



Genética Forense

- A Genética forense tem sido utilizada na identificação humana, utilizando marcadores genéticos não fenotípicos. A escolha destes marcadores para a análise forense foi impulsionada principalmente pela sua diversidade polimórfica, juntamente com o fato de garantirem o anonimato civil dos indivíduos analisados, não sendo possível determinar doenças, comportamento, “raça” e características físicas.
- O DNA empregado nesses processos é geralmente obtido de ossos ou dentes, fio de cabelo, sangue, tecido, sêmen, saliva e urina.

Genética Forense



- A determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para:
 - Demonstrar a culpabilidade dos criminosos ou exonerar os inocentes.
 - Identificar corpos e restos humanos em desastres aéreos e campos de batalha.
 - Determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta.
 - Elucidar trocas de bebês em berçários.
 - Detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica.

Marcadores genéticos

Qualquer característica situada na mesma região em um par de cromossomos homólogos que permite distinguir um homólogo do outro

- Um locus que tenha alelos facilmente classificáveis e que possa ser usado em estudos genéticos.
- Pode ser um gene ou um sítio de enzima de restrição, bem como qualquer característica do DNA que permita que versões diferentes de um locus (ou seu produto) sejam distintas umas das outras e seguidas nas famílias

Variabilidade genética

Variabilidade genética

- ❑ Modificação no material genético de um organismo

- ❑ Alteração fenotípica?

- ❑ **Fonte da variabilidade**

- ❑ Variações no genoma - novos alelos

- ❑ Matéria prima para o processo de **evolução**

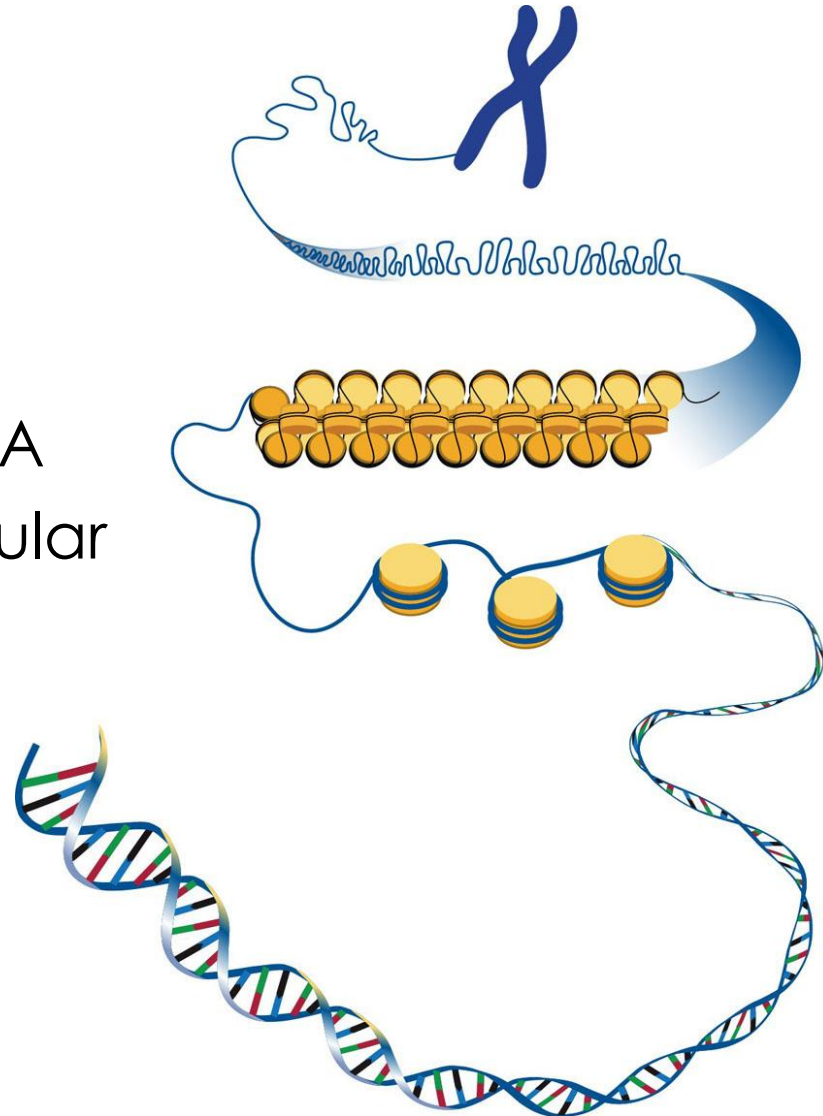


- ❑ Recombinação: Rearranjo da variabilidade

- Desenvolvimento de **marcadores genéticos**

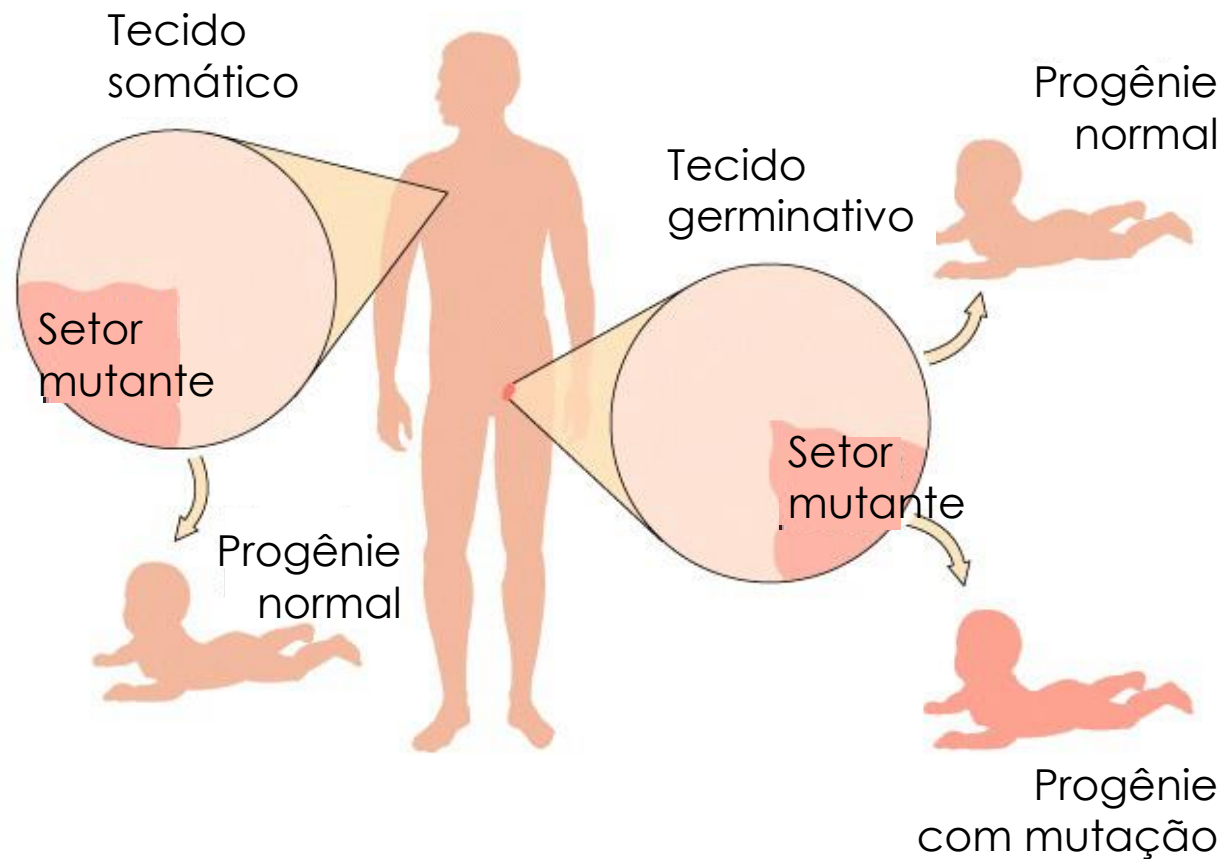
Genoma Humano - DNA

- **Variações genéticas**
- **Alterações**
 - Erros de replicação do DNA
 - Erros durante a divisão celular
- Agentes externos
 - Mutagênicos químicos
 - Vírus



Alterações genéticas - mutações

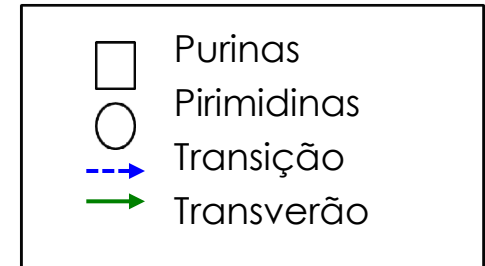
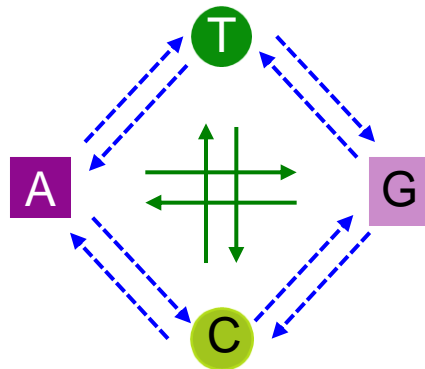
- Somáticas: não transmissíveis
- Germinativas: herdáveis



Base Molecular das Mutações

Mutação de Ponto:

➤ Substituição de Bases



- Mutação de sentido trocado (missense)
- Mutação sem sentido (nonsense)
- Inserções, deleções

Alterações cromossômicas estruturais

- Translocações

Marcadores moleculares - Definição

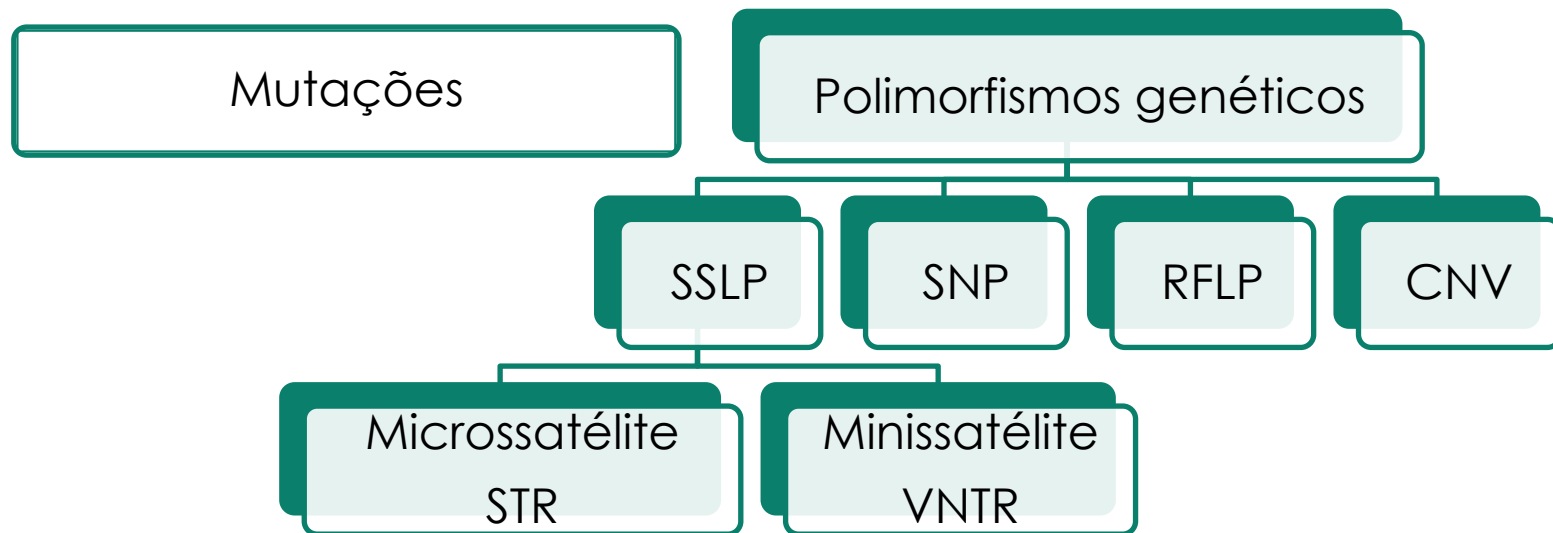
- ❑ Sequências de DNA herdáveis e distintas

- ❑ São baseados na ocorrência natural de polimorfismos de DNA
 - ❑ Adições/deleções de poucas bases
 - ❑ Substituições, inserções
 - ❑ Deleção/Duplicação
 - ❑ Repetições

Informativos

- I. Polimórficos
- II. Herança co-dominante
- III. Distribuídos aleatoriamente pelo genoma
- IV. Fácil detecção
- V. Reprodutibilidade

Tipos de marcadores moleculares



SSLP – Polimorfismo de comprimento de sequência simples

➤ Arranjos de sequências repetidas com variação no comprimento devido diferentes números de unidades repetidas (multi-alélicos).

➤ **DNA satélite > 100kb a Mb**

■ **MINISSATÉLITES (VNTR):**
número variável de repetições em tandem

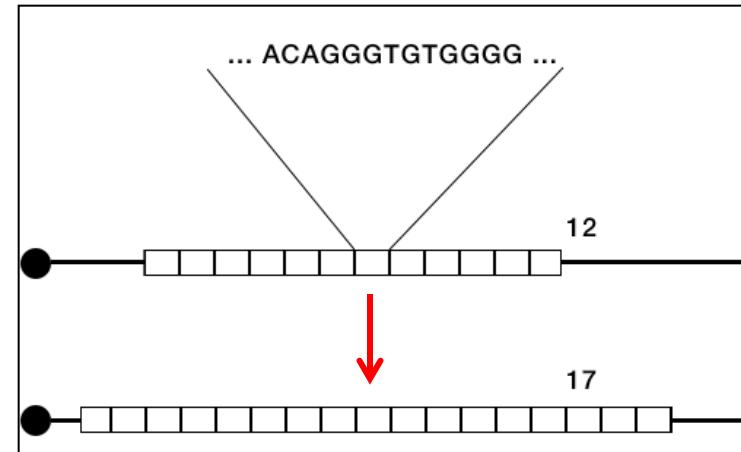
■ Unidades repetidas de DNA com 10-100 pb (30pb),

■ **MICROSSATÉLITES (STR):**
repetições em tandem curtas

■ Unidades repetidas de 2-4 pb

VNTRs - Minissatélites

- Unidades repetidas de DNA com 10-100 pb (30pb)
- Resultam de inserção em tandem
 - Erros durante a replicação
- Região teloméricas
 - Não transcritas
 - → sítio p/ recombinação homóloga
 - Instáveis (ou seja) muito mutáveis
 - Cada variante age como alelo herdado



STRs Microssatélites

❑ Unidades repetidas de 2-10 pb:

❑ CACA...CA

❑ CAACAA...CAA

❑ AAATAAAT...AAAT

❑ Regiões intrônicas

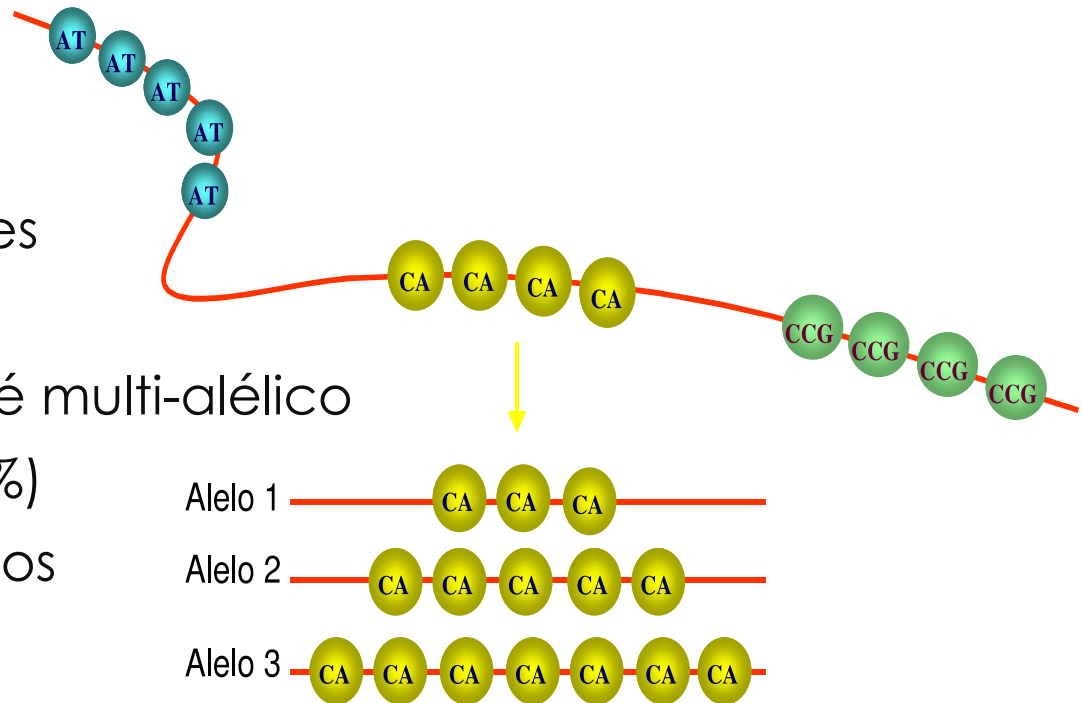
❑ Genoma humano

❑ $6,5 \times 10^5$ microssatélites

❑ Locus de microssatélite é multi-alélico

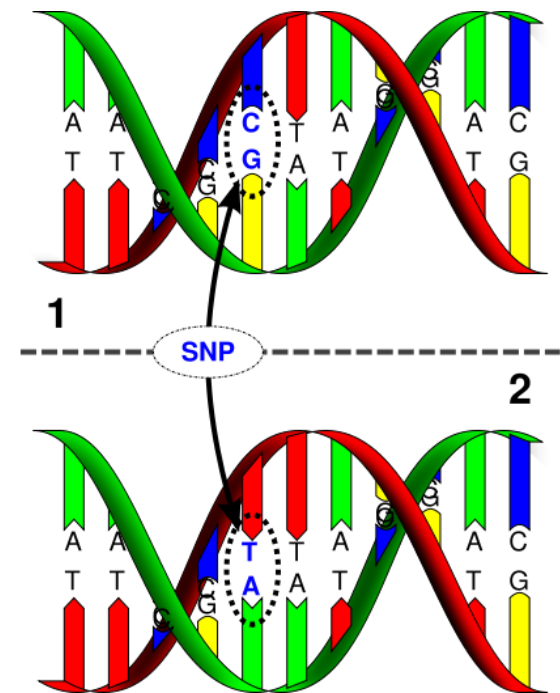
❑ Alta heterzigose (70%)

❑ Perfis genéticos únicos



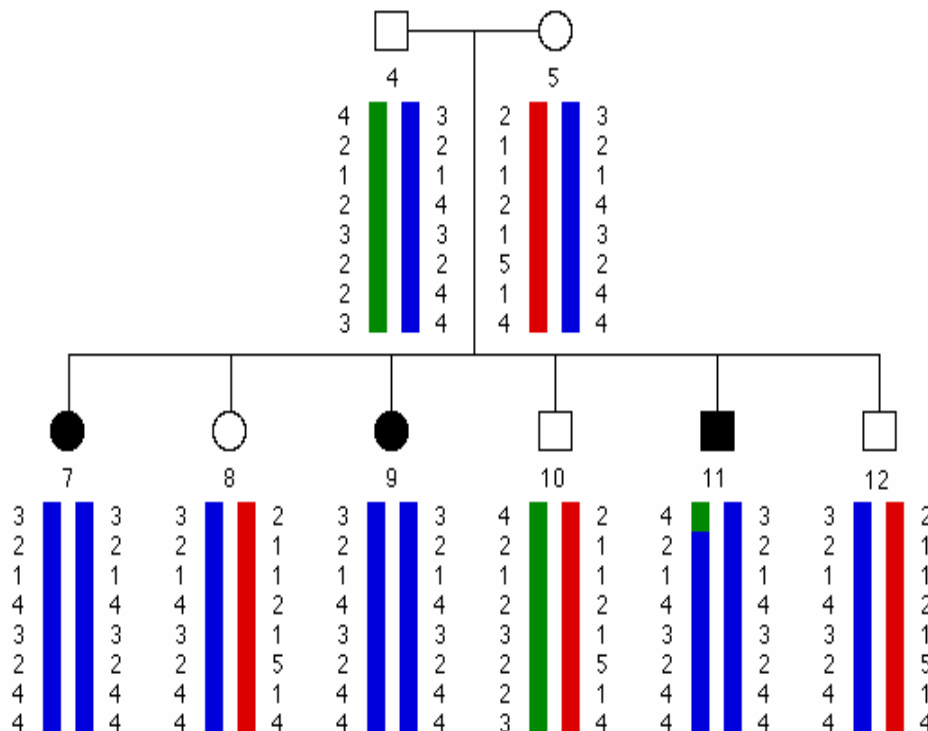
SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

- Mudanças de um único nucleotídeo distribuídas por todo o genoma.
- Aproximadamente 1:1350 pb no genoma
- Cerca de 1.42 milhões de SNPs no genoma
- Polimorfismos com dois alelos



- **SNPs - “single nucleotide polymorphisms”**
- Variações do número de pequenas sequências repetidas
- Mudanças deletérias em aminoácidos
- Sítios de reconhecimento de substrato
- Anulação de sítios de “start” transcricionais
- Códon de parada (proteína prematura)
- Deleção completa ou parcial do gene
- Alterações de “splicing”

Haplótipos



- Blocos de SNPs próximos são herdados em conjunto (1 a 100 kb)
- Haplótipos com vários SNPs são fenômenos únicos;
- Alguns SNPs são suficientes para identificar um haplótipo

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Endonucleases de restrição

EcoRI

5' ...AACTGC **G AATC** CTTAGACT...3'
3' ...TTGACA **CTTA G** GAATCTA...5'

Reconhecem sequências de restrição

➤ **Dois alelos possíveis:** com e sem sequência de restrição

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

- ❑ Amplifica sequências anônimas de DNA usando *primers* arbitrários
 - ❑ 10 bases com >50% G+C
 - ❑ PCR com um único *primer*
 - ❑ Método rápido para detecção de polimorfismos
 - ❑ Marcador dominante
-
- Rápido , Simples, Baixo custo, Sem uso de radio-isótopos
 - Marcador dominante, Problemas de reproducibilidade, Problemas de interpretação

CNV – Variações número de cópias

- **Duplicações e deleções** de longos segmentos do DNA
com **1 Kb a 3 Mb**
- > 3000 CNVs; 800 com frequência na população > 3%
- Outros segmentos variáveis constituídos por translocações e
- Inversões de longos segmentos
- Variantes estruturais: 15% do genoma

Comparação entre Marcadores

	RFLP	RAPD	SSR
Polimorfismo	Pontual ou InDel	Pontual ou InDel	Nº de Rep.
Nível do Polimorfismo	Médio	Médio	Alto
Abundância	Alta	Média	MédiaAlta
Dominância	Co-Dominante	Dominante	Co-Dominante
[DNA]	10 ug	25 ng	50 ng
Marcação	Sim/Não	Não	Não
Repetibilidade	Alta	Baixa	Alta

Técnicas utilizadas para a Identificação dos marcadores genéticos

PCR (reação em cadeia da polimerase)

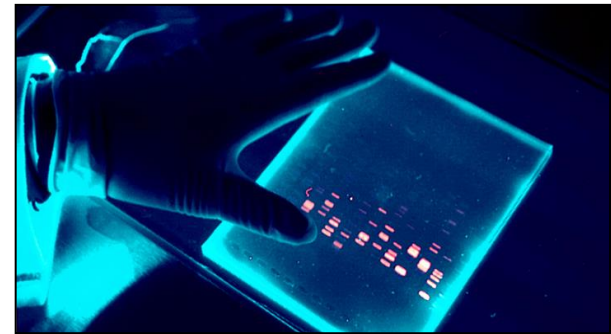
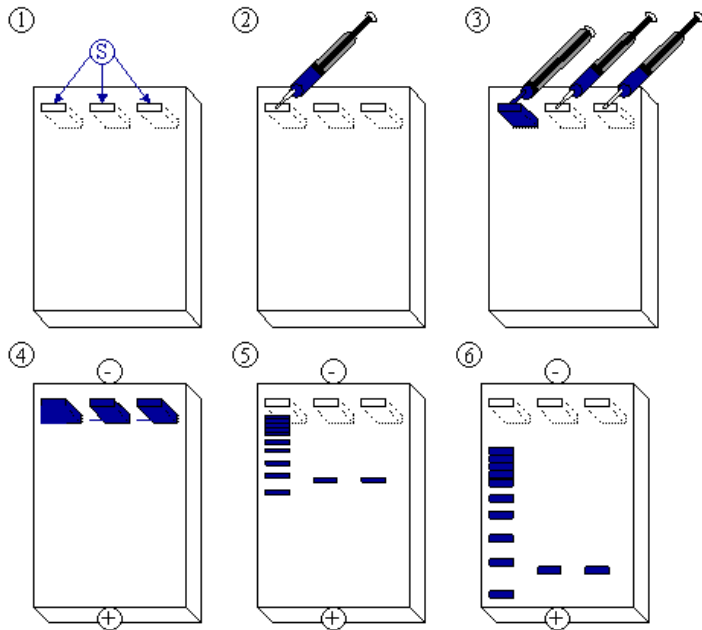
- Amplificação de ácidos nucleicos

- PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite gerar, em um tubo de ensaio, bilhões de cópias de uma determinada sequência de DNA de interesse, de maneira rápida, prática e barata.

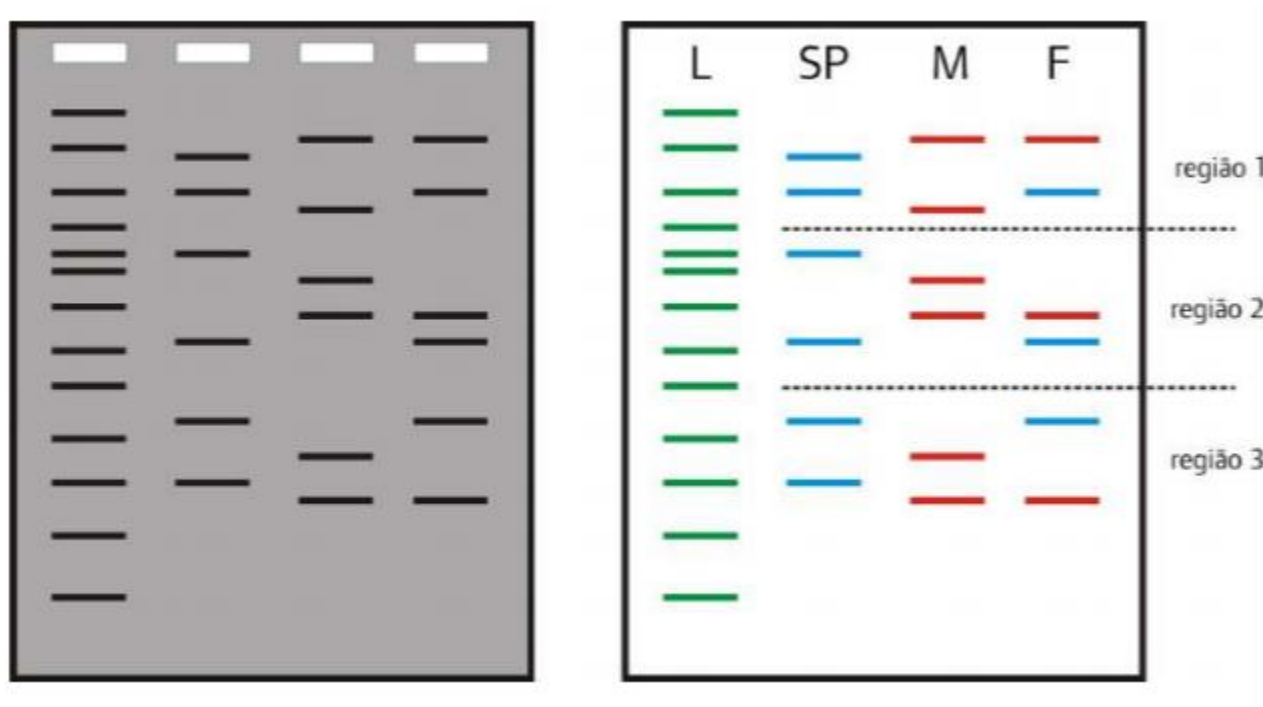
- Detecção marcadores moleculares

Utilização da Eletroforese em gel para visualização dos produtos de PCR



1. Produto de PCR
2. Preparação do gel
3. Aplicação das amostras
4. Separação dos fragmentos

PCR na identificação genética (Ex; Teste de paternidade)



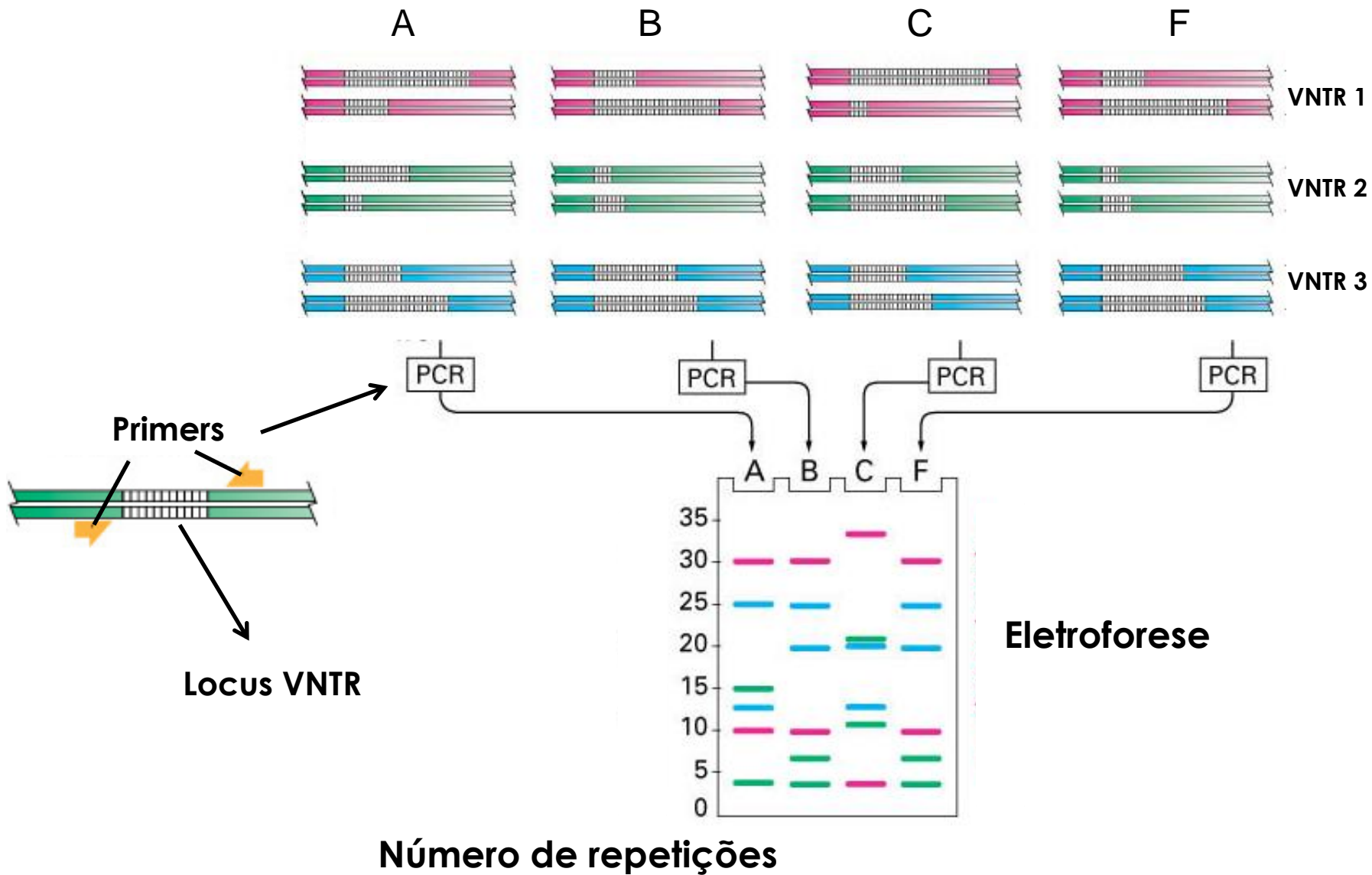
- Determinação e comparação de perfis genéticos de diferentes indivíduos. À esquerda, imagem representativa de um gel de agarose contendo amplicons referentes a sequências hipervariáveis. À direita, interpretação esquemática do mesmo gel. Cada uma das quatro colunas verticais refere-se a uma amostra de DNA. L: marcador de peso molecular, para comparação; SP: suposto pai; M: mãe e F: filho. Note que para cada indivíduo, três sequências hipervariáveis foram amplificadas, gerando dois alelos (fragmentos de DNA com comprimentos diferentes) para cada uma delas. Os alelos foram artificialmente coloridos (em azul, os paternos; em vermelho, os maternos) para facilitar a compreensão. Observe que o perfil genético do filho é compatível com o do suposto pai, pois seus alelos de origem paterna (azuis) têm tamanhos equiparáveis aos dos alelos do SP.

PCR multiplex:

- Os produtos comercializados atualmente para determinação paternidade e identificação de suspeitos, quase que na sua totalidade, amplificam até 16 loci em uma única reação de PCR → **AUMENTA A CONFIABILIDADE**
- Baseado no sistema de Índice de DNA Combinado (CODIS) criado pelo FBI → Nenhum dos marcadores estão ligados dentro de exons, e não estão associados a fenótipos conhecidos.

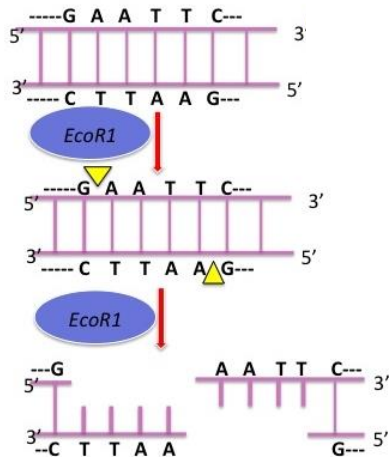
São eles: **CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, THO1, TPOX, VWA e a Amelogenina para identificação do sexo**

VNTR - PCR e Eletroforese

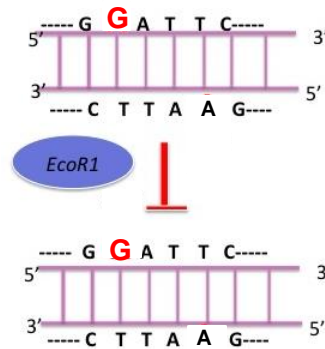


RFLP

Alelo 1



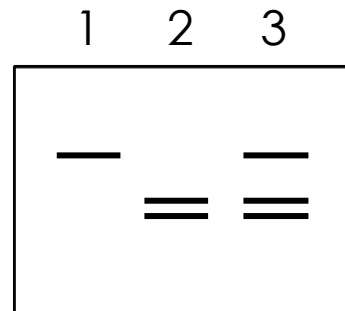
Alelo 2



Etapas

- Amplificação (PCR)
- Digestão do produto de PCR com a enzima Eco R1
- Eletroforese: gel de agarose

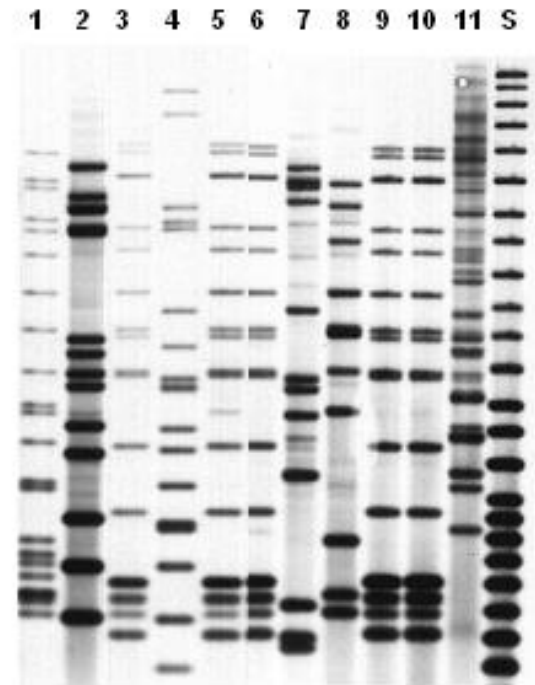
- Sítio Eco R1
- Substituição
 - perda do sítio



1. Homozigoto polimórfico
2. Homozigoto selvagem
3. Heterozigoto

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

- ❑ DNA genômico: digestão com enzimas de restrição
- ❑ Fragmentos de DNA são separados por eletroforese
- ❑ Transferência para membranas
- ❑ Exposição a sondas marcadas
- ❑ Revelação da membrana em filmes



Variações da técnica

❑ DAF

❑ *DNA Amplification Fingerprinting*

❑ AP-PCR

❑ *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*

❑ MAAP

❑ *Multiple Arbitrary Amplicon Profilng (sugerido por incluir todas as pequenas variações na técnica)*

❑ RT-PCR

❑ Nested PCR

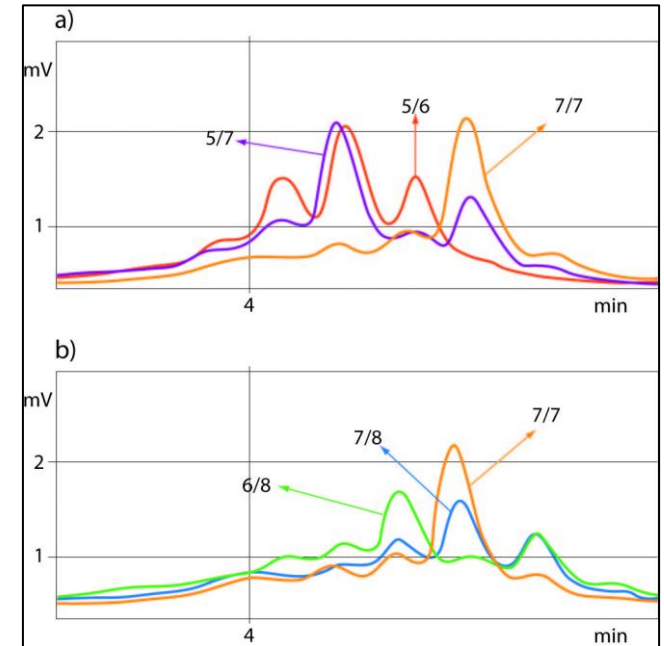
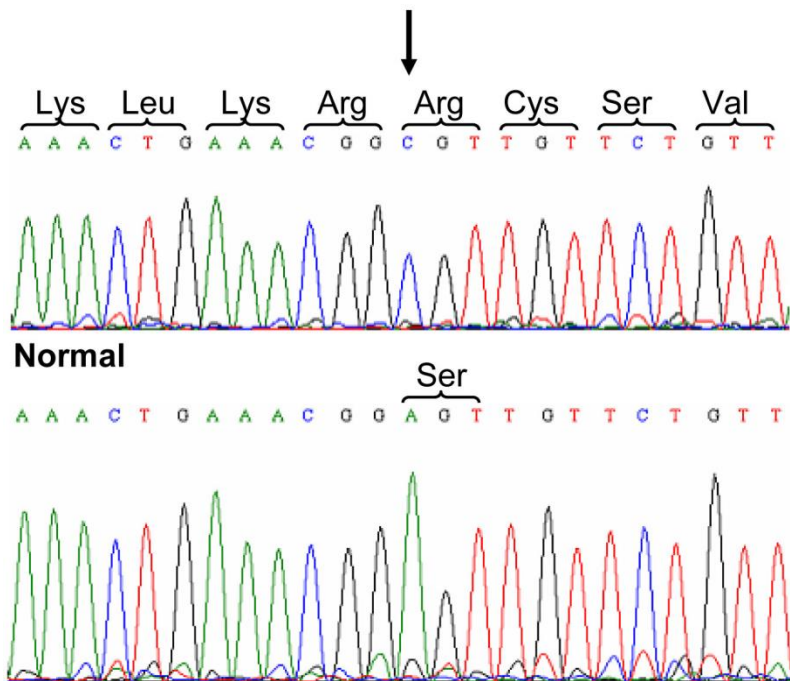
❑ Multiplex PCR

❑ Real Time PCR

- ❑ Sensibilidade
- ❑ Especificidade
- ❑ Rapidez

Inovação técnica

➤ Sequenciamento genético



Indivíduo com alteração/Identificação do perfil genético

Avanços na Genética Forense

➤ **Análise de marcadores genéticos do cromossomo Y** → útil nos casos em que há excesso de DNA de vítima mulher e pequenas quantidades de DNA masculino. Ex: agressão sexual sem ejaculação ou por homem vasectomizado.

- Dificuldades: taxa de mutação para o Y-STRs usado é relativamente muito baixa, é difícil, se não impossível, a diferenciação entre indivíduos do sexo masculino geneticamente relacionados.

➤ **Análise de marcadores moleculares obtidos DNA mitocondrial (mtDNA)** → 61 marcadores descritos

Vantagem: supera limitações do DNA nuclear, quanto a quantidade e qualidade (degradação do DNA).