentos polimórficos entre os inúmeros fragmentos transferidos para a membrana é feita através da hibridização de pequenos fragmentos clonados de DNA denominados sondas, com seqüências complementares do DNA imobilizado na membrana. Assim, somente os fragmentos fixados na membrana, que são complementares ao DNA da sonda, serão visualizados entre os milhares de fragmentos resultantes do corte com enzima de restrição (FISCHER, 2000).

Para a preparação das sondas incorporam-se nucleotídeos contendo moléculas de fósforo radioativo ou nucleotídeos modificados nos fragmentos clonados do DNA. Após a hibridização com as sondas, a membrana é exposta a filme de raios-X em um processo chamado de auto-radiografia, revelando as bandas que constituem os marcadores RFLPs. Se os indivíduos diferem entre si em relação à posição dos sítios de restrição enzimática na fita de DNA, gerando fragmentos de tamanhos distintos, as bandas serão observadas em posições diferentes na auto-radiografia (PACINI, 2011).

Os marcadores do tipo RFLP cobrem todo o genoma humano, portanto, há probabilidade de se encontrar associações significativas entre marcadores e genes. Eles possuem expressão co-dominante, o que torna possível identificar em cada *locus* estudado genótipos heterozigotos e homozigotos, gerando mais informação em nível genético e permitindo uma análise detalhada da interação entre alelos em estudos de mapeamento e características qualitativas (BING; BIEBER, 2001).

Esses marcadores também mostram variação gênica na seqüência de nucleotídeos de regiões que codificam produtos gênicos, além de serem de número ilimitado. O fato de terem base em DNA os torna marcadores de alta estabilidade, podendo ser extraído, conservado, e reutilizados por longos períodos de tempo (PACINI, 2011).

A técnica de marcadores moleculares utilizada tem que ser extremamente eficiente na geração de dados para que possa, em algum momento, ser automatizada. Entretanto, essa técnica apresenta uma série de limitações neste aspecto, uma vez que envolve várias etapas manuais intensivas (BING; BIEBER, 2001).

O uso de RFLP requer pessoal técnico especializado na manipulação de DNA recombinante, e no caso do uso de fósforo-32, requer também instalações adequadas ao manuseio do material radioativo (BING; BIEBER, 2001).

1.3 – PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou a biologia molecular por promover a replicação do material genético, aumentando a quantidade de DNA para análise e, conseqüentemente, fazendo com que a quantidade de amostra necessária para o teste possa ser menor (CHEMELLO, 2007).

Adicionalmente, devido a sua alta sensibilidade a PCR está suscetível a contaminação, o que exige cuidados especiais no laboratório (CHEMELLO, 2007). A PCR é uma tecnologia poderosa por permitir a amplificação de qualquer tipo de tecido, seja a amostra pequena, velha ou degradada (FISCHER, 2000).

Por ser um processo realizado com variações que incluem altas temperaturas, a PCR é realizada por uma enzima DNA polimerase termoestável, geralmente extraída de microorganismos como a eubactéria termofílica *Thermus aquaticus* (BROWN, 2002). Para realizar a PCR o fragmento de DNA é misturado com a Taq polimerase, um par de *primers* e nucleotídeos trifosfatados. A amostra de DNA pode ser pequena, uma vez que a PCR possui alta sensibilidade (STRACHAN; READ, 1999).

Os *primers* ou iniciadores são necessários para principiar a síntese do DNA, que será feita com auxílio da DNA polimerase. Eles devem se ligar à

seqüência de DNA do lado oposto ao segmento que será copiado. As seqüências desse sítio de ligação devem ser conhecidas para que os *primers* com a seqüência apropriada possam ser sintetizados (STRACHAN; READ, 1999). A reação ocorre em um aparelho chamado termociclador que, através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação:

1. Desnaturação: é o processo no qual ocorre a separação da dupla fita de DNA por meio da elevação da temperatura para, aproximadamente, 90-99 °C;
2. Hibridização: uma vez separadas as fitas de DNA, a temperatura da reação é reduzida para, aproximadamente, 45-65 °C e ocorre pareamento dos *primers*, um em cada fita, nas respectivas seqüências complementares à região alvo da amplificação,
3. Extensão: eleva-se a temperatura entre 60 e 75 °C para que a enzima DNA polimerase se posicione junto aos *primers* e comece a duplicação da fita, recrutando no meio os nucleotídeos que contenham as bases nitrogenadas complementares à fita molde (CHEMELLO, 2007).

Todo o processo é repetido a partir da desnaturação até a extensão por várias vezes até que se obtenha uma quantidade razoável do DNA a ser amplificado (BUTLER et al., 1999).

Os resultados da PCR podem ser visualizados de várias maneiras (STRACHAN; READ, 1999). Geralmente, os produtos que são analisados por eletroforese em gel de agarose irão revelar uma banda, terá assim, amplificado um único segmento da seqüência de DNA (BUTLER et al., 1999).

1.4 – Banco de dados genéticos

Todo exame de DNA é comparativo. Atualmente, os institutos de perícia trabalham com casos fechados, comparando o DNA do suspeito com o das evidências criminais. Nos casos negativos, não há possibilidade de comparar o DNA dos locais de crime com o de potenciais agressores. O que fazer, portanto, quando não há suspeito? Nesse caso uma ferramenta útil seria um banco de DNA criminal, semelhante ao do seriado americano CSI (MARIUZZO, 2007).

A estocagem das amostras de DNA origina os Bancos de Dados de Material Genético ou “Bancos de DNA”. É possível diferenciar quatro tipos de Bancos de Material Genético, de acordo com suas características: bancos de pesquisa,

bancos de diagnóstico, bancos de dados e bancos de potenciais (MATTE, 1998).

Os bancos de dados de DNA civis e forenses são casos particulares em que as informações genéticas são armazenadas para fins criminais ou para identificação de desaparecidos. Usualmente é feita a identificação de um indivíduo por comparação com o padrão armazenado (FIGUEIREDO, 2006; CHEMELLO, 2007). Há ainda os bancos de dados de DNA para fins militares para identificação de desaparecidos políticos e de soldados mortos em guerra (MATTE, 1998).

Em 1995, o Reino Unido lançou um banco de dados genético de âmbito nacional que, atualmente, contém mais de um milhão de perfis genéticos traçados de criminosos e amostras referência. Esse banco de dados já auxiliou na conclusão de milhares de investigações criminais (BUTLER et al., 2001).

A Interpol (Organização Internacional de Polícia Criminal) estimula a criação de bancos de dados genéticos, visando uma padronização das técnicas laboratoriais e a troca de informações entre os estados membros (FIGUEIREDO, 2006).

Nos EUA, o banco de dados do FBI, conhecido como CODIS, possui informações genéticas de criminosos condenados pela justiça e outras obtidas em cenas de crimes (BUTLER et al., 2001). O CODIS permite o cruzamento de informações genéticas de modo eletrônico. Pela lei norte-americana, as autoridades de todos os cinquenta estados devem coletar amostras de DNA de estupradores e assassinos para inclusão no sistema (BUTLER et al., 2001).

De acordo com esse sistema, o FBI usa, rotineiramente, um grupo mínimo de 13 *loci* STRs para auxiliar na resolução de crimes. São eles: CSF1PO; D7S820; FGA; D8S1179; THO1; D13S317; TPOX; D16S539; VWA; D18S51; D3S1358; D21S11 e D5S818 (MORTON, 1995).

O marcador genético amelogenina, responsável por determinar o sexo de um indivíduo, também está incluído, além dos 13 alelos STRs. Cada amostra biológica deve ser testada por todos esses quatorze marcadores para que possa ser incluída no CODIS (BUTLER et al., 2001).

Apesar da existência de bancos de dados genéticos espalhados pelo mundo todo, o Brasil, infelizmente, ainda não possui um banco de DNA criminal (CERQUEIRA, 2008).

1.5 – Polimorfismos presentes na molécula de DNA usados em identificação humana

Com exceção dos gêmeos idênticos, o patrimônio genético de cada pessoa é único. Para efeitos forenses, existem seqüências hipervariáveis na molécula

de DNA que, por serem altamente polimórficas, podem ser utilizadas para distinguir indivíduos e estabelecer vínculo genético (FIGUEIREDO, 2006). O genoma humano, bem como os dos demais organismos, contém muitos polimorfismos, posições onde a seqüência de nucleotídeos não é a mesma em cada membro da população (BROWN, 2002).

Os tipos de polimorfismos do DNA podem ser agrupados em dois tipos: polimorfismos de comprimento e polimorfismos de seqüência. O primeiro tipo inclui as regiões STR e VNTR, e é caracterizado por seqüências de nucleotídeos que se repetem em múltiplas cópias, variando o número de repetições entre os indivíduos para cada *locus* (FIGUEIREDO, 2006).

Os polimorfismos de seqüência são compostos de diferentes nucleotídeos em uma determinada localização do genoma. Estas variações em seqüência podem ser manifestadas como regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases, mas, em geral, originam-se de mutações pontuais (FIGUEIREDO, 2006).

1.6 – DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial, por sua vez, é encontrado em múltiplas cópias no citoplasma das células e se difere do DNA nuclear por ter formato circular em oposição ao helicoidal. O material genético mitocondrial, além de ser uma molécula menor, comparada ao nuclear, possui uma herança genética materna de 100% (FISCHER, 2000).

O interesse forense no DNA mitocondrial está no fato dele ser mais resistente à degradação que o nuclear. Assim, em grandes desastres, quando se torna mais difícil identificar os corpos, pode-se optar pela análise deste (CHEMELLO, 2007).

Duas técnicas são usadas para analisar esse tipo de DNA, ambas são baseadas na identificação da região controle, denominada D-loop, por ser uma região onde é encontrada a maior variação entre cada indivíduo (FISCHER, 2000).

A primeira técnica é o seqüenciamento do DNA onde a amostra é, inicialmente, copiada usando a PCR, e seus produtos de amplificação são lidos no seqüenciador. O segundo método é o dot blotting, onde cada molécula de DNA amplificada é separada e fixada em uma membrana. Depois uma sonda específica é adicionada à membrana e só irá ocorrer a hibridização caso a seqüência de DNA seja complementar à sonda. Os resultados são visualizados usando auto-radiografia (FISHER, 2000).

Essa análise de DNA mitocondrial é muito importante na genética forense, uma vez que, tem papel fundamental nos casos relacionados ao desaparecimento

de pessoas, pela possibilidade de se comparar o DNA mitocondrial da mãe, irmãos ou de outros parentes com relações maternas, com o DNA da pessoa desaparecida (FISCHER, 2000).

Além disso, em casos de materiais biológicos misturados, a análise de DNA mitocondrial também pode ser realizada. Em outras palavras, se uma amostra biológica apresentar mais de um perfil de DNA mitocondrial é indicativo a presença de uma mistura de materiais genéticos na evidência forense analisada (FISCHER, 2000).

A análise do DNA mitocondrial permite determinar relações familiares, quando existe um hiato de várias gerações entre um ancestral e descendentes vivos. Porém, não possuem o poder de discriminação dos sistemas autossômicos, designadamente, dos *loci* STRs autossômicos do DNA nuclear, para além de que, é necessária uma maior ponderação na elaboração das conclusões (FISCHER, 2000).

Por outro lado, é uma técnica de alto custo, além de ser laboriosa, comparada a outros tipos de análise de DNA humano (FISCHER, 2000).

1.7 – Regiões polimórficas do tipo VNTR

Os VNTRs consistem em regiões denominadas mini-satélites ou repetições *in tandem* de número variável. Eles exibem uma enorme variabilidade e são constituídos de 9 a 100 pares de bases repetidas seqüencialmente em *loci* cromossômicos. Portanto, a alta variabilidade dessas regiões genômicas, faz com que seja improvável a existência de dois indivíduos com o mesmo perfil genético, a não ser, como já exemplificado, no caso de gêmeos univitelinos (GÓES, 2002).

Os marcadores VNTRs são analisados através da técnica RFLP. De maneira geral, com resultado da utilização de apenas cinco sondas VNTR, são obtidas probabilidades de paternidade/maternidade superiores a 99,999%. Índices tão elevados, observados com a utilização de poucas sondas, são decorrentes da alta variabilidade dos *loci* VNTRs (GÓES, 2002).

Durante quase 10 anos, esta metodologia foi empregada para a análise de DNA em casos de paternidade. A análise de regiões VNTR do DNA foi, pela primeira vez, empregada para resolver um problema de imigração na Inglaterra. Logo em seguida, foi utilizada por um tribunal britânico para comprovar a participação de um suspeito em casos de abuso sexual cometidos entre 1983 e 1986 (STRACHAN; READ, 1999).

Como desvantagem, a tipagem de alelos VNTRs requer DNA íntegro e em grande quantidade (100-500 ng), tornando praticamente inviável a

tipagem de amostras biológicas antigas, degradadas ou com pouca quantidade de DNA. Atualmente, a metodologia é pouco utilizada em investigações genéticas (GÓES, 2002).

1.8 – Regiões polimórficas do tipo SNP

O Projeto Genoma Humano (HGP) está progredindo, e já foram detalhadas mais de um milhão de seqüências de DNA. Com esse rápido avanço, foi necessária também à análise de variações genômicas que ocorrem de forma natural, com a finalidade de estudar com uma maior minúcia os polimorfismos do DNA humano, sendo que, 90% deles são do tipo SNP (BROOKES, 1999).

Atualmente, um maior interesse por parte dos geneticistas em relação à importância dos polimorfismos genômicos fez com que aumentassem as pesquisas na área de genética, que conseqüentemente, produziram maiores efeitos em várias áreas relacionadas, como na forense, no desenvolvimento de drogas, no câncer e na pesquisa de doenças genéticas (BROOKES, 1999).

Os marcadores bi-alélicos (SNPs) têm sido muito utilizados na genética forense, mesmo com seu baixo poder de discriminação. Esses marcadores estão dispersos pelo genoma humano, sendo que em cada *locus*, existe a possibilidade da existência de somente um (homozigose) ou dois (heterozigose) nucleotídeos (DOLINSKY, 2007).

Os SNPs, também conhecidos como polimorfismos de base única, ocorrem devido à variação de um único nucleotídeo em regiões distintas do genoma, tal variação não está presente em indivíduos normais de algumas populações (BROOKES, 1999). Esses polimorfismos são encontrados com grande freqüência no genoma, e se diferem dos outros pelo fato de serem marcadores de menor prevalência na população, aproximadamente 1% (BROWN, 2002).

A princípio, os SNPs deveriam ser polimorfismos di-, tri-, ou tetra-alélicos. Entretanto, em humanos, os SNPs tri-alélicos e tetra-alélicos são raros, quase a ponto de não existirem, e os polimorfismos de base única, na maioria das vezes, são referidos como sendo marcadores di-alélicos (BROOKES, 1999).

Apesar de serem marcadores de extrema importância na análise do código genético, não possui um banco de dados mundial, nem uma padronização das técnicas de análise, além de ser uma técnica considerada de alto custo (AVISE et al., 2004).

Pelo trabalho de analisar base por base, comparando várias seqüências, ser extremamente massivo, não tem sido largamente desenvolvido e empregado em estudos ecológicos e evolutivos, mas essas tecnologias podem se adaptar para algumas proposições científicas futuras (AVISE et al., 2004).

1.9 – Regiões polimórficas do tipo STR

As seqüências curtas repetidas in tandem (STR) ou microssatélites apresentam repetições com unidade básica de 2-6 pares de base e o polimorfismo, assim como nos *loci* VNTRs, também está baseado no número de repetições. Devido ao pequeno tamanho, geralmente menor que 350 pares de base, os alelos STRs podem ser analisados após amplificação pela PCR (HILL et al., 2008).

O tamanho reduzido dos STRs permite que amostras com quantidades diminutas de DNA, ou apresentando alto grau de degradação, possam ser tipadas. Desta maneira, a análise dos *loci* STRs superou várias limitações inerentes à manipulação de seqüências VNTRs, tornando a tipagem de marcadores STRs a metodologia eleita para a identificação por DNA de vestígios biológicos em geral (HILL et al, 2008).

O *locus* STR analisado individualmente não apresenta poder de discriminação comparável ao *locus* VNTR, que possui uma maior variabilidade genética. No entanto, a análise conjunta de regiões STRs proporciona resultados altamente satisfatórios, além de uma maior eficiência na identificação de amostras biológicas degradadas (GÓES, 2002).

Desta forma, para a realização de uma análise conjunta de várias regiões STRs em uma única reação de PCR, foram desenvolvidos sistemas multiplexes, onde vários pares de *primers* orientam simultâneas reações de amplificação, gerando produtos de múltiplos *loci* (GÓES, 2002).

Para facilitar ainda mais a análise dessas regiões, foram desenvolvidos vários processos automatizados, como por exemplo, a produção de *primers* acoplados a diferentes corantes fluoróforos e a criação do sistema de detecção a laser em aparatos de separação eletroforética. Os produtos de PCR marcados com fluoróforos podem ser detectados em tempo real mediante eletroforese capilar ou pode-se realizar a detecção pós-eletroforética em escaner de fluorescência (GÓES, 2002).

A redução dos custos na análise por DNA, a PCR, o desenvolvimento de sistemas multiplexes, e a necessidade de quantidades cada vez menores, para análise de uma amostra biológica, vêm auxiliando a padronização das técnicas de identificação humana nos laboratórios forenses (BUTLER et al., 2001).

1.10 –A essência do Mini-STR

A Comissão Internacional de Pessoas Desaparecidas (ICMP - International Commission on Missing Persons) foi criada em 1996, na Bósnia e na Herzegovina,

com a missão inicial de auxiliar e resolver o desaparecimento de, aproximadamente, 40.000 indivíduos relacionados à guerra ocorrida na antiga Iugoslávia no período de 1992 a 1995, e em Kosovo em 1999 (PARSONS et al., 2007).

Visando identificar, em grande escala, as pessoas desaparecidas, a ICMP criou um banco de DNA através do qual se fazia a comparação da tipagem por DNA dos restos ósseos dos corpos não identificados com o perfil de DNA dos membros familiares das pessoas desaparecidas. Até então, desde 2001, esse método tem mostrado alta eficácia (PARSONS et al., 2007).

Devido a fatos semelhantes a esse, há um grande interesse em se desenvolver marcadores genéticos cada vez mais eficazes para identificação de amostras de DNA degradadas. Pois, atualmente, vem aumentando, cada vez mais, o número de acidentes em massa e ataques terroristas, além de um maior interesse na identificação de amostras *pós-mortem* para fins judiciais (PARSONS et al., 2007).

Nas análises de DNA forense, as amostras obtidas em uma cena de desastre em massa ou até mesmo em cenas de crime, normalmente, se apresentam altamente danificadas. Tendo assim, pouco material genético para ser analisado (NIEDERSTATTER et al., 2006).

Os mini-STRs são novos tipos de marcadores STRs classificados como di-, tri-, tetra- e pentaméricos, e foram elaborados para facilitar a análise de amostras de DNA degradadas, melhorando assim, a eficiência da amplificação das regiões STRs (BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003). Entre as regiões polimórficas do tipo STRs, 16 foram examinadas, e algumas adaptações foram realizadas com o objetivo de produzir um marcador genético que compreendesse as regiões de repetições dos STRs originais, porém, com o menor tamanho possível (GILL et al., 2006).

Esses marcadores, os quais são sub-regiões STRs vêm sendo aplicados em vários casos internacionais relacionados à análise de DNA degradado, sendo um dos mais importantes, a identificação humana por DNA realizada nas vítimas do atentado terrorista de 2001 ao World Trade Center (WTC) (BUTLER et al., 2001).

Em Novembro de 2001, o Doutor Robert Shaler, chefe do OCME (Office of the Chief Medical Examiner), visando acelerar o processo de identificação das vítimas do WTC, contactou John Butler do NIST (National Institute of Standards and Technology) com o intuito de discutir sobre uma possível aplicação dos marcadores mini-STRs no atentado de 11 de Setembro. Esses marcadores genéticos foram usados e obtiveram grande sucesso na identificação das evidências biológicas degradadas encontradas no desastre (BUTLER et al., 2001).

O Serviço de Ciências Forenses também demonstrou grande interesse pelos marcadores mini-STRs, principalmente na identificação das vítimas do incêndio de Branch Davidian no Waco, Texas, uma vez que os mini-STRs foram mais eficientes comparados aos STRs, também utilizados para identificar as vítimas do desastre (BUTLER et al., 2001).

A maior vantagem dos mini-STRs é a manutenção da compatibilidade com o banco de dados dos STRs, não havendo a necessidade de se criar um novo banco de dados, uma vez que os resultados gerados pelos kits mini-STRs são compatíveis (DRABEK et al., 2004).

Além disso, os mini-STRs possuem bancos de dados em vários países, como Espanha (MARTIN et al., 2007), Áustria (GRUBWIESER et al., 2006), Estados Unidos, Bósnia, Herzegovina (PARSONS et al., 2007), entre vários outros países europeus (GILL et al., 2006).

Esses fatores conduzem, de certa forma, a uma padronização das técnicas de aplicação dos mini-STRs na identificação humana por DNA, tornando-os marcadores altamente eficientes e de fácil manipulação, com o propósito de facilitar, cada vez mais, as comparações realizadas entre perfis genéticos dos laboratórios do mundo todo (GILL et al., 2006).

Por fim, os mini-STRs acabaram se tornando altamente significativos para a genética forense, uma vez que foram capazes de gerar resultados satisfatórios a partir de uma amostra biológica danificada (BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003).

Essa degradação da amostra de DNA pode ser causada por exposição a elementos como o fogo, ou por contaminação de microorganismos, como bactérias e fungos, que são capazes de danificar a amostra através de processos oxidativos e bioquímicos. O DNA quando degradado apresenta-se fragmentado e, normalmente, com inibidores de PCR, dificultando assim sua análise (BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003).

É possível, no caso dos mini-STRs, submeter à amplificação simultânea de vários *loci* em uma única reação de PCR, permitindo assim, a análise conjunta dos produtos amplificados. Tal fato proporciona o aumento do poder de discriminação da técnica aplicada e a diminuição não só do tempo de análise, como também das quantidades de DNA e de reagentes utilizados comparado ao kit comercial multiplex STR convencional (BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003).

O objetivo deste estudo foi construir um sistema multiplex com base em cinco marcadores genéticos do tipo mini-STR para auxiliar a análise forense de corpos degradados.

II – Material e métodos

2.1 – Critérios de seleção dos *loci*

A seqüência de amplificação original dos *primers* por *loci* selecionados podem ser encontrados no Genome Database (GDB) (COBLE; BUTLER, 2005).

Os critérios usados para a seleção dos cinco *primers* foram: grau de heteroziguidade, uso internacional dos *loci* e a existência de bancos de dados compatíveis com os mini-STRs em outros países (HILL et al., 2008).

Os *loci* selecionados são informativos e apresentam alta variabilidade, com altas taxas de heteroziguidade. Por outro lado, os *loci* com variabilidade menor tendem a apresentar distribuições de freqüências alélicas irregulares, de maneira que pequenos erros, na medida do tamanho dos alelos, podem resultar em desvios relativamente grandes na estimativa das freqüências. Eles são também mais vulneráveis aos efeitos de deriva genética e endogamia (PENA, 1997).

2.2 – Desenho dos *primers*

Os *primers* estudados foram elaborados conforme Butler et al. (BUTLER et al., 2001; BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003), e desenvolvidos através de um algoritmo denominado Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (ROZEN, 1998).

Os parâmetros padrões, como tamanho dos *primers*, porcentagem de nucleotídeos Gs e Cs e temperaturas de desnaturação, foram ajustados de acordo com Hill et al. (HILL et al. 2008). Os produtos de PCR foram produzidos, com o menor tamanho possível, compreendendo a região que apresentava a seqüência de repetição STR. Depois de produzido, cada *primer* foi testado de acordo com suas interações potenciais, sensibilidade e especificidade, analisando a compatibilidade entre eles com base em Butler, Shen e McCord (BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003).

2.3 – Sistema Multiplex dos marcadores mini-STRs

Todos os *primers* foram testados por Butler et al. (BUTLER et al., 2001), uns contra os outros, com o objetivo de analisar a compatibilidade de cada um. O uso de reações multiplexes empregando corantes fluorescentes associado à detecção automatizada para determinação de alelos mini-STRs, pela técnica da PCR, fornece não só informação qualitativa dos alelos presentes na amostra, como também informação quantitativa referente às

QUADRO 1 Marcadores do tipo mini-STRs analisados

Locus	Sequencia do Primer mini-STR	Alelo	Tamanho STR	Tamanho mini-STR
CSF1PO	ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA	12	280-320 pb	89-129 pb
FGA	AAATAAAATTAGGCATATTTACAAG CGCTGAGTGATTTGTCTGTAATTG	21	196-352 pb	125-281 pb
TH01	CCTGTTCCCTCCTTATTTCCCGGGA ACACAGACTCCATGGTG	09	160-204 pb	51-98 pb
TPOX	CTTAGGGAACCCTCACTGAATGGT CCTTGTCAGCGTTTATTTCG	11	213-249 pb	65-101 pb
D21S11	ATTCCCCAAGTGAATTGCGGTAGA TAGACTGGATAGATAGACGA	29	186-244 pb	153-211 pb

Fonte: BUTLER et al., 2003 (Butler, Shen et al. 2003)

QUADRO 2 Marcadores mini-STRs analisados quanto a sua classificação e seqüência de repetição

Locus	Tipo de repetição	Repetição	Região cromossômica
FGA	Tetra	CTTT	4q31.3
D21S11	Tetra complexo	[TCTA] [TCTG]	21q21.1
CSF1PO	Tetra	TAGA	5q33.1
TH01	Tetra	TCAT	11p15.5
TPOX	Tetra	GAAT	2p25.3

Fonte: HILL et al., 2008 (Hill, Kline et al. 2008).

QUADRO 3 Os *loci* selecionados e seus respectivos fluoróforos

Locus	Fluoróforo utilizado
CSF1PO	VIC
FGA	6FAM
TH01	6FAM
TPOX	NED
D21S11	VIC

Fonte: Butler, et al. (Butler, Shen et al. 2003).

intensidades relativas das bandas. Como consequência, isso possibilitou aferir a quantidade de DNA amplificado. A concentração de cada *primer* estudado variou de 0,5 a 1,5 ng/ μ L nas reações de PCR (do tipo multiplex) realizadas, permitindo assim, avaliar a concentração de maior eficiência de amplificação dos mesmos.

2.4 – Iniciadores e outros reagentes para PCR

A Amplitaq Gold® DNA polimerase, e as soluções tampão foram obtidas da Applied Biosystems (Foster City, C.A.). Todos os *primers* mini-STRs foram marcados com os corantes fluorescentes 6-FAM™; VIC™ e NED™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). O 6-FAM™ corresponde à cor azul, o VIC™ a verde, o NED™ amarelo (BUTLER; SHEN; MCCORD, 2003).

2.5 – Origem das amostras de DNA

As amostras de sangue e líquido amniótico são de pessoas anônimas e foram cedidas pelo banco de dados dos laboratórios DNA Forense - Peritos Associados e Análises Laboratoriais Ltda. As amostras foram extraídas através dos métodos convencionais de extração orgânica.

2.6 – Extração do DNA

2.6.1 – Líquido amniótico

O DNA do líquido amniótico foi extraído com o kit NucleoSpin®Plasma XS, produzido pela Macherey-Nagel (GmbH & Co. KG.). O protocolo utilizado foi o de alta sensibilidade.

Conforme o protocolo, foi utilizada uma amostra inicial de 240 μ L de líquido amniótico. Foram adicionados 20 μ L de Proteinase K e incubado a 37 °C por 10 minutos. Para ajustar as condições apropriadas da reação, foram adicionados 360 μ L do reagente BB (Binding Buffer), o volume final foi transferido para uma coluna com uma membrana de sílica. Essa coluna é adaptada dentro de um tubo para microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL (*eppendorf*).

A reação foi centrifugada por 30 segundos a 2,000 g, e depois, a força de centrifugação foi aumentada para 11,000 g por mais 5 segundos. O líquido que passou através da membrana foi descartado.

Para fazer a primeira lavagem da membrana, foram adicionados 500 μ L do reagente WB (Wash Buffer) e centrifugado a 11,000 g por 30 segundos. A segunda lavagem adicionou-se 250 μ L de WB na coluna, e centrifugou-se a 11,000 g por 3 minutos.

Com a finalidade de eluir o DNA, foi adicionado o reagente Elution Buffer e, centrifugado por 30 segundos a 11,000 g. No final, para remover os resíduos da reação, a amostra foi incubada, com tampa aberta, a 90 °C por 8 minutos.

A amostra extraída foi quantificada, apresentando uma concentração final de 0,31 ng/μL.

2.6.2 – Extração de DNA de amostras líquidas de sangue total pelo método FENOL X CLOROFÓRMIO

A extração orgânica de DNA é baseada na ação de: SDS (dodecil sulfato de sódio) e Proteinase K, que são indicados para efetuar o rompimento das membranas celulares e a quebra das proteínas que protegem as moléculas do DNA nos cromossomos; já a solução fenol/clorofórmio é indicada para separar as proteínas do DNA e o etanol, utilizado com o objetivo de precipitar o DNA.

O sangue foi coletado em EDTA, 1,5 mg/mL, e misturado bem antes de remover as alíquotas (de 800 mL). Depois, foram adicionados 700 mL de SSC (*saline sodium citrate*) 1X e agitado vigorosamente, e logo após, centrifugado por 2 minutos na *velocidade* máxima. O volume de SSC adicionado foi descartado do sobrenadante. Essa etapa foi repetida por duas vezes.

O acetato de sódio 0,2 M, 25 mL de SDS 10% e 8 mL da Proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados com objetivo de lisar as células para a exportação do DNA do núcleo. Assim, a partir dessa etapa têm-se o DNA em solução. A reação foi agitada vigorosamente e incubada a 56 °C por 1 hora.

Na etapa seguinte, foram adicionados 600 mL de fenol e o material, homogeneizado no agitador magnético (Vórtex) por 30 segundos e centrifugado por 5 minutos na *velocidade* máxima. O fenol deve estar previamente equilibrado em pH 7,8, caso contrário a acidez do fenol pode provocar quebras no DNA.

A fase aquosa foi coletada, e novamente, foram adicionados 600 mL de fenol, centrifugou-se por 5 minutos. Transferindo a fase aquosa para um novo tubo para microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL.

Uma solução contendo clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada, cuidadosamente, e centrifugou-se por 3 minutos. Transferindo, novamente, a fase aquosa para um novo tubo para microcentrífuga.

O etanol absoluto, gelado, foi adicionado (2,5x) ao material, a qual permaneceu incubada por 20 minutos a -70 °C por 1 hora, para precipitar o DNA.

Posteriormente, a reação foi centrifugada por 15 minutos a 14.000g e o etanol foi retirado, cuidadosamente, escoando-o pelas paredes do tubo para microcentrífuga, sem danificar o precipitado.

O etanol 70%, gelado, foi adicionado (1 mL) ao precipitado e centrifugado por 5 minutos. E depois, retirado, e centrifugado por alguns segundos, para abaixar o etanol das paredes do tubo para microcentrífuga. Retirou-se o excesso de etanol com uma micropipeta, colocando-o para secar a temperatura ambiente.

O TE (10 mM Tris-HCl), 0.1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), com pH 8,0, foi adicionado (40-50 mL) ao precipitado e a reação foi incubada a 56 °C por 2 a 16 horas, até dissolver completamente o DNA.

O DNA que foi utilizado na PCR, teve o precipitado ressuspensão em água, e teve concentração final de 250 ng/μL.

2.7 – Reações em cadeia por Polimerase (PCR) usando marcadores mini-STRs para os loci FGA, D2S11, CSF1PO, TH01, TPOX

A amplificação foi realizada no termociclador HBPX2 (Thermo Scientific, San Jose, CA). Com o objetivo de testar a eficiência de cada primer para cada região mini-STR, separadamente, foi realizada uma reação de PCR contendo: água milliQ Q.S.P. 25 μL, 2,5 μL de solução tampão 1x GeneAmp® PCR Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 a 1,5 ng de cada par de iniciadores para PCR (1ng/μL), 0,5 μL de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 1 a 1,5 ng de DNA em um volume total de reação de 25 μL.

As reações de PCR foram realizadas com amostras de DNA humano (extraído de líquido amniótico e sangue total, além do DNA padrão A9974 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A concentração do DNA padrão usado era de 0,125 ng/μL da solução.

A amplificação por PCR foi adaptada nas seguintes condições:

- 1 – Desnaturação por 11 minutos a 95 °C;
- 2 – A fase de hibridização continha 33 ciclos, sendo que, cada ciclo oscilava entre três temperaturas diferentes, tais como, 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C e 1 minuto a 72 °C;
- 3 – Extensão por 45 minutos a 60 °C.

III – Detecção e análise de dados

3.1 – Eletroforese

A eletroforese feita com DNA é usada para separar fragmentos de diversos pesos moleculares usando gel como suporte. O gel forma uma rede de poros, os quais podem variar de tamanho de acordo sua concentração.

Neste trabalho, a concentração do gel variou de 0,8 a 3,0% de agarose, e a eletroforese foi horizontal.

A corrida eletroforética dos produtos de PCR durou em torno de 20 a 55 minutos e a voltagem usada foi de, aproximadamente, 75 V. O tampão de corrida usado foi o TAE 1x.

Na corrida eletroforética, em cada *slot* do gel (*slot*), continha: de 1 a 10 μ l dos produtos de PCR, corante (xileno-cianol e azul de bromofenol 6X).

Os produtos da amplificação foram visualizados por transiluminação UV de gel de agarose embebido com Brometo de Etídio (0,25 μ L/mL).

3.2 – Eletroforese capilar

O seqüenciamento de DNA consiste em um método através do qual se pode determinar a ordem exata de nucleotídeos em um segmento de DNA.

As amostras foram analisadas por eletroforese capilar no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos amplificados foram ressuspensos em formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Foster City, CA), foi adicionado 1 μ L da amostra, 0,35 μ L de GS500-LIZ e 14 μ L de Hi-Di™. Antes de processar a amostra, um espectro padrão, capaz de analisar comprimentos de ondas diferentes, foi estabelecido para a detecção dos seguintes fluoróforos 6-FAM™; VIC™ e NED™ (Applied Biosystems, Foster City, CA).

O polímero POP-6™, polímero de performance otimizada, foi utilizado como matriz com uma solução tampão ACE (affinity capillary electrophoresis) 1x (AMRESCO, Sólón, OH), com a finalidade de melhorar a resolução da separação eletroforética. As amostras foram processadas por 10 segundos a 3 kV, e depois, os alelos foram separados a 15 kV em uma temperatura de 60 °C. Os dados gerados pelo sequenciador automático foram analisados através do programa GeneMapper®ID (versão 3.2).

Um nanograma da escala alélica presente no AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit foi utilizada e 1 ng de cada iniciador foi testado em uma reação multiplex, conforme supra descrito.

IV – Resultados e discussão

Os cinco *primers* selecionados foram testados, separadamente, quanto ao seu poder de especificidade e sensibilidade correspondente a cada *locus*. Os resultados conforme a Figura 1, apresentaram a amplificação de cada *locus* genético a partir de apenas 1 ng de DNA padrão.

Logo após, a eficiência de amplificação dos *loci* foi analisada em uma única reação de PCR (sistema multiplex). De acordo com a Figura 2, pode-se notar que houve amplificação do DNA padrão usado, na

FIGURA 1

Imagem do gel de eletroforese mostrando o produto da amplificação de PCR realizada por cada um dos cinco *loci* genéticos analisados, cada um representado por uma cor diferente: 1) CSF1PO-VIC; 2) FGA-6FAM; 3) TPOX-NED; 4) THO1-6FAM; e 5) D21S11-VIC (O 6-FAMTM corresponde a cor azul, o VICTM a verde, o NEDTM amarelo). Cada *slot* do gel continha 2 μ L do *primer* correspondente.

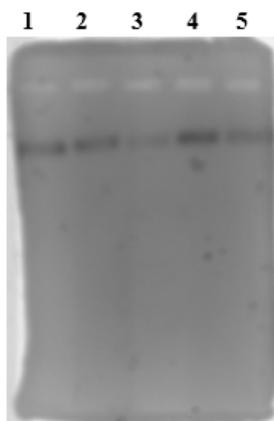
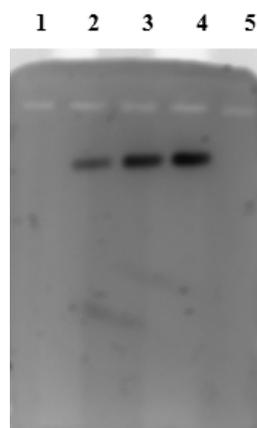


FIGURA 2

Imagem do gel de eletroforese mostrando o produto da amplificação de PCR realizada pelo sistema multiplex, contendo os cinco *loci* genéticos em uma única reação. Cada *slot* do gel contém concentrações diferentes de *primers*. No *slot* de número 2) 0,5 ng/ μ L de cada *primer*, no 3) 1,0 ng/ μ L de cada *primer* e no 4) 1,5 ng/ μ L de cada *primer*.



concentração de, aproximadamente, 1 ng/ μ L. E, na Figura 3, o DNA utilizado foi o extraído a partir de líquido amniótico, também com uma concentração aproximada de 1 ng.

Porém, para confirmar a amplificação dos cinco *loci*, o que não pôde ser feito através da análise do gel de agarose, foi realizado o seqüenciamento das amostras amplificadas. No Quadro 4, estão os resultados de cada *locus* e seus correspondentes alelos detectados.

Os alelos observados estão em concordância com o AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), ou seja, os *loci* foram amplificados com sucesso. O sistema multiplex composto por 1,0 ng (1 μ L) de cada *primer* demonstrou uma eficiência de amplificação dos *loci* superior aos testes convencionais utilizados em laboratório.

A construção desse sistema multiplex pode proporcionar aos cientistas a aplicação de uma nova ferramenta na busca de informações genéticas através da análise por DNA Humano. Além da redução dos custos dos testes genéticos laboratoriais de âmbito forense, por realizar, em uma única reação, a análise de cinco *loci* genéticos, simultaneamente.

Contudo, não se pode esquecer que, por trás de um acidente em massa ou de um caso de desaparecimento encontra-se, sempre, uma família desesperada por cada vítima e, quanto mais rápido for o processo de identificação dessas vítimas menor será o sofrimento e o estresse dos familiares como de toda uma sociedade.

V – Conclusão

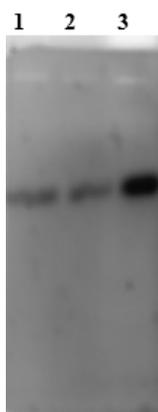
O aumento gradativo de atentados terroristas, acidentes em massa, crimes de difícil solução e de pessoas desaparecidas, estimulam a criação de novos testes de identificação por DNA que sejam mais eficazes.

O sistema multiplex formado por marcadores do tipo mini-STRs demonstrou minimizar os custos laboratoriais, o tempo de análise, e a aumentar a eficiência dos testes de identificação Humana por DNA. O alto poder de especificidade dos marcadores mini-STRs permite a análise de amostras forenses degradadas e de baixas concentrações de DNA, com alta eficiência de amplificação dos *loci*.

O sistema multiplex desenvolvido tem como perspectivas futuras a validação não só dos *loci* genéticos selecionados, mas também, das técnicas laboratoriais aplicadas, para que os resultados obtidos neste trabalho sejam reproduzidos em qualquer outro laboratório forense. Uma vez que, a capacidades desses iniciadores em identificar os alelos apresentados já apresenta um grande avanço para a construção de um sistema multiplex para análise forense.

FIGURA 3

Imagem do gel de eletroforese mostrando o produto da amplificação de PCR realizada pelo sistema multiplex, contendo os cinco *loci* genéticos em uma única reação. Cada *slot* do gel contém concentrações diferentes de *primers*. No *slot* de número 1) 0,5 ng/ μ L de cada *primer*, no *slot* 2) 1,0 ng/ μ L de cada *primer* e no 3) 1,5 ng/ μ L de cada *primer*. No *slot* 4 ocorreu vazamento da amostra do *slot* 3.



Referências

- ALVES, E. G. R. **Direitos Fundamentais - limitações necessárias**: aplicação do exame pericial do DNA para a identificação de pessoas. 2009. 53 f. Monografia (Especialização em Ordem Jurídica e Ministério Público) - Fundação Escola Superior do Ministério Público do Distrito Federal e Territórios (FESMPDFT). Brasília, 2009.
- ASAMURA, H. et al. MiniSTR multiplex systems based on non-CODIS loci for analysis of degraded DNA samples. **Forensic Sci Int**, v. 173, n. 1, p. 7-15, nov. 2007.
- AVISE, J. C.; POWER, A. J.; WALKER, D. Genetic sex determination, gender identification and pseudohermaphroditism in the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca: Melongenidae). **Proc Biol Sci**, v. 271, n. 1539, p. 641-6, Mar. 2004.
- BING, D. H.; BIEBER, F. R. RFLP analysis of forensic DNA samples with single-locus VNTR genetic markers. **Curr Protoc Hum Genet**, chapter 14, unit 14.5, May 2001.
- BONACCORSO, N. **Análise Forense de DNA**. 2004. 2004 f. (Graduação) - ACADEPOL, Rio de Janeiro, 2004.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-86, jul. 1999.
- BROWN, Terence A. **Genomes**. 2. ed. Oxford: Wiley-Liss, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/>>
- BUTLER, J. M. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. **J Forensic Sci**, v. 51, n. 2, p. 253-65, mar. 2006.
- BUTLER, J. M. et al. Quality control of PCR primers used in multiplex STR amplification reactions. **Forensic Sci Int**, v. 119, n. 1, p. 87-96, Jun. 2001.
- BUTLER, J. M. et al. Reliable genotyping of short tandem repeat loci without an allelic ladder using time-of-flight mass spectrometry. **Int J Legal Med**, v. 112, n. 1, p. 45-9, 1999.
- BUTLER, J. M.; SHEN, Y.; MCCORD, B. R. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. **J Forensic Sci**, v. 48, n. 5, p. 1054-64, set. 2003.
- CANNINGS, C. Calculation of risk factors and likelihoods for familial diseases. **Comput Biomed Res**, v. 9, n. 4, p. 393-407, ago. 1976.
- CAVALCANTI, E. São Paulo: USP, 2006. Trabalho não publicado.

CERQUEIRA, N. Banco de DNA ajuda na localização de menores desaparecidos **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, 2008. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/comciencia/?section=3¬icia=363>>.

CHAMBON, P. Split genes. **Sci Am**, v. 244, n. 5, p. 60-71, maio 1981.

CHEMELLO, E. Ciência Forense: exame de ADN. **Química Virtual**, março 2007.

COBLE, M. D.; BUTLER, J. M. Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. **J Forensic Sci**, v. 50, n. 1, p. 43-53, jan. 2005.

DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Dev Biol**, v. 278, n. 2, p. 274-88, fev. 2005.

DOLINSKY, L. P.; Pereira, L. M. C. V. DNA Forense: artigo de revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, 2007.

DRABEK, J. et al. Concordance study between Miniplex assays and a commercial STR typing kit. **J Forensic Sci**, v. 49, n. 4, p. 859-60, jul. 2004.

ELSTON, R. C.; STEWART, J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. **Hum Hered**, v. 21, n. 6, p. 523-42, 1971.

FIGUEIREDO, André Luís dos Santos; PARADELA, Eduardo Ribeiro. Bancos de dados de DNA: Uma ferramenta investigativa útil. **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, IX, n. 32, ago 2006. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=1235>. Acesso em: set 2012.

FISCHER, A. J. Techniques of crime scene investigation. In: PRESS, C. (Ed.). **Techniques of Crime Scene Investigation**, 2000. p. 584.

GILBERT, W. Why genes in pieces? **Nature**, v. 271, n. 5645, p. 501, fev. 1978.

GILL, P. et al. The evolution of DNA databases—recommendations for new European STR loci. **Forensic Sci Int**, v. 156, n. 2-3, p. 242-4, jan. 2006.

GÓES, Andréa C. S. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. **Revista do Biomédico**, v. 65, 2002. Disponível em: <http://www.crbm1.com.br/bio65/artigocien_65.asp>.

GRIFFITHS, A. J. F. M. et al. **RFLP Mapping**. 7. ed. Harvard, 1999. (An Introduction to Genetic Analysis).

GRUBWIESER, P. et al. A new “miniSTR-multiplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. **Int J Legal Med**, v. 120, n. 2, p. 115-20, mar. 2006.

HILL, C. R. et al. Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. **J Forensic Sci**, v. 53, n. 1, p. 73-80, jan. 2008.

JEFFREYS, A. J.; BROOKFIELD, J. E.; SEMEONOFF, R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. **Nature**, v. 317, n. 6040, p. 818-9, 31 out./6 nov., 1985.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 67-73, 7-13 mar., 1985.

LEE H. C.; GAENSLEEN, R. E. DNA and Other Polymorphisms in Forensic Science. **Advances in forensic sciences**, Chicago, 1990. p. 278.

LYNCH, M. God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. **Endeavour**, v. 27, n. 2, p. 93-7, jun. 2003.

MARIUZZO, P. Institutos de perícia usam biologia molecular na investigação policial. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 59, 2007.

MARTIN, P. et al. Allele frequencies of six miniSTR loci (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441 and D1S1677) in a Spanish population. **Forensic Sci Int**, v. 169, n. 2-3, p. 252-4, 4 jul. 2007.

MATTE, U.; GOLDIM, J. R. Bancos de DNA: considerações éticas sobre o armazenamento de material genético. Disponível em: <<http://w.ufrgs.br/bioetica/bancodn.htm>>.

MCKUSICK, V. A. et al. A tecnologia do DNA na ciência forense. Ribeirão Preto: Funpec, 1999.

MONAGHAN, F.; CORCOS, A. On the origins of the Mendelian laws. **J Hered**, v. 75, n. 1, p. 67-9, jan./fev. 1984.

MORTON, N. E. DNA forensic science 1995. **Eur J Hum Genet**, v. 3, n. 2, p. 139-44, 1995.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci Am**, v. 262, n. 4, p. 56-61, 64-5, abr. 1990.

NIEDERSTATTER, H. et al. Characterization of mtDNA SNP typing and mixture ratio assessment with simultaneous real-time PCR quantification of both allelic states. **Int J Legal Med**, v. 120, n. 1, p. 18-23, jan. 2006.

PACINI, D. B. Banco Genômico: Identificação Genética de Díptero de Interesse Forense. **CRBioDigital**, 2011. Disponível em: <<http://www.crbiodigital.com.br/portal?txt=3577313236>>.

PARADELA, Eduardo Ribeiro; FIGUEIREDO, André Luís dos Santos; SMARRA, André Luís Soares. A identificação humana por DNA: aplicações e limites. In: **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, IX, n. 30, jun 2006. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=1175>. Acesso em set 2012.

PARSONS, T. J. et al. Application of novel "mini-amplicon" STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. **Forensic Sci Int Genet**, v. 1, n. 2, p. 175-9, jun. 2007.

PENA, S. D. J. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. **Bioética**, v. 5. , p. 231-241, 1997.

RENWICK, J. H. Progress in mapping human autosomes. **Br Med Bull**, v. 25, n. 1, p. 65-73, jan. 1969.

ROZEN, S. S.; SKALETSKY, H. J. **Primer3**. 1998. Disponível em: <primer3.sourceforge.net>.

STRACHAN, Tom; READ, Andrew P. **Human molecular genetics**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7580/?depth=1>>.

TRIGGS, C. M.; BUCKLETON, J. S. Logical implications of applying the principles of population genetics to the interpretation of DNA profiling evidence. **Forensic Sci Int**, v. 128, n. 3, p. 108-14, 28 ago. 2002.

WALSH, S. J. Recent advances in forensic genetics. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 4, n. 1, p. 31-40, jan. 2004.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-8, 25 abr. 1953.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet**, v. 44, n. 3, p. 388-96, mar. 1989.

YONG, H. S. Principles and scope of population genetics in the study of vector mosquitoes. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 19, n. 4, p. 657-9, dez. 1988.