

O USO DE MICROSSATÉLITES (STR) PARA COMPROVAÇÃO DE VÍNCULOS BIOLÓGICOS

Coordenador: MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA

Autor: GABRIELA ROSA DA CUNHA

O DNA é a macromolécula presente em todas as células somáticas do organismo que tem a função de armazenar a informação genética de um indivíduo, sendo responsável por todas as características desse indivíduo. Desta forma, é possível a identificação de relações de vínculo biológico, como, por exemplo, testes de paternidade, através da análise de certas seqüências que se repetem em regiões não codificantes do genoma humano. Os microssatélites, ou também chamados STR (short tandem repeats), são constituídos por repetições de unidades de 2 a 6 pares de bases (pb) e a variação do número de repetições dessas unidades são polimórficas, isto é, apresentam número variável de indivíduo para indivíduo. Os STR, por serem de tamanho pequeno, podem ser analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR - polymerase chain reaction). Quando analisamos várias regiões de STR e comparamos os resultados obtidos, o conjunto desses dados apresenta um alto poder discriminatório. Isso significa que é possível atingir a uma elevada precisão durante uma análise de identificação humana, podendo identificar um indivíduo em um conjunto de bilhões deles. Por isso, a identificação dos alelos presentes nestas regiões é realizada por um sistema de PCR com o uso de um conjunto de primers, os quais, por terem sido marcados com compostos fluorescentes, podem ser facilmente identificados. Após a amplificação destas regiões, os fragmentos são separados por eletroforese capilar e os diferentes loci dos indivíduos testados são comparados e analisados através de programa de computador específico. O princípio desta análise comparativa se dá pelo fato que um filho sempre irá herdar um cromossomo de sua mãe biológica e o outro cromossomo deverá conter as informações herdadas do pai biológico. Após a análise de várias regiões do genoma, o conjunto de resultados é submetido a testes estatísticos para comparar os resultados obtidos em um caso específico com as frequências populacionais dos alelos encontrados. Assim, testes de identificação humana por esta metodologia apresentam uma alta especificidade e resultados de elevada confiabilidade por serem realizados através de técnicas laboratoriais bem consolidadas. O objetivo dessa ação é oferecer à comunidade testes laboratoriais visando a identificação genética (como testes de paternidade) de seres humanos através de análise de DNA de regiões específicas desses indivíduos. Os indivíduos

que realizam o teste (mãe, filho e suposto pai, em casos típicos) são submetidos a uma entrevista conjunta, para identificação completa dos mesmos e verificação da documentação de identidade, além de esclarecimentos de todas as dúvidas pertinentes a realização do testes. A seguir, amostras de 5mL de sangue são colhidas de cada indivíduo e colocadas em tudo de coleta estéril contendo EDTA como anticoagulante. A extração de DNA é realizada com 100uL de amostra utilizando o produto illustra GFXTM Genomic Blood DNA PurificationKit (GE Healthcare) e o DNA extraído é diluído 15 vezes. As regiões do genoma usadas para as análises são amplificadas através do uso dos produtos AmpFISTR® Identifiler® Kit (Applied Biosystems), o qual analisa STRs em 15 loci distintos (CSF1P0, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA) e mais o marcador de gênero amelogenina. Quando necessário, as amostras também são submetidas a análise pelo produto PowerPlex® 16 System (Promega Corporation) que analisa dois loci adicionais, o Penta D e o Penta E. Da amostra de DNA diluído, uma alíquota de 1uL é submetida à reação de PCR e o produto ao final da amplificação é submetido a eletroforese capilar para separação dos fragmentos, que representam os alelos de cada amostra. Essa eletroforese capilar é realizada no aparelho 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e os resultados são analisados pelo GeneMapper® ID Software v3.2 (Applied Biosystems). Os resultados de todas essas análises permitem confirmar uma relação de vínculo biológico com uma probabilidade igual ou superior a 99,99%. Da mesma forma, quando os alelos não são compartilhados entre os indivíduos testados em três ou mais loci, podemos concluir pela ausência de vínculo biológico. Essa ação é realizada pelo nosso laboratório a alguns anos, mas não fazemos ainda uma divulgação ativa dessa atividade. Portanto, os casos que realizamos são de indivíduos que procuram o laboratório de forma espontânea. Por questões de confidencialidade, não podemos divulgar os resultados detalhados das análises. Entretanto, podemos dizer que, até o momento, considerando somente os casos de 2008, a maioria deles foram de casos típicos de teste de paternidade, isto é, com a presença da mãe, filho e do suposto pai. Foram realizados também casos atípicos, isto é, casos em que o suposto pai já era falecido, sendo, portanto, necessário a análises de filhos biológicos desse suposto pai para reconstituir o perfil biológico dele. Com a experiência adquirida, podemos dizer que a aplicação da metodologia combinada de PCR e eletroforese capilar para identificação de regiões polimórficas do genoma humano visando esclarecer a existência ou não de vínculos biológicos é uma poderosa ferramenta na elucidação dos mesmos. O teste pode ser realizado com pequenas quantidades de amostra, podendo ser aplicado até mesmo em pequenas quantidades de material, como no caso de

swab bucal que é realizado com frequência em recém-nascidos. Os usuários da ação, o público em geral, demonstraram satisfação em poder desfrutar de atendimento diferenciado, dentro do ambiente acadêmico, e realizar testes de qualidade internacional, a custos reduzidos e de alta confiabilidade.