
*Estudo para identificação de informações genéticas
Sistema de Locos de STRs em DNA*

Requisitante

HAOMA by Dnaclinic

Pessoas Examinadas

A	Suposto Pai
C	Filha
D	Filha

Médico responsável

Dr Martin Whittle - CRM[SP] 66.459

Material do exame

DNA

Responsáveis pela perícia

Identificação dos periciandos

Coleta do material

Exames Laboratoriais

Genomic Engenharia Molecular Ltda

Interpretação dos resultados

Dr Martin Whittle - CRM[SP] 66.459

Suzane de Andrade Barboza - CRBio 109.576/01-D

Referência 103175118-ACD

A investigação de vínculo genético de filiação

A investigação de vínculo genético de filiação por DNA permite determinar se um indivíduo é ou não o pai (ou mãe) biológico de outro indivíduo. Diferentemente dos exames usados no passado, com os quais somente era possível provar que uma pessoa não era o pai biológico de outra, a análise do DNA permite uma resposta definitiva. A suposta paternidade é comprovada (inclusão de paternidade) ou refutada (exclusão de paternidade) com altíssimo grau de precisão.

Isso é possível porque cada pessoa possui um conjunto único de informações genéticas, herdadas de seus pais biológicos. Todos os organismos vivos são compostos de células, que possuem um núcleo contendo material genético. Esse material se encontra reunido em estruturas celulares chamadas cromossomos, os quais ocorrem aos pares. No núcleo de todas as células de um indivíduo, cada par de cromossomos contém dois conjuntos de informações genéticas. Um desses conjuntos é proveniente da mãe biológica, o outro do pai biológico.

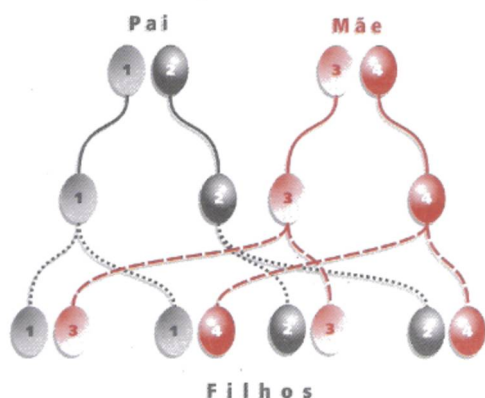
No processo de fecundação, quando o espermatozoide do pai se une ao óvulo da mãe, metade das informações genéticas do pai e metade das da mãe são “copiadas” na célula embrionária resultante. Assim, esta contém informações genéticas da mãe e do pai. A formação do embrião se dá por subdivisões celulares sucessivas a partir dessa primeira célula. Na divisão celular, as informações genéticas são replicadas. Assim, cada nova célula possui a mesma informação genética presente na primeira célula.

A maioria das informações genéticas é idêntica para os diferentes indivíduos da espécie humana - é isso que explica o fato de todas as pessoas terem as mesmas características gerais: a quantidade de dedos, a forma geral do corpo e todas as demais peculiaridades que nos distinguem de outras espécies. Entretanto, para um grande número de características genéticas, as informações são semelhantes, mas não idênticas. Isso explica as diferenças que existem entre as pessoas: a cor da pele, dos olhos etc. As informações genéticas que variam na população chamam-se *polimorfismos* (“muitas formas”). É por meio da análise dessas informações polimórficas que se torna possível determinar as relações de vínculo genético entre duas pessoas. Como metade das informações genéticas de todo indivíduo veio de seu pai biológico e metade da mãe, a comparação entre as informações dos três permite afirmar com certeza se existe ou não o vínculo genético entre elas.

Na investigação de paternidade, analisa-se um mínimo de dezessete informações genéticas (chamadas *locos*, porque ocorrem em regiões determinadas do cromossomo). Cada loco pode se apresentar de várias formas e cada uma destas formas chamamos de alelo. Cada pessoa possui, então, dois alelos. O ponto de partida são os alelos presentes no filho. Baseando-se na premissa de que a mãe é de fato mãe biológica do periciando, um dos alelos deste último precisa, necessariamente, coincidir com um dos alelos da mãe. Quanto ao outro alelo, há duas possibilidades: está presente no suposto pai ou não está presente no suposto pai. No primeiro caso, pode-se afirmar que os resultados desse loco são compatíveis com a hipótese de o suposto pai ser de fato pai biológico do periciando.

No segundo caso, o suposto pai não pode ser o pai biológico.

O melhor modo de visualizar como isso se dá é por meio de uma representação gráfica. Na figura estão representados um par de cromossomos de cada um dos pais. Neste exemplo, num determinado loco estão presentes quatro alelos diferentes, um em cada um dos quatro cromossomos. O filho biológico daquele pai e daquela mãe deve, necessariamente, herdar uma das quatro combinações representadas na figura.



Partindo-se da premissa de que a mãe é, de fato, mãe biológica do filho, este último apresentará necessariamente um dos dois alelos (simbolizado na figura como 3 e 4), naquele loco. Para que o filho seja filho biológico do suposto pai, o outro alelo do loco precisa ser 1 ou 2. Caso isso não aconteça, pode-se concluir, com certeza, que não há vínculo de filiação.

O processo de análise é repetido para cada um dos locos genéticos estudados. Após isso ser feito com todos os locos sujeitos à análise, duas conclusões podem ser atingidas:

1. Os alelos do filho não coincidem com os alelos do suposto pai. A paternidade é, então, excluída, com certeza de 100 por cento.
2. Em todos os locos estudados, os alelos presentes no filho e não provenientes da mãe são encontrados no suposto pai (inclusão de paternidade). Isto leva à conclusão de que o suposto pai é, de fato, o pai biológico do examinando. Como a Genomic realiza a análise sobre locos altamente polimórficos, o grau de certeza dos casos de inclusão de paternidade quando o exame se faz no trio suposto pai/mãe/filho é superior a 99,99 por cento.

Exames com suposto pai falecido (ou ausente)

Em perícias desta natureza existem duas opções: tentar extrair o DNA da ossada ou compor as características genéticas do falecido por meio de material colhido de parentes próximos (filhos biológicos reconhecidos ou registrados, pais, irmãos).

Os resultados dessa perícia dependem do sucesso na reconstituição dos genótipos da pessoa falecida. O grau de confiança do resultado dependerá do número de indivíduos analisados, dos vínculos genéticos que mantêm entre si e em relação à pessoa falecida e da quantidade de locos analisados.

Quando o indivíduo requerente é do sexo masculino, bem como algum parente do falecido, são utilizados os estudos de locos genéticos situados no cromossomo Y para auxiliar nas inferências de vínculo genético entre o requerente e os parentes do falecido. De modo análogo, quando ele é do sexo feminino, são utilizados os estudos de locos genéticos localizados no cromossomo X.

Outras variações do exame

O exame de irmandade é realizado quando dois indivíduos querem saber se são irmãos biológicos, sem a participação de outros familiares disponíveis para análise. Neste exame são comparados os dois perfis genéticos e calculado o grau de certeza deles serem irmãos plenos ou deles serem meio-irmãos (por parte de pai ou de mãe).

Já o exame denominado de paternidade e maternidade conjunta calcula o grau de certeza de duas pessoas serem do indivíduo requerente, simultaneamente, o pai e a mãe.

Circunstâncias especiais

Pessoas que sofreram transplante de medula óssea não podem ser submetidas ao exame a partir de amostras de sangue. Como as células sanguíneas são produzidas na medula, toda amostra de sangue dessas pessoas conterá células com DNA predominantemente do doador, prejudicando, assim, a possibilidade de se realizar a identificação genética. Nesses casos, deve-se colher amostras de outros tecidos, como por exemplo unha ou bulbo capilar.

Informações técnicas sobre a investigação de vínculo genético de filiação

A molécula de DNA é composta de uma sequência de unidades bioquímicas denominadas bases ou nucleotídeos. É sabido que as informações genéticas individuais residem em segmentos específicos da molécula do DNA. Exceto por gêmeos univitelinos, cujos DNAs são idênticos, dois indivíduos diferentes sempre apresentam diferenças em suas informações. Tais diferenças, denominadas *polimorfismos*, servem como marcadores genéticos. Quanto mais polimórficos forem os locos analisados, maiores são as chances de que eles sejam informativos na determinação da paternidade. Quanto maior o número de locos polimórficos analisados, maior o grau de certeza obtido na análise.

Em seus testes, a Genomic analisa dezessete ou mais locos genéticos, ou *STRs (short tandem repeats)* chamados também de *microsatélites*. Eles são extremamente polimórficos, apresentando, cada qual, mais de dez alelos diferentes na população brasileira. Isso significa que a probabilidade de uma dada combinação de alelos ocorrer ao acaso na população brasileira é menor do que 0,01 por cento; isso fornece uma certeza maior do que 99,99 por cento nos casos de inclusão de paternidade em exames realizados com o trio suposto pai/mãe/filho. Os diferentes alelos desses locos podem ser distinguidos uns dos outros devido à variação do número de repetições de tetranucleotídeos (quatro nucleotídeos).¹

Em suas análises, a Genomic emprega DNA genômico extraído e purificado de amostras biológicas obtidas das pessoas em questão (geralmente leucócitos presentes no sangue). Para cada examinando, a determinação dos dois alelos de cada loco é realizada pela técnica da PCR (*polymerase chain reaction*, reação em cadeia de polimerase). Cada loco de microsatélite é amplificado usando-se oligonucleotídeos marcados com um grupo fluorescente.

(1) Desde 2009 é possível o emprego de locos bi-alelicos chamados SNPs (*single nucleotide polymorphisms*, polimorfismos de nucleotídeo único) e outros chamados de DIPs (*deletion-insertion polymorphisms*, polimorfismos de deleção-inserção) ou *indels*, para complementar o uso de STRs em investigações de vínculo genético de filiação. Estes variantes são os tipos mais comuns de diferenciação individual, tendo sido já descrito um vasto número destes marcadores.

Os alelos amplificados são analisados em sequenciador automático e seus comprimentos são determinados por meio da comparação com padrões alélicos (o conjunto dos alelos observados no loco em questão). Os resultados são registrados permanentemente no banco de dados da Genomic, podendo ser consultados na presença do perito.

Os cálculos de probabilidades são baseados em tabelas de frequências alélicas determinadas experimentalmente numa amostra representativa da população brasileira. Essa amostra é ampliada continuamente, e as frequências, correspondentemente atualizadas. Nos casos de trios suposto pai/mãe/filho, quando há inclusão de paternidade obtém-se uma certeza maior do que 99,99 por cento. Quando participam do exame apenas suposto pai e filho, o grau de certeza supera os 99,9 por cento. Nos casos de exclusão de paternidade, a Genomic sempre a confirma em mais de dois locos.

Ocasionalmente, observa-se exclusão em um único loco de um total de dezessete ou mais locos. Nessa situação, considera-se que houve uma mutação durante a transmissão do alelo paterno (também se observam mutações maternas). Como as taxas de mutação para cada loco são conhecidas, os cálculos de probabilidades podem ser ajustados correspondentemente.

Apresentação dos resultados (para trios e duos)

Os resultados da investigação de vínculo genético de filiação são apresentados na forma de uma tabela e de uma conclusão. A tabela traz, na primeira coluna, os locos genéticos analisados, identificados por seu nome de referência no banco mundial de dados de locos genéticos da espécie humana.

As colunas seguintes indicam a classificação internacional dos alelos encontrados nos examinandos.

A penúltima coluna contém, para cada alelo encontrado no filho, sua frequência em uma amostra significativa da população brasileira registrada no banco de dados da Genomic.

A informação presente na última coluna varia conforme o exame conclui pela inclusão ou pela exclusão. No primeiro caso, a coluna indica, para cada loco individual, seu índice de paternidade (ou de maternidade, conforme a investigação), ou seja, as possibilidades de o examinando ser filho biológico do suposto progenitor, contra uma possibilidade de não sê-lo. Esses números são calculados a partir das frequências alélicas. A última linha da tabela traz o índice acumulado de paternidade (ou maternidade, quando for o caso), obtido pelo produto dos índices de paternidade de cada loco, seguindo a metodologia bayesiana com probabilidade inicial de 50 por cento.

No caso de exclusão, a última coluna indica os locos genéticos nos quais o filho não possui alelos provenientes do suposto progenitor. Portanto, o índice de paternidade associado a eles é 0.

Referências bibliográficas

- Applied Biosystems (2010) : AmpFl STR® Identifiler® PCR Amplification Kit User's Manual.
- Butler, J. M. (2007) : Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques* **43**, S2-S5.
- Hepler, A. B., Weir, B. S. (2008): Object-oriented Bayesian networks for paternity cases with allelic dependencies. *Forensic Science International: Genetics* **2**, 166-175.
- Jobling, M. A., Gill, P. (2004): Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics* **5**, 739-751.
- Kayser, M. (2007): Uni-parental markers in human identity testing including forensic DNA analysis. *BioTechniques* **43**, S15-S21.
- Morling, N., Allen, R. W., Carracedo, A. *et al.* (2002): Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. *Forensic Science International* **129**, 148-157.
- Pereira, R., Phillips, C., Alves, C. *et al.* (2010): A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis* **30**, 3682-3690.
- Phillips, C., Fondevila, M., García-Magariños, M. *et al.* (2008): Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Science International: Genetics* **2**, 190-204.
- Silveira, D., Silva, F. F., Jesus, P. R. *et al.* (2007) Use of X-linked short tandem repeat loci in routine parentage casework. *Transfusion* **47**, 1050-1053.
- Szibor, R., Krawczak, M., Hering, S. *et al.* (2003): Use of X-linked markers for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine* **117**, 67-74.
- Traver, M. (2006) : Appendix 8 : Formulas for paternity index and RMNE values for simple codominant systems. Guidance for standards for relationship testing laboratories 7^a ed. p. 139. American Association of Blood Banks.
- Whittle, M. R., Romano, N. L., Negreiros, V. A. (2004): Updated Brazilian genetic data, together with mutation rates, on 19 STR loci, including D10S1237. *Forensic Science International* **139**, 207-210.

Resultados

Locos	Suposto Pai	Genótipos	Filha	Frequências dos alelos da filha	Índice de paternidade
D10S1237	25 / 24		27 / 25	0,00083 / 0,03700	6,76
D13S317	12 / 11		11 / 8	0,29628 / 0,10135	0,84
D16S539	13 / 12		13 / 13	0,15347 / 0,15347	3,26
D18S51	18 / 15		18 / 18	0,07542 / 0,07542	6,63
D19S433	16.2 / 14		16.2 / 14	0,01577 / 0,28210	16,73
D1S1656	16 / 15		16 / 15	0,13183 / 0,16602	3,40
D21S11	30 / 29		32.2 / 30	0,09905 / 0,23948	1,04
D22S1045	16 / 15		16 / 16	0,34114 / 0,34114	1,47
D2S1338	24 / 20		20 / 20	0,12694 / 0,12694	3,94
D3S1358	15 / 11		17 / 11	0,20218 / 0,00050	496,93
D7S820	12 / 9		12 / 9	0,16324 / 0,11801	3,65
HUMCSF1PO	13 / 10		13 / 12	0,05947 / 0,31907	4,20
HUMF13B	9 / 9		10 / 9	0,34504 / 0,24934	2,01
HUMFIBRA_FGA	25 / 21		25 / 24	0,10637 / 0,15266	2,35
HUMTH01	8 / 6		7 / 6	0,23890 / 0,21752	1,15
HUMTPOX	11 / 10		10 / 8	0,06395 / 0,46079	3,91
HUMVWA	17 / 16		16 / 16	0,26329 / 0,26329	1,90
Penta D	13 / 10		14 / 10	0,06174 / 0,14307	1,75
Penta E	13 / 11		13 / 11	0,11291 / 0,11210	4,44

Índice de paternidade acumulado = 100.445.242.730,09

Referência 103175118-ACD

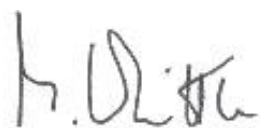
Conclusão:

Em material genético (DNA) extraído de amostras biológicas dos examinandos, identificaram-se alelos de dezenove locos de STRs. Em cada um dos dezenove locos examinados um dos alelos encontrados na filha estava também presente no suposto pai. Este resultado demonstra que a hipótese de existir vínculo de filiação não pode ser excluída.

A partir das frequências destes alelos numa amostra representativa da população brasileira e da combinação de alelos nos examinandos, verifica-se que o índice de paternidade acumulado é de 100.445.242.730,09.

Concluimos, portanto, que A é o pai biológico de C com probabilidade de paternidade maior do que 99,99 por cento.

São Paulo, 07 de maio de 2018

Dr Martin Whittle - CRM[SP] 66.459
Médico ResponsávelSuzane de Andrade Barboza- CRBio 109.576/01-D
Técnica Responsável

Autenticação: B13033B1B7353AB260171F67236303C6

Resultados

Locos	Suposto Pai	Genótipos	Filha	Frequências dos alelos da filha	Índice de paternidade
D10S1237	25 / 24		24 / 18	0,05020 / 0,08977	4,98
D13S317	12 / 11		12 / 11	0,29394 / 0,29628	1,69
D16S539	13 / 12		13 / 13	0,15347 / 0,15347	3,26
D18S51	18 / 15		18 / 18	0,07542 / 0,07542	6,63
D19S433	16.2 / 14		16.2 / 14	0,01577 / 0,28210	16,73
D1S1656	16 / 15		17 / 15	0,03837 / 0,16602	1,51
D21S11	30 / 29		32.2 / 30	0,09905 / 0,23948	1,04
D22S1045	16 / 15		16 / 16	0,34114 / 0,34114	1,47
D2S1338	24 / 20		24 / 23	0,08374 / 0,11092	2,99
D3S1358	15 / 11		16 / 11	0,27055 / 0,00050	496,93
D7S820	12 / 9		12 / 11	0,16324 / 0,23878	1,53
HUMCSF1PO	13 / 10		13 / 12	0,05947 / 0,31907	4,20
HUMF13B	9 / 9		10 / 9	0,34504 / 0,24934	2,01
HUMFIBRA_FGA	25 / 21		25 / 21	0,10637 / 0,14947	4,02
HUMTH01	8 / 6		8 / 7	0,14407 / 0,23890	1,74
HUMTPOX	11 / 10		10 / 8	0,06395 / 0,46079	3,91
HUMVWA	17 / 16		16 / 16	0,26329 / 0,26329	1,90
Penta D	13 / 10		14 / 13	0,06174 / 0,16417	1,52
Penta E	13 / 11		13 / 11	0,11291 / 0,11210	4,44

Índice de paternidade acumulado = 47.283.121.428,52

Referência 103175118-ACD

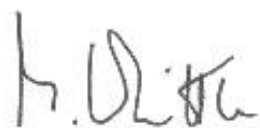
Conclusão:

Em material genético (DNA) extraído de amostras biológicas dos examinandos, identificaram-se alelos de dezenove locos de STRs. Em cada um dos dezenove locos examinados um dos alelos encontrados na filha estava também presente no suposto pai. Este resultado demonstra que a hipótese de existir vínculo de filiação não pode ser excluída.

A partir das frequências destes alelos numa amostra representativa da população brasileira e da combinação de alelos nos examinandos, verifica-se que o índice de paternidade acumulado é de 47.283.121.428,52.

Concluimos, portanto, que A é o pai biológico de D com probabilidade de paternidade maior do que 99,99 por cento.

São Paulo, 07 de maio de 2018

Dr Martin Whittle - CRM[SP] 66.459
Médico ResponsávelSuzane de Andrade Barboza- CRBio 109.576/01-D
Técnica Responsável

Autenticação: B13033B1B7353AB260171F67236303C6