



EXAMES DE PATERNIDADE PELO DNA: UMA METODOLOGIA PARA ENSINO DA GENÉTICA MOLECULAR

Autores: Cristian Kely Pereira Campos¹, Mariana Natalice de Siqueira¹, João Paulo Borges¹, Layana Araujo Rodrigues¹, Jader Soares de Oliveira², Marcelo de Alcântara Rosa², Adriana Freitas Neves¹

1. Universidade Federal de Goiás, Departamento de Ciências Biológicas. 2. Núcleo Educativo, Colégio Nacional

Autora correspondente: Profª. Dra. Adriana Freitas Neves; Av. Dr. Lamartine Pinto de Avelar, 1120 – Setor Universitário CEP: 75704-020, Catalão – Goiás, email: neves.af@gmail.com

Palavras-chave: eletroforese, exames de DNA, genética molecular

1. Introdução

No genoma humano existem determinadas regiões polimórficas que são utilizadas nos exames de paternidade e outros vínculos genéticos. Estas regiões podem constituir repetições consecutivas de número variável ou minissatélites (VNTR, do inglês, *Variable Number of Tandem Repeats*) ou repetições consecutivas curtas ou microssatélites (STR, do inglês, *Short Tandem Repeats*).

As regiões VNTRs, altamente polimórficas, podem gerar índices de paternidade elevados a partir da análise de um DNA íntegro e em grandes quantidades. A princípio, a análise de polimorfismos VNTRs pelo uso de enzimas de restrição seguida da técnica de *Southern Blot* foi por muitos anos a metodologia padrão para estudos de vínculo genético. Atualmente, as investigações genéticas nas populações pelos perfis de locos STRs têm sido amplamente empregadas, as quais permitem o uso de amostras contendo pequenas quantidades de DNA e/ou degradadas; contudo, quando analisados individualmente não apresentam um poder de discriminação comparável aos VNTRs e, por isso, é preciso uma análise em conjunto de vários locos STRs para garantir resultados satisfatórios (GÓES, 2005).

Nos testes de paternidade por STRs, a informação genética é obtida pelo resultado proveniente de quinze locos, podendo ser realizada pelo uso de kits comerciais disponíveis; esse número pode ser aumentado para se alcançar maior confiabilidade nos resultados e as análises são feitas a partir das frequências alélicas encontradas para a população estudada (FIGUEIREDO *et al.*, 2004; DOLINSKY; PEREIRA, 2007).

Os polimorfismos STRs são amplificados pela técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa

técnica consiste num processo de replicação, *in vitro*, de uma sequência de nucleotídeos específica e presente no DNA genômico extraído da amostra coletada, como sangue, fio de cabelo com bulbo, swab bucal, dentre outros. A partir do uso de um par de primers (oligonucleotídeos) que delimita a região alvo a se amplificar, a enzima DNA Polimerase na presença de MgCl₂ adicionará nucleotídeos (chamados de dNTPs), e assim como no processo *in vivo*, serão formadas novas moléculas de DNA. Esse método permite que apenas uma porção específica do DNA genômico seja replicado várias vezes e, no caso das análises por STRs, os locos a serem amplificados contêm os polimorfismos altamente variáveis entre os indivíduos de uma população. As várias porções dos STRs serão delimitadas pelos pares de primers, que definirão os tamanhos dos DNAs alvos a serem amplificados numa reação chamada de PCR Multiplex, ou seja, mais de um par de primer será adicionado na reação para análise simultânea dos quinze locos.

A base da PCR consiste em variações de temperaturas e tempos previamente determinados para que a amplificação ocorra. Numa temperatura de cerca de 95°C e alguns segundos o DNA é desnaturado; seguindo pela redução da temperatura para cerca de 55-60°C ocorrerá o anelamento ou ligação dos primers por complementaridade de base à sua sequência específica no DNA e por fim, subindo-se a temperatura para aproximadamente 72°C, ocorrerá a extensão de nucleotídeos pela Taq DNA Polimerase. Esse processo é repetido ciclicamente por várias vezes (por exemplo, 35 ciclos) até a obtenção de uma quantidade suficiente de amostra que permita a análise do resultado.

O perfil de amplificação de cada indivíduo gerado pela PCR é obtido pela separação dos fragmentos por tamanho a partir de uma eletroforese em sistemas de géis cujo princípio se baseia na mobilidade das moléculas

em um campo elétrico. Durante a eletroforese, a amostra é aplicada em pocinhos de um gel de corrida (os mais comumente utilizados são feitos com agarose ou poliacrilamida, imerso em uma solução tampão) em cuba de eletroforese e submetido a uma corrente elétrica. Como o DNA é carregado negativamente, após um tempo de corrida, ocorre migração das moléculas amplificadas e de tamanhos diferentes para o pólo positivo. Ao final da eletroforese, o gel é retirado da cuba e corado com intercalantes de bases ao DNA, permitindo assim a sua visualização sob a forma de bandas (PEREZ-SWEENEY

et al. 2003).

No caso dos locos STRs, na PCR são utilizados conjuntos de primers marcados com diferentes fluorescências, o que permite dinamização do processo de análise, em que os fragmentos com diferentes fluorescências podem ser visualizados a partir de eletroferogramas gerados por eletroforese em sequenciador automatizado (PEREZ-SWEENEY *et al.* 2003) (Figura 1). Os tamanhos dos fragmentos obtidos são comparados a padrões de pesos moleculares dados em pares de bases (pb).

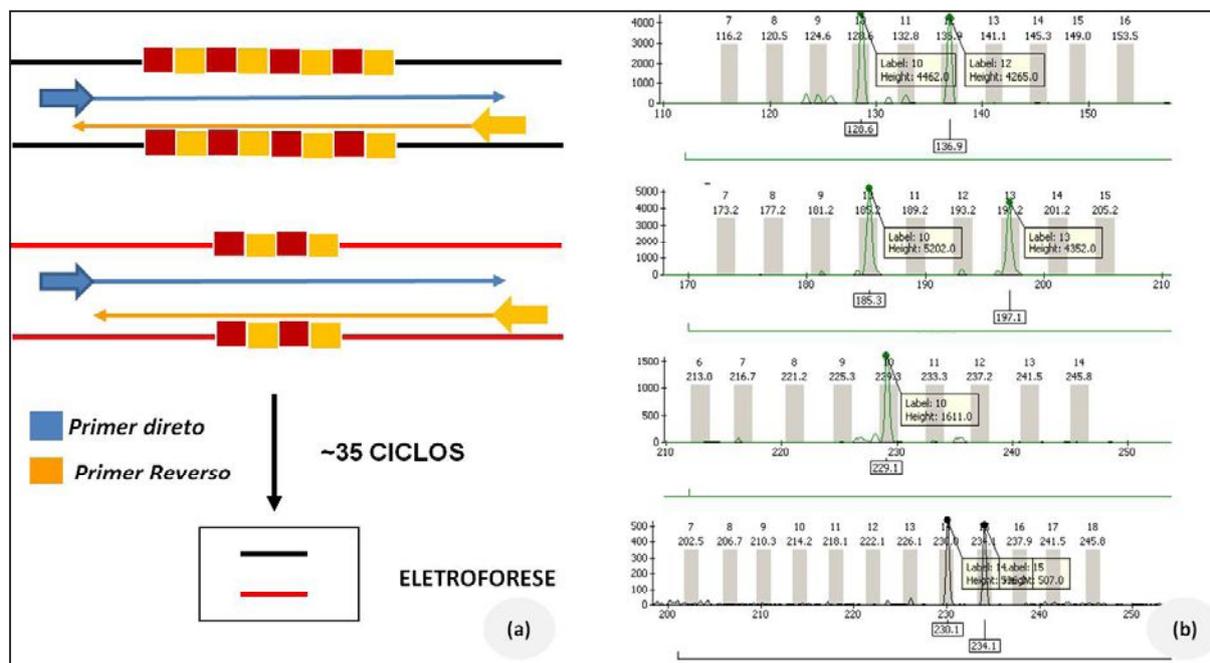


Figura 1. Representação esquemática da análise de polimorfismos STRs. (a) Esquema de PCR-STR para amplificação de um loco presente em cromossomos homólogos de um indivíduo heterozigoto. O produto amplificado do cromossomo que contém oito blocos de repetições (superior) é maior (linha preta na eletroforese) do que o que contém quatro blocos de repetições (inferior), utilizando o mesmo par de primers. (b) Eletroferograma gerado após PCR-STR demonstrando três perfis heterozigotos e um homozigoto para indivíduos de uma população. Eletroferograma: cortesia Laboratório BioGenetics Tecnologia Molecular Ltda (Uberlândia/MG).

Os exames de paternidade pelo uso do DNA, ou Exames de Vínculo Genético, tornaram-se rotina nos laboratórios devido à certeza dada pelo resultado final nos casos em que o exame exclui a suposta paternidade e resultado acima de 99,999%, nos casos de inclusão de paternidade. A Genética é uma área da Biologia que vem sofrendo transformações tecnológicas e conceituais e os assuntos relacionados à Genética Molecular estão cada vez mais presentes na vida das pessoas. Na sociedade moderna, os exames de paternidade são amplamente divulgados pela mídia; mas por outro lado, embora presente no cotidiano das pessoas, o processo de ensino da Genética esbarra em alguns entraves, como a falta

de material didático adequado, a falta de atualização docente para o ensino e com a necessidade de criação de cursos de aperfeiçoamento profissional.

Dessa forma, é de fundamental importância a elaboração e divulgação de materiais didáticos que utilizem recursos variados, como o fazer lúdico, tanto para o ensino médio como superior, para facilitarem o acesso ao conhecimento. Este artigo objetiva a proposição de um esquema didático dinâmico que poderá auxiliar na apreensão e fixação de conceitos clássicos e atuais da Genética Molecular no ensino da Biologia, por meio da visualização simbólica de material Genético, dos polimorfismos de DNA, e simulação de um processo de eletroforese.

2. Preparação do material didático e estratégia de ensino

2.1 Trabalhando as sequências de ácidos nucleicos, os locos e os polimorfismos de DNA

A proposta de elaboração didática e simulação do exame de paternidade pelo DNA é voltada para alunos do 3º ano do ensino médio. Contudo, a proposta se estende à utilização no ensino de Genética para a graduação. A construção de um cromossomo, seus locos contendo as variantes de DNA será realizada utilizando-se barbante

e miçangas grandes e coloridas (Figura 2). Observa-se nesta figura a elaboração simbólica dos cromossomos de número 1 materno e paterno (supostos pais 1 e 2), contendo seriadamente variantes polimórficas de DNA, mostrando homocigose para todos os locos e os cromossomos do filho, mostrando os locos em heterocigose. Para a construção do cromossomo, visualização dos locos e de suas variantes sugere-se a utilização de miçangas vermelhas, verdes, amarelas e azuis.

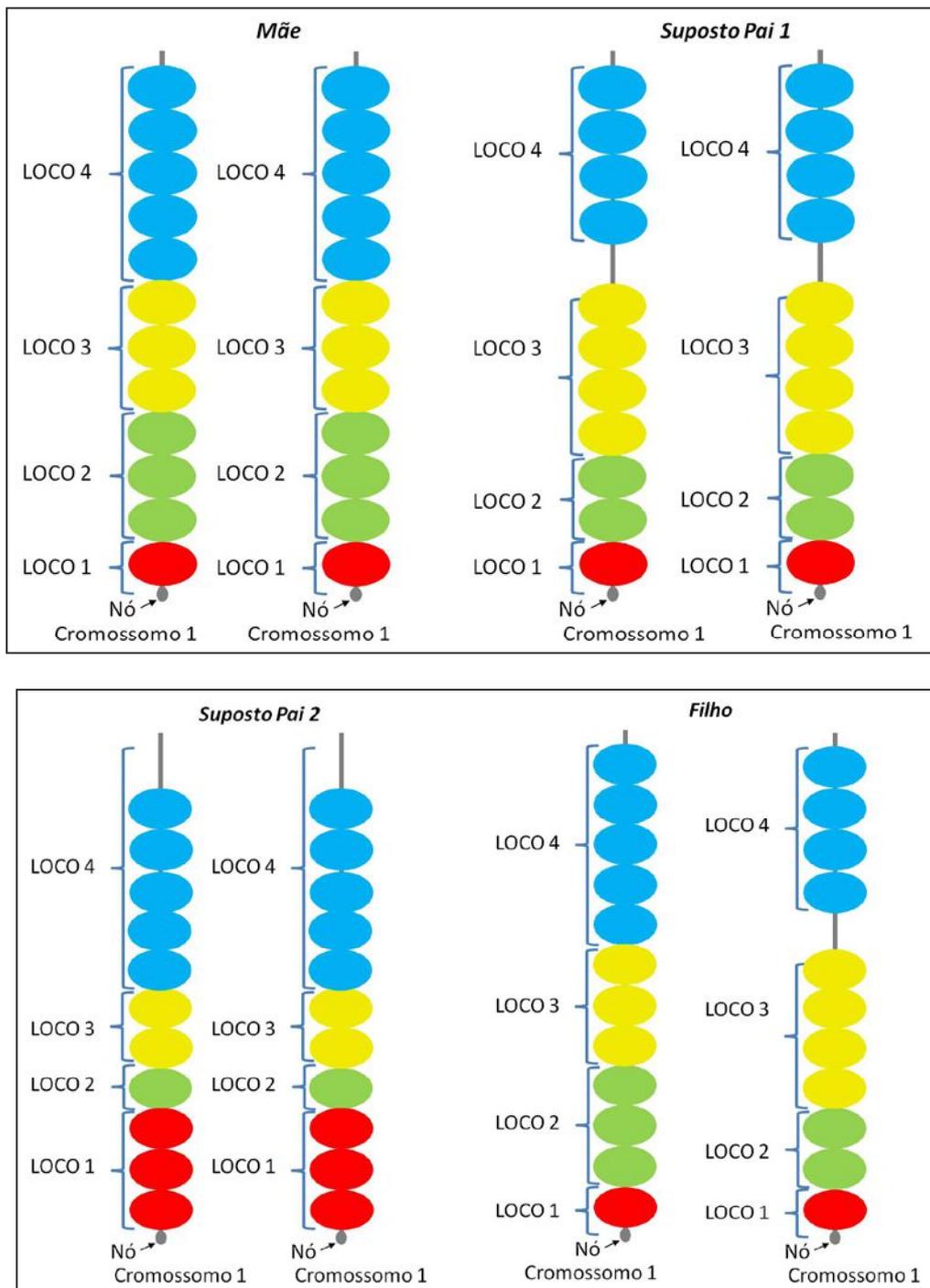


Figura 2. Modelo cromossômico utilizando barbante e miçangas grandes e coloridas para a representação de seus locos contendo os polimorfismos de DNA.

Previamente à construção dos cromossomos, oito conceitos fundamentais e várias definições de termos específicos da Genética encontrados nos livros de ensino médio e/ou superior como ALBERTS e cols (2004); AMABIS & MARTHO (1994); GRIFFITHS e cols (2006); SNUSTAD & SIMMONS (2008); NUSSBAUM e cols (2008), trabalhos, KASHYAP e cols (2004); PARADELA & FIGUEIREDO (2006); deverão ser explicados e/ou lembrados, tais como:

1. Composição do DNA: o ácido desoxirribonucléico (DNA) é composto pelo açúcar desoxirribose, grupo fosfato e pelas bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), que formam os nucleotídeos. As sequências de nucleotídeos são ligadas entre si formando uma cadeia simples. Contudo o DNA é formado pela ligação de duas cadeias antiparalelas de nucleotídeos dispostas em forma helicoidal ligadas pelas bases nitrogenadas, onde adenina se pareia com timina, e citosina, com guanina.

2. Localização do DNA: está presente em todas as células nucleadas dos eucariotos e também no interior das mitocôndrias. No núcleo, apresenta-se arranjado na forma de cromossomos.

3. Cromossomos: Contêm as informações genéticas do indivíduo. Cada cromossomo consiste de uma única e enorme molécula de DNA compactada, com exceção a poucos tipos celulares muito especializados que não podem replicar ou não possuem DNA (por exemplo, hemácias). Cada célula somática humana apresenta com 23 pares de cromossomos, sendo duas cópias de cada tipo de cromossomo, uma herdada da mãe e a outra do pai. Nas células somáticas, 22 pares são chamados autossomos e um par consiste de cromossomos chamados sexuais, por atuarem na determinação do sexo. Os autossomos materno e paterno de um par são chamados cromossomos homólogos. Na mulher, o par sexual é formado por dois cromossomos X e, no homem, esse par é constituído por um cromossomo X e outro Y. Um cromossomo pode conter vários genes diferentes assim como possuir segmentos que não são genes.

4. Meiose: Corresponde ao processo de divisão celular envolvendo o pareamento e separação de cromossomos homólogos (meiose I) e de cromátides irmãs (meiose II) que ocorre nas células germinativas. Em humanos e outros animais, a meiose acontece nas gônadas e seus produtos são os ovócitos e espermatozoides. Assim, o gameta masculino e feminino haplóides, originado das células diplóides, possui cada um 23 cromossomos. Na fertilização, ocorre a união das células germinativas restabelecendo o conjunto diplóide de cromossomos. Assim, as características genéticas de um indivíduo são provenientes do DNA materno e paterno.

5. Genoma: DNA do conjunto haplóide de cromossomos e da mitocôndria de um organismo.

6. Mutação: Corresponde a alterações numa sequência específica de DNA, resultando em variantes genéticas com modificações de bases no DNA.

7. Loco: Corresponde à posição que determinado segmento de DNA ocupa em um par de cromossomos homólogos. Assim, um loco será considerado polimórfico se num conjunto de indivíduos ocorrerem duas ou mais variantes em um mesmo loco. Além disso, quando o segmento específico de DNA no par de cromossomos homólogos não são idênticos entre si, o genótipo do indivíduo é denominado heterozigoto para aquele loco específico. Já a presença de segmentos de DNA idênticos nos mesmos locos, indica que o genótipo do indivíduo é homozigoto para aquela sequência que está sendo analisada.

8. Polimorfismos: Referem à presença de mais de um alelo de um mesmo gene ou segmento de DNA em uma população, em que o seu alelo mais comum tem frequência igual ou inferior a 99% (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994). O conjunto de variantes de DNA encontradas em um ou mais locos num indivíduo constitui seu genótipo. Os polimorfismos que variam em comprimento de bases numa sequência de DNA são chamados de STRs e de VNTRs. Os polimorfismos de STRs ou microssatélites apresentam-se com menos de seis bases repetidas sequencialmente num determinado cromossomo (ex.: repetições de três nucleotídeos, CAGCAGCAGCAGCAG...), enquanto os VNTRs ou minissatélites apresentam repetições maiores que seis bases e de forma altamente variável entre os indivíduos.

2.2 Trabalhando Tecnologias da Genética Molecular

Com a evolução das tecnologias, equipamentos cada vez mais sofisticados têm permitido que as metodologias da Genética Molecular sejam aplicadas de forma a manipular genes e estudar os fenômenos genéticos da transmissão hereditária em grandes detalhes. Assim, da mesma forma que o item anterior, previamente à simulação da análise de polimorfismos a partir de uma eletroforese, alguns conceitos deverão ser introduzidos para se entender a análise de paternidade pelo DNA, permitindo a compreensão do histórico de como o processo foi evoluindo até chegar ao exame proposto atualmente. Alguns desses conceitos foram apresentados e também podem ser encontrados em vários trabalhos (PENA, 1997; BRAGANÇA, 2007; KOCH; ANDRADE, 2008).

Como citado anteriormente, a primeira metodologia utilizada para análise de DNA individual em exames de paternidade é conhecida como *Southern Blot*. Esta téc-

nica utiliza, além do DNA extraído do genoma de um indivíduo, enzimas que fragmentam o DNA em várias partes e sistemas de captura (sondagem) a partir de uma sequência de DNA previamente marcada (sonda). Este sistema de análise é feito para sondagem das regiões VNTRs, por serem altamente variáveis entre os indivíduos, permitindo a análise da “identidade genética” de cada pessoa.

Outra técnica utilizada no exame de DNA é a PCR. Esta técnica foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 e desde então revolucionou toda a Genética. A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática, *in vitro*, de bilhões de cópias de um segmento específico de DNA de um indivíduo em particular na presença da enzima DNA polimerase.

Ao contrário do *Southern Blot*, nos exames de paternidade pela PCR são analisadas as regiões polimórficas do tipo STRs. O material genético torna o indivíduo singular, permitindo identificá-lo em meio a vários outros, pois cada um possui seu próprio DNA. Esta análise é, via de regra, feita a partir de migração do DNA sobre uma matriz sólida, como um gel de poliacrilamida. Os marcadores de peso molecular, fornecidos comercialmente aos laboratórios, são utilizados no gel como uma escala de análise dos tamanhos de segmentos de DNA obtidos para cada indivíduo, sendo que os fragmentos maiores ficam em cima no gel enquanto os menores ficam embaixo, ou seja, migram mais rapidamente na malha da poliacrilamida.

Para simulação de uma eletroforese para separação de DNAs variantes STRs amplificados por PCR seguida da análise de paternidade, serão utilizadas uma folha de papel sulfite e uma régua (Figura 3). Para essa análise, no intuito de simplificar o processo, não foram consideradas as sequências dos primers flanqueadores dos polimorfismos, assim como foi considerada uma PCR Monoplex (um par de primers é utilizado para amplificação de uma sequência alvo).

Na folha de papel sulfite serão marcadas as “bandas” geradas a partir das “amplificações” dos locos polimórficos presentes nos cromossomos construídos na Figura 2. É importante salientar que essa análise é apenas ilustrativa do processo geral de eletroforese, e que, previamente a essa técnica, para análise dos polimorfismos de STRs, o DNA genômico é amplificado por PCR Multiplex utilizando pares de primers fluorescentes específicos para cada segmento. Outro ponto importante a ser enfatizado é que os STRs de cada indivíduo são atualmente visualizados num sistema fechado de eletroforese capilar a partir de produtos gerados contendo diferentes fluorescências e o resultado final é dado pela análise dos eletroferogramas proveniente do produto amplificado esperado para cada loco (Figura 1).

Para os quatro locos esquematizados na Figura 2, cada miçanga representará um bloco de repetição polimórfico de acordo com a Tabela 1. Supondo que o DNA de cada um dos indivíduos, após ter sido extraído da célula, foi replicado *in vitro*, utilizando a PCR, o resultado da eletroforese será de acordo com a simulação proposta na Figura 3. Nessa simulação de eletroforese, os quatro locos em questão serão analisados separadamente e uma régua de 20 cm será utilizada como escala de análise das bandas, colocada ao lado esquerdo de uma folha de papel sulfite.

A análise deverá começar de baixo para cima e uma linha que representará as bandas de um gel de poliacrilamida, será marcada na posição esperada do DNA amplificado de cada indivíduo, tendo como base seu genótipo e a migração por eletroforese em gel (Figura 3). A análise é realizada loco por loco e para cada indivíduo. Por exemplo, para o loco 1, a mãe, o SP1, o SP2 e o filho apresentam os seguintes padrões de bandas, respectivamente: 6 (6X1) e 6 (6X1); 6 (6X1) e 6 (6X1); 18 (6X3) e 18 (6X3); 6 (6X1) e 6 (6X1) cm. Dessa forma, a análise é feita na folha pela marcação de bandas (traços horizontais) loco por loco (Figura 3).

Tabela 1: Dados para simulação de uma eletroforese de locos polimórficos de DNA.

Locus	Cores das miçangas	Representação dos Polimorfismos	Representação das Bases (cm)
1	Vermelha	GAGGTG	6
2	Verde	GGTCA	5
3	Amarela	CAG	3
4	Azul	CAGT	4

Tendo como base somente a análise da eletroforese organizada na Figura 3, analise qual o provável pai biológico do filho (F), lembrando que: i) este herdará um cromossomo “1” paterno e outro materno; ii) diferente de seus genitores será heterozigoto; iii) na eletroforese apresentará um perfil de bandas esperado de ambos os genitores. A análise desta Figura sugere ser o suposto pai “1”, o provável pai biológico do filho em questão. Além de perguntas como a anteriormente formulada, é possível discutir o motivo de a análise ter sido realizada de baixo para cima (fragmentos

menores migram mais rapidamente pelo gel) e, com base na quantidade de repetições, é possível discutir que o provável tipo de repetição analisada é a de STRs. Ainda, questionários poderão ser elaborados abordando os conceitos anteriormente descritos e aplicados antes e após a realização dessa simulação a fim de se verificar a compreensão e apreensão de conhecimentos pelos alunos. Para complementar a aula, a simulação poderá ser realizada pedindo-se para que os alunos representem o resultado da eletroforese do filho, caso o suposto pai “2” seja o seu pai biológico.

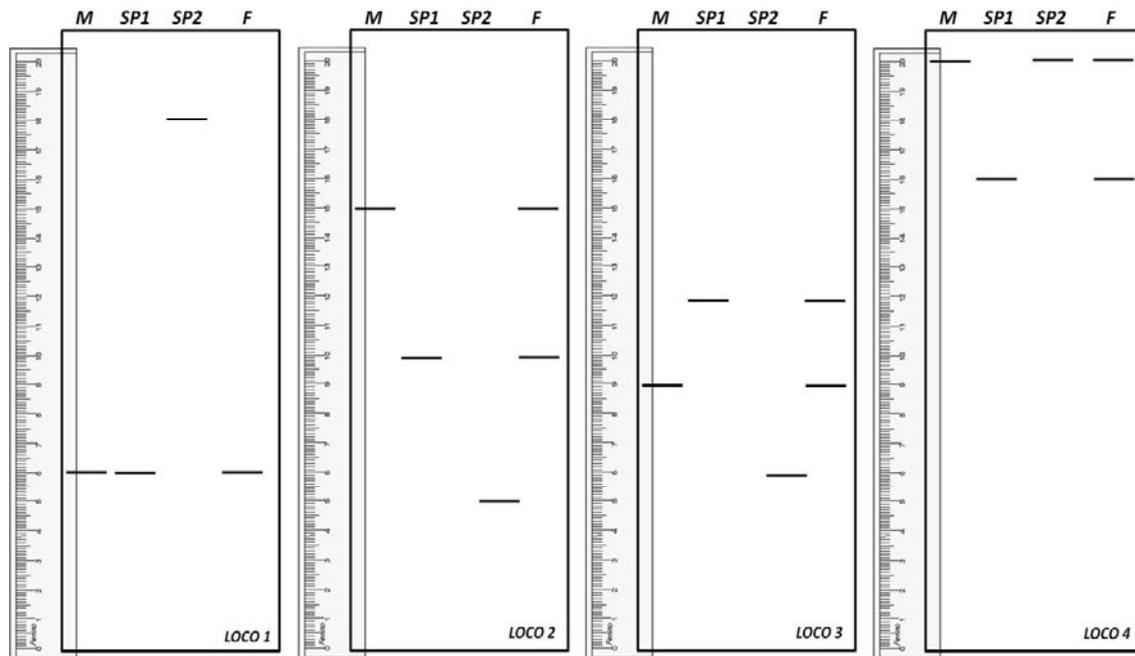


Figura 3. Representação de uma eletroforese para análise de polimorfismos de DNA e simulação de um exame de paternidade.

Considerações Finais

A montagem dos cromossomos e a simulação do resultado da eletroforese apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente, de acordo com o tempo de aula disponível, poderão ser trabalhadas utilizando ambos os pais heterozigotos. O mesmo também poderá ser feito para a representação de mais locos ou utilizando-se somente a análise de um gel. A partir dessa abordagem da genética molecular, conceitos de citogenética poderão ser trabalhados, tais como número e tamanho de cromossomos para as construções de cariótipo, assim como a variação em termos de quantidade de cromossomos nas diferentes espécies.

Bibliografia Recomendada

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia das células**. São Paulo: Moderna, 1994.

BRAGANÇA, W. O. **A frequência de regiões de minissatélites em uma população brasileira e sua utilidade para a identificação humana**. 2007. Tese (Doutorado) faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

CAVALLI-SFORZA L.L., MENOZZI P., PIAZZA A. **The history and geography of human genes**, Princeton University Press, Princeton, USA, 1994.

DOLINSKY, L. C.; PEREIRA, L. M. C. V. DNA forense. **Saúde e Ambiente em revista**, v.2, n.2, p. 11-22, 2007.

FIGUEIREDO, M. S.; FERNANDEZ-ROSADO, F.; KUNIL, I.; PACHECO A. C.; LORENTE, J. A.; BUDOWLE, B. Brazilian Caucasian Population Data for 15 STR Loci (PowerPlex 16TM Kit). **J Forensic Sci**, v. 49. n. 1, paper ID JFS2003274-491, available online at: www.astm.org, 2004.

- GÓES, A. 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**. n. 65, p. 22-23, 2005.
- GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KASHYAP, V.K.; SITALAXIMI T.; CHATTOPADHYAY P.; TRIVEDI R. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. **Int. J. Hum. Genet**, v. 4, n. 1, p 11 - 30, 2004.
- KOCH, A.; ANDRADE, F. M. **A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão**. RBAC. v. 40, n. 1, p. 17-23, 2008.
- NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F. Thompson & Thompson: **Genética médica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- PARADELA, R. E.; FIGUEIREDO, S. L. O DNA vai ao tribunal: o impacto das tipagens genéticas. **Direito Médico**. Escritório On-line, 2006. Disponível em: <<http://www.dnaforense.com.br>> Acesso em: 08 mar. 2010.
- PENA, S. D. J. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. **Bioética**. v. 5. n. 02, p. 231-241, 1997.
- PEREZ-SWEENEY, B. M., RODRIGUES, F. P. & MELNICK, D. J. 2003. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JR, L., RUDRAN, R. & VaLLADARES-PADUA, C. (Eds.) **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brasil. 343-380 pp.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.11.