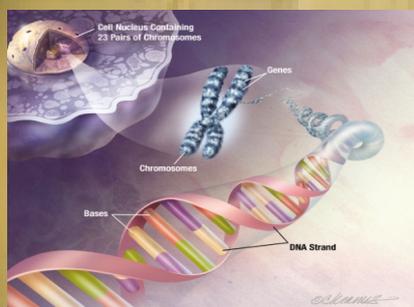


METODOLOGIA DE ENSINO DE DISCIPLINAS DA ÁREA DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E SUAS TECNOLOGIAS DO ENSINO MÉDIO: FÍSICA, QUÍMICA E BIOLOGIA

Curso I (Inicial)

Biologia Molecular Teste de Paternidade

Mariana do Valle



Material Pedagógico para uso do professor

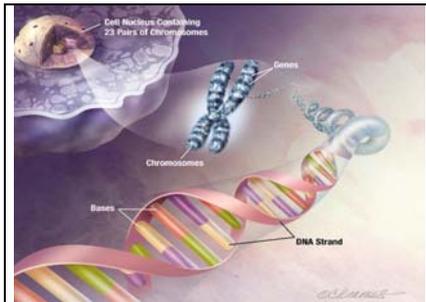
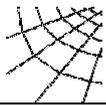
Venda Proibida

(16) 3602-3670 e-mail: teiadosaber@ffclrp.usp.br

Acompanhe a programação pela internet: <http://sites.ffclrp.usp.br/laife>

Coordenação Geral

Prof. Dr. Mauricio dos Santos Matos



BIOLOGIA MOLECULAR

Teste de Paternidade

Mariana do Valle

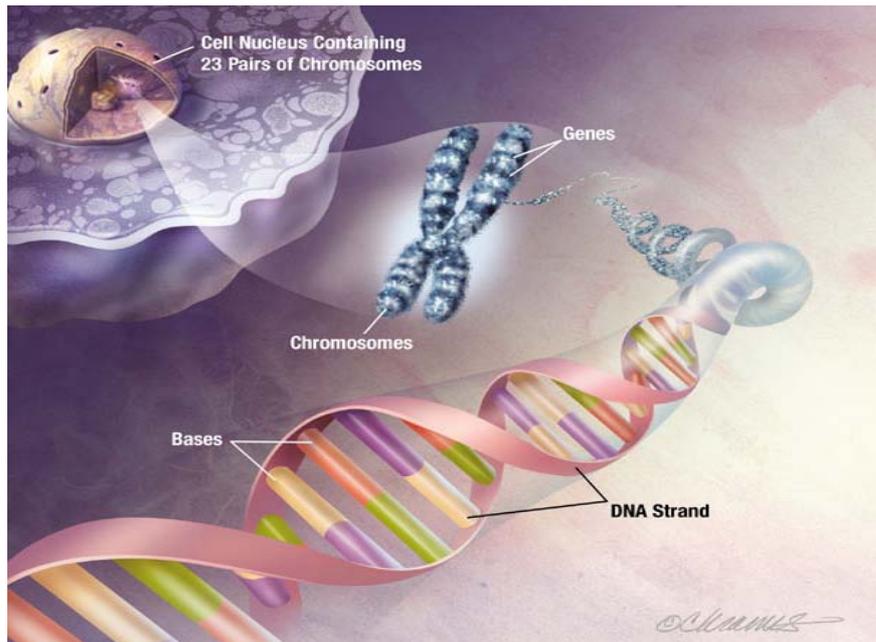
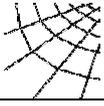


Figura 1-
Esquema da estrutura em dupla hélice do DNA, cromossomos e célula

O exame de DNA para fins de identificação pessoal e determinação de paternidade é considerado o maior avanço do século na área forense. Com o exame de DNA, a determinação de paternidade passou a atingir níveis de certeza absoluta. Estatísticas do Registro Civil indicam que cerca - de 30% das crianças nascidas no Brasil não têm pai declarado, o que frequentemente representa um sério problema. A Prática forense consiste na aplicação de técnicas científicas dentro de um processo legal. Essas práticas envolvem pesquisadores altamente especializados – ou criminalistas – que localizam vestígios que proporcionam provas conclusivas quando são testados em laboratório.

O DNA de cada ser humano é único e diferente dos demais, com exceção de gêmeos univitelinos. Todo ser humano possui duas formas de cada gene, uma forma recebida de sua mãe e a outra de seu pai. Embora a maioria dos genes seja essencialmente igual entre as pessoas, algumas seqüências específicas do DNA são extremamente variáveis entre indivíduos. O local onde uma destas seqüências hipervariáveis é encontrada no cromossomo é denominado loco. Cada um destes locos pode, portanto, ter várias formas diferentes denominadas alelos.

Estas seqüências de DNA contêm várias cópias consecutivas de uma unidade de seqüência, uma atrás da outra, como vagões de trem. Em uma população, podemos encontrar alelos diferentes desta mesma seqüência entre os indivíduos onde a diferença entre eles está apenas no número de vezes em que a unidade se repete. Assim, estas seqüências são ditas altamente polimórficas.



Para facilitar a compreensão, tome como exemplo a seqüência **ATCG** como uma unidade de seqüência de um microssatélite:

Se um alelo possuir esta unidade repetindo-se de modo consecutivo 3 vezes, teremos a seguinte seqüência:

ATCGATCGATCG

(alelo 1) gerando um fragmento de 12 pares de bases.

Agora tome como exemplo um outro alelo onde esta mesma unidade se repete por 4 vezes. Deste modo, o fragmento gerado será:

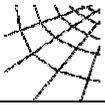
ATCGATCGATCGATCG

(alelo 2) com 15 pares de bases.

Estes dois alelos poderão ser diferenciados de acordo com seus respectivos tamanhos. São justamente estas diferenças no número de repetições destas seqüências que resultam na detecção de diferentes alelos, ou seja, fragmentos de tamanhos diferentes, no genoma humano de diferentes indivíduos. Em genomas de eucariotos, estas seqüências estão distribuídas ao acaso e constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível. Estas repetições podem estar localizadas dentro de genes ou podem se localizar em regiões que não contêm genes. Estas regiões ainda são de função desconhecida. Estas seqüências repetitivas são utilizadas em testes de paternidade por DNA por serem altamente polimórficas, o que diminui muito a possibilidade de que dois indivíduos não relacionados tenham o mesmo genótipo, isto é, os mesmos alelos. Nestes casos, várias regiões diferentes do genoma são utilizadas, isto é, fragmentos de DNA repetitivo espalhados pelo genoma. Para se chegar a um número que reflita a possibilidade de que um indivíduo seja de fato o pai em questão, todos os resultados são multiplicados e avaliados.

O compartilhamento de alelos entre a criança e o suposto pai permite estabelecer paternidade com uma probabilidade maior, menor ou igual a 99,9999%. Por outro lado, quando os alelos não são compartilhadas entre a criança e o suposto pai, este é excluído categoricamente (100%) da possibilidade de ser o pai biológico da criança. Os alelos presentes no filho (a) que não estão presentes na mãe, obrigatoriamente devem estar presentes no pai biológico. O exame de paternidade pela análise de DNA é, portanto, extremamente poderoso para a determinação de paternidade biológica. Da mesma forma, o exame é um subsídio técnico definitivo para identificar com absoluta precisão uma pessoa erroneamente apontada como pai biológico de uma criança.

Fontes de DNA utilizados em geral na análise forense
Sangue, Cabelo, Urina, Sêmen, Saliva, Osso



Extração DNA

No processo de extração do DNA são utilizados soluções detergentes para desestruturar as moléculas de lipídios presentes nas membranas celulares e ciclos de centrifugação para separar os constituintes de maior densidade. Diferentes métodos de extração são utilizados de acordo com o tipo de amostra.

No caso de amostras de sangue, a extração do DNA é feita a partir dos leucócitos e não das hemáceas que são anucleadas.

Abaixo a figura mostra um exemplo de extração de DNA de suab bucal (saliva).

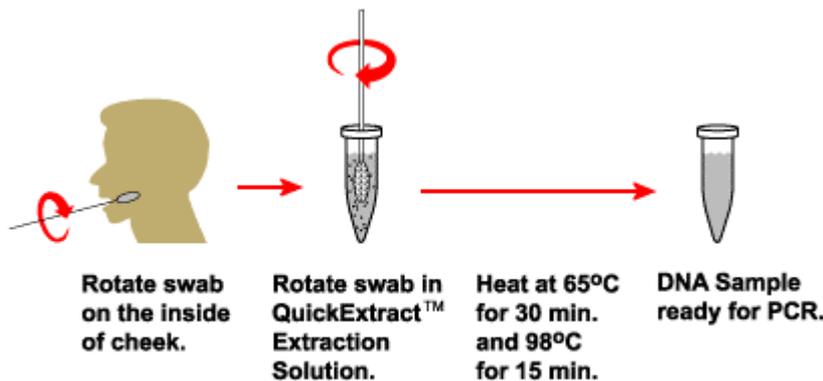


Fig. 1. BuccalAmp™ extraction protocol.

Figura2 - Extração de DNA de saliva

Método PCR (Polymerase Chain Reaction)

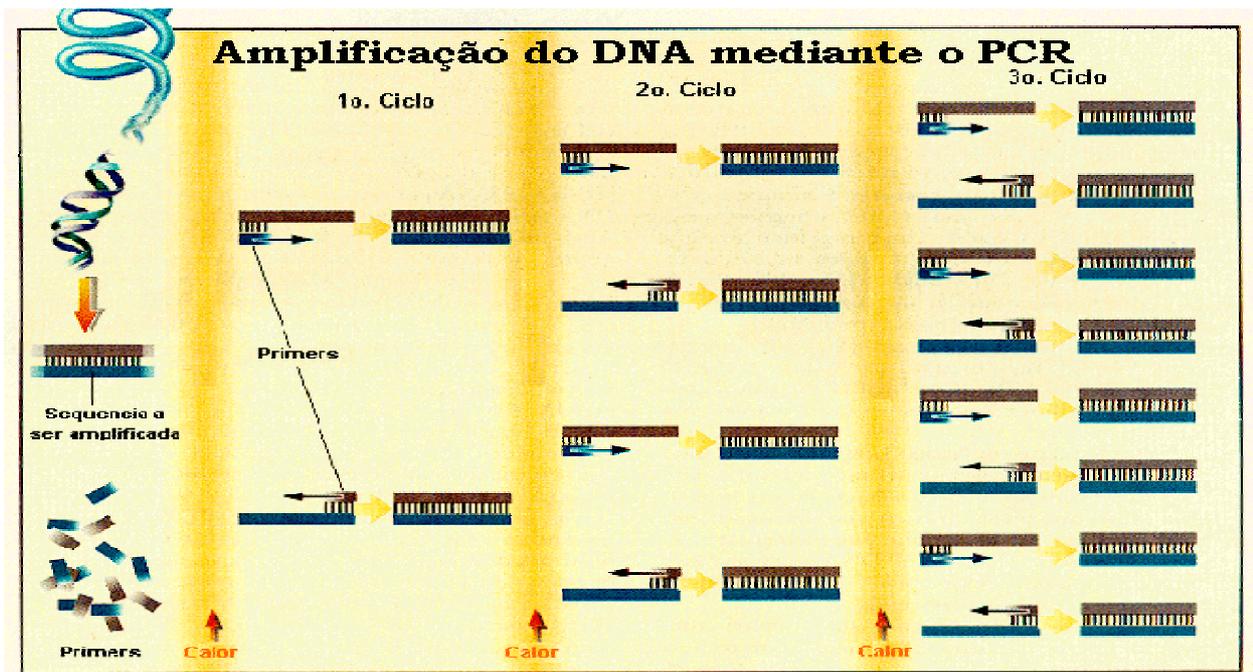
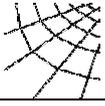


Figura 3- Amplificação do DNA (PCR)



Este método existe graças ao Dr Kary B. Mullis. O conceito de amplificação do DNA pelo PCR é simples, mas seu impacto tem sido extraordinário. A primeira publicação utilizando este método surgiu em 1985. Cada ano subsequente o número de publicações científicas utilizando o PCR tem crescido exponencialmente.

Em 1989, a revista Science elegeu o PCR "o maior desenvolvimento científico" e a Taq polimerase a molécula do ano.

Em 1993, Kary Mullis, o criador deste método, recebeu o prêmio Nobel de Química.

O princípio básico da PCR está na capacidade de, a partir de quantidades mínimas de DNA, multiplicar uma determinada seqüência, de modo que esta se torne majoritária na amostra. O material inicial para análise através da técnica de PCR pode ser obtido a partir de diferentes tecidos. Estes tecidos podem ser o sangue, que proporciona uma grande quantidade de DNA, ou até mesmo fios de cabelo ou células da boca. Numa reação de PCR, o fragmento de DNA que desejamos multiplicar (ou amplificar) é chamado de fragmento alvo ou DNA molde (e os oligonucleotídeos que utilizamos são chamados de primers), ou iniciadores. Na realidade, os primers nada mais são do que pequenos fragmentos de DNA complementares às extremidades da região que se pretende amplificar. Estes primers são produzidos rapidamente e vendidos por companhias de biotecnologia específicas. A técnica de PCR tem provocado grande impacto nas principais áreas da biotecnologia: mapeamento gênico, clonagem e seqüenciamento de DNA, e detecção da expressão gênica. Atualmente, a PCR é utilizada para o diagnóstico de doenças genéticas, bem como na detecção de material genético presente em pequenas quantidades na amostra em análise. Como exemplo, temos a detecção e identificação de material genético de vírus como o HIV ou o vírus da hepatite, assim como a detecção de organismos geneticamente modificados em produtos alimentícios.

Etapas: (ver figura 5).

1- Dois pequenos fragmentos de DNA, tipicamente de 20 pares de bases, são sintetizados em laboratório. Esses são os "primers", que são complementares a cada uma das extremidades da seqüência de DNA de interesse.

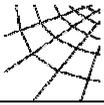
2- Num tubo de reação são adicionados os primers, os nucleotídeos livres (adenina, guanina, timina e citosina), o DNA que se quer analisar (DNA molde) e uma enzima especial resistente ao calor chamada Taq DNA polimerase, que promove a síntese de DNA.

3-O tubo é colocado em um termociclador (ver figura , um aparelho que irá promover o aquecimento e o resfriamento das amostras.

4-A mistura é aquecida a 95°C, causando a separação das duas fitas de DNA.

5- Em seguida, a mistura é esfriada até 55°C ou 65°C, temperatura na qual os primers se ligam às regiões complementares das fitas de DNA que estão separadas. Neste momento, dentro do tubo de reação, todo o DNA está na forma de fita simples, menos as duas pequenas regiões nas quais os primers de 20 pares de bases se ligaram nos dois lados da seqüência de DNA de interesse.

6- A temperatura é então elevada a 72°C, e a Taq DNA polimerase começa a sintetizar um novo DNA, começando nas regiões em dupla fita, local onde cada um dos primers se ligou ao DNA molde. A Taq irá promover a síntese de DNA somente a partir da região em dupla fita.



A síntese ocorre em uma taxa de aproximadamente 20 nucleotídeos/segundo, e em cerca de 30 segundos a 1 minuto uma nova cópia do fragmento que se quer analisar é sintetizada.

7- A reação agora é novamente aquecida a 95°C , causando novamente a separação de todo DNA em fitas simples. Ao final do primeiro ciclo há duas fitas da molécula original de DNA, mais duas cópias da região de interesse.

8- A temperatura é novamente reduzida, e agora os primers irão se ligar aos 4 sítios nas novas duas cópias e também na molécula original de DNA. A temperatura do ciclo é novamente elevada a 72°C e as 4 fitas individuais são copiadas em 8.

Esses ciclos são repetidos geralmente 30 vezes, num aparelho chamado termociclador. Ao final dos ciclos de amplificação existem, aproximadamente, 1 milhão de cópias do segmento de DNA de interesse para cada molécula molde originária da amostra inicial. É assim que podemos selecionar um fragmento específico dentro de um genoma.

Quando são usados primers específicos em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), fragmentos específicos no genoma do organismo são amplificados. É por este tipo de análise que podemos observar diferenças entre indivíduos. Estas análises podem ser feitas utilizando-se o DNA repetitivo, ou VNTRs, já mencionados anteriormente. De acordo com o número de repetições da seqüência que são observadas, ou seja, das bandas de diferentes tamanhos visualizadas em gel de agarose (ou poliacrilamida), podemos identificar o grau de parentesco ou até a origem da amostra em análise.

A técnica de PCR tem sido muito aplicada em estudos forenses devido à pouca disponibilidade de material em situações criminais. Além disso, devido à alta sensibilidade desta técnica, torna-se possível a amplificação de DNA a partir de até mesmo uma única célula, e o DNA obtido não precisa necessariamente estar íntegro.

No entanto, a grande sensibilidade desta técnica apresenta também desvantagens, pois o risco de contaminação por uma molécula de DNA não presente na amostra de interesse se torna grande, sendo recomendado bastante cuidado em casos forenses e em todos os estudos moleculares.



Figura 4 - Termociclador

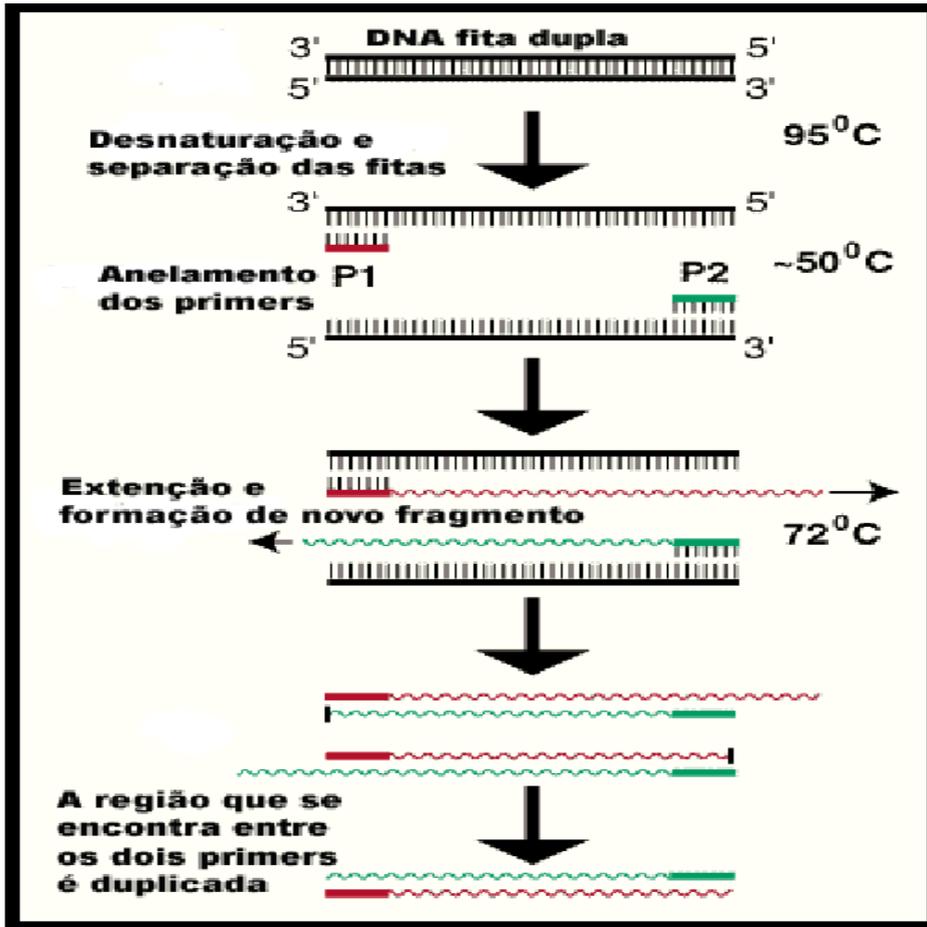
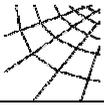


Figura 5- Esquema das fases de Desnaturação, anelamento e extensão da fita de DNA

Após concluída a PCR no termociclador, aplica-se as amostras em gel em geral de poliacrilamida corado por prata para a visualização das bandas.

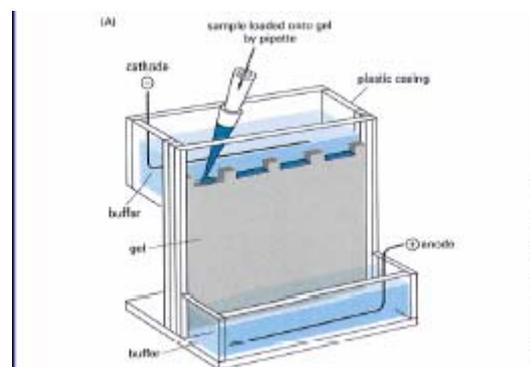


Figura 6- Aplicação da amostra em gel vertical em cuba de eletroforese

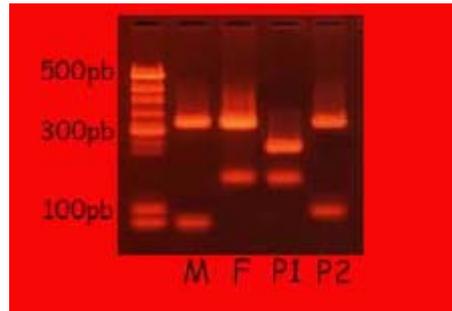
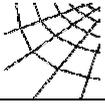


Figura 7- Pela figura do gel podemos observar que P1 é o pai verdadeiro já que os alelos são compatíveis (inclusão de paternidade de P1 e exclusão de P2)

Atualmente existe outra técnica denominada PCR em tempo real (Real Time PCR) que utiliza marcadores por fluorescência. Corresponde a um sistema que permite correlacionar a intensidade de um sinal coletado com a quantidade de produto amplificado.

PERÍCIA DE PATERNIDADE PRÉ-NATAL EM VILO CORIAL OU LÍQUIDO AMNIÓTICO.

O nosso DNA é o mesmo em qualquer tecido do corpo. Assim o teste em DNA pode ser feito em qualquer célula e tecido, inclusive antes do nascimento do bebê. Para o teste pré-natal o tecido fetal é obtido durante a gravidez com uma coleta de vilos coriais (tecido placentário) ou do líquido amniótico que banha o bebê. A coleta de vilos coriais é uma aspiração de células da placenta (geneticamente iguais ao feto) e pode ser feita a partir da 10^a semana de gestação. A amniocentese é a coleta de líquido amniótico contendo células fetais, que pode ser realizada a partir da 14^a semana de gravidez. Ambos os procedimentos para obtenção de células fetais para determinação de paternidade pelo DNA antes do nascimento da criança são simples e confiáveis quando realizados por profissionais experientes em ultrassonografia e coletas obstétricas. Além dos tecidos do bebê são necessárias amostras de sangue periférico e/ou células bucais da gestante e do(s) suposto(s) pai(s). A Determinação da Paternidade Pré-Natal deve ser feita apenas em casos em que ela será realmente esclarecedora. Normalmente a maior indicação é quando há dúvida entre mais de um suposto pai e há necessidade de resolver o dilema antes do nascimento da criança. Por motivos éticos, não realiza exames em situações em que é contemplada uma interrupção da gravidez, exceto em caso de estupro.

Sugestão de sites para consulta: www.dnai.org
www.fbi.gov/hq/handbook/intro.htm