



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alípio dos Santos Rocha

**Aplicação da metodologia de dissociação em alta resolução (HRM)
para determinação de perfis genéticos com interesse forense**

Rio de Janeiro

2015

Alípio dos Santos Rocha

**Aplicação da metodologia de dissociação em alta resolução (HRM) para
determinação de perfis genéticos com interesse forense**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R672 Rocha, Alípio dos Santos.
Aplicação da metodologia de dissociação em alta resolução (HRM) para determinação de perfis genéticos com interesse forense / Alípio dos Santos Rocha.– 2015.
65 f.

Orientador: André Luiz Mencialha.
Coorientador: Rodrigo Grazinoli Garrido.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Genética forense - Teses. 2. DNA datiloscopia – Teses. 3. Reações Bioquímicas. 4. Ensaio de Triagem em Larga Escala. I. Mencialha, André Luiz. II. Garrido, Rodrigo Grazinoli. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 575.133.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alípio dos Santos Rocha

**Aplicação da metodologia de dissociação em alta resolução (HRM) para
determinação de perfis genéticos com interesse forense**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 6 de fevereiro de 2015.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencalha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido
Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À minha família, motivação da minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Diretor do Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido, por ter permitido que eu trilhasse mais esta etapa de minha formação acadêmica.

À minha chefe imediata, Perita Criminal Sandra Fernandes Pinto Martha, pela total disposição em flexibilizar meus horários a fim de possibilitar o cumprimento das obrigações junto ao mestrado. Sem esta compreensão e ajuda esta jornada seria mais pesada.

Aos amigos do IPPGF, em especial meus colegas Peritos, sempre companheiros e solidários. Com vocês o trabalho se torna ainda mais interessante e estimulante.

Às Prof.^{as} Dras. Tatiana de Almeida Simão e Ana Maria Rossini Teixeira por permitirem a utilização de seu laboratório e em tantos momentos, fornecerem os meios para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Prof.^a Dra Thereza Chirstina Barja-Fidalgo por permitir a utilização de seu equipamento de HRM, evitando a necessidade de um longo deslocamento que atrasaria o andamento do trabalho e poderia prejudicar os resultados.

Aos meus amigos e companheiros de república, parceiros para os bons momentos e apoio certo nas horas difíceis. Agradeço pela convivência harmoniosa desde os tempos do curso de formação de peritos.

Às companheiras de equipe de pesquisa, Ísis Salviano, Juliana Rodrigues e Laiane Duarte pela amizade e toda ajuda gentilmente prestada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha, pelos conhecimentos passados, convivência de amizade e pela paciência com minha rotina de trabalho. Obrigado por ensinar que liderança pode ser baseada em simpatia, respeito mútuo e na não necessidade de hierarquias e pronomes de tratamento.

Finalmente, faço um agradecimento especial à minha família, sempre um porto seguro em minha vida. Ao meu pai, exemplo de dedicação ao trabalho e hombridade. Aos meus irmãos, meus orgulhos e grandes motivadores. Por fim, a minha mãe, meu maior exemplo de bondade e respeito. Agradeço por todo carinho, dedicação e esforço para que seus filhos sempre soubessem o caminho correto e tivessem a oportunidade de estudar.

A vida resulta da sobrevivência não aleatória de replicadores aleatoriamente mutantes.

Richard Dawkins

RESUMO

ROCHA, Alípio dos Santos. *Aplicação da metodologia de dissociação em alta resolução (HRM) para determinação de perfis genéticos com interesse forense*. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A genética forense tem grande importância na geração de provas em casos de violência sexual, paternidade criminal, identificação de cadáveres e investigação de evidências de locais de crime. A análise de STRs apresenta grande poder de discriminação, mas é uma metodologia multi-etapas, trabalhosa, cara e em muitos casos a análise genética é prejudicada pela baixa quantidade e qualidade das evidências coletadas. Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma metodologia de triagem de amostras forenses através da análise de perfis de dissociação em alta resolução (HRM) de regiões do DNA mitocondrial, o qual está presente em maior número de cópias e mais resistente a degradação. Para tanto, foram extraídos DNAs de 68 doadores. Estas amostras foram sequenciadas e analisadas por HRM para sete alvos no DNA mitocondrial. Também foram realizados ensaios para determinar a influência do método de extração, da concentração e nível de degradação do DNA no perfil de HRM obtido para uma amostra. Os resultados demonstraram a capacidade da técnica de excluir indivíduos com sequências diferentes da referência comparativa em cinco regiões amplificadas. Podem ser analisadas em conjunto, amostras de DNA com variação de concentração de até a ordem de 100 vezes e extraídas por diferentes metodologias. Condições de degradação de material genético não prejudicaram a obtenção de perfis de dissociação em alta resolução. A sensibilidade da técnica foi aprimorada com a análise de produtos de amplificação de tamanho reduzido. A fim de otimizar o ensaio foi testada a análise de HRM em reações de PCR duplex. Um dos pares de amplificação forneceu perfis de HRM compatíveis com resultados obtidos de reações com amplificação de apenas um dos alvos. Através da análise conjunta das cinco regiões, esta metodologia visa a identificação de indivíduos não relacionados com as referências comparativas, diminuindo o número de amostras a serem analisadas por STRs, reduzindo gastos e aumentando a eficiência da rotina de laboratórios de genética forense.

Palavras-chave: HRM. Dissociação em alta resolução. DNA mitocondrial. Genética forense. Método de triagem. Regiões hiper-variáveis.

ABSTRACT

ROCHA, Alípio dos Santos. *Application of the high resolution melting (HRM) methodology to determine genetic profiles with forensic interest*. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The forensic genetics has an important role in the generation of evidence in cases of sexual assault, criminal paternity, identification of corpses and crime scenes investigation. The analysis of STRs has great power of discrimination, but it is a multi-stage methodology, complex, expensive and in many cases the genetic analysis is hampered by the low quantity and quality of evidence collected. This study aimed to develop and characterize a forensic samples screening methodology to examine high resolution melting profiles (HRM) of regions of the mitochondrial DNA, which is present in more copies and more resistant to degradation. Thus, we extracted DNA from 68 donors. These samples were sequenced and analyzed by HRM to seven mitochondrial DNA targets. Tests were also conducted to determine the influence of extraction method, concentration and DNA degradation level of HRM profile obtained for a sample. The results demonstrated the technical ability to exclude individuals with different sequences of comparative reference amplified in five regions. Can be analyzed together samples with varying concentration to the order of 100 times and extracted by different methods. Genetic material degradation conditions did not prevent obtaining high resolution melting profiles. The sensitivity of the technique was improved with the analysis of reduced size amplification products. In order to optimize the assay HRM analysis was tested in duplex PCR reactions. A pair of amplification provided HRM profiles consistent with results from amplification in reactions with only one of the targets. Through the joint analysis of the five regions, this approach aims to identify individuals not related to comparative references, reducing the number of samples to be analyzed by STRs, reducing costs and increasing the efficiency of the routine of forensic genetics laboratories.

Keywords: HRM. Dissociation in high resolution. Mitochondrial DNA. Forensic genetics. Screening method. Hypervariable regions.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	10
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1	Histórico da genética forense.....	11
1.2	Métodos de extração de DNA.....	13
1.3	Técnicas de identificação humana.....	14
1.4	DNA mitocondrial.....	16
1.5	Dissociação de DNA em Alta Resolução (HRM).....	19
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	Amostras de DNA.....	24
3.2	Extração e quantificação do DNA.....	24
3.3	Amplificação do DNA e Dissociação em Alta Resolução.....	27
3.4	Sequenciamento.....	30
3.5	Digestão de DNA.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	Avaliação da especificidade dos primers.....	32
4.2	Métodos de extração de DNA.....	33
4.3	Concentração de DNA.....	34
4.4	Simulação de amostras de DNA degradadas.....	36
4.5	Determinação de perfis de HRM a partir de regiões do DNA mitocondrial.....	37
4.5.1	<u>Avaliação do perfil HRM de HVI.....</u>	38
4.5.2	<u>Avaliação do perfil HRM de HVII.....</u>	40
4.5.3	<u>Avaliação do perfil HRM de C2.....</u>	42
4.5.4	<u>Avaliação do perfil HRM de C4.....</u>	44
4.5.5	<u>Avaliação do perfil HRM de NC.....</u>	46
4.6	Determinação de perfis de HRM utilizando produtos menores de PCR.....	48

4.6.1	<u>Avaliação de 110 pb do HVII</u>	50
4.6.2	<u>Avaliação de 86 pb do C4</u>	50
4.6.3	<u>Avaliação de 51 bp do NC</u>	51
4.7	Reações duplex para HRM	52
4.7.1	<u>Duplex C4/NC</u>	52
4.7.2	<u>Duplex C2/HVII</u>	53
5	DISCUSSÃO	55
	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE – Termo de consentimento livre e esclarecido	65

INTRODUÇÃO

As aplicações forenses específicas, com base nas tecnologias moleculares de análise do DNA, têm sido cada vez mais utilizadas em diversas áreas forenses, tal como: identificação de parentesco, análise de evidências de local de crime, casos de violência sexual, identificação de cadáveres, dentre outros. No contexto de identificação humana, a evolução das ferramentas moleculares para avaliação forense tem auxiliado significativamente a justiça criminal fornecendo provas cada vez mais concretas acerca da identificação humana/suspeitos.

A identificação humana através do DNA teve início na década de 80, utilizando marcadores moleculares de tamanho de fragmentos de restrição (Bultler 2005). Com o advento da técnica de PCR as análises genéticas obtiveram um salto de quantidade de informações geradas. Outro marco importante foi a descrição, no início dos anos 90, de regiões microssatélites no DNA chamadas de STRs que passaram a ser utilizadas na identificação humana (Butler 2005).

A metodologia que emprega a análise de STRs para a identificação humana se dá em multi-etapas, de forma laboriosa, demorada e cara. Os kits de PCR para identificação humana, validados para análises forenses, são vendidos a um preço médio de R\$ 57,00 por amostra. A este valor ainda devem ser adicionados o custo com os insumos necessários para a eletroforese capilar. Levando em consideração a rotina intensa de um laboratório de genética forense, alternativas que minimizem o número de amostras a serem submetidas a análise de STR trariam celeridade e redução de gastos.

Frente este quadro, este estudo visou desenvolver uma metodologia de triagem de amostras forenses através da análise de perfis de dissociação em alta resolução (HRM) de produtos de amplificação de regiões do DNA mitocondrial. A análise de HRM apresenta custo médio de R\$ 4,00 por reação e permite a obtenção de resultados em menos de duas horas. Os resultados obtidos permitiram a discriminação de indivíduos variantes em relação a uma amostra de referência e a montagem de reações duplex, onde se analisa dois locais em uma mesma reação, fator que garante mais economia e agilidade para a análise.

1 REVISÃO DE LITERATURA

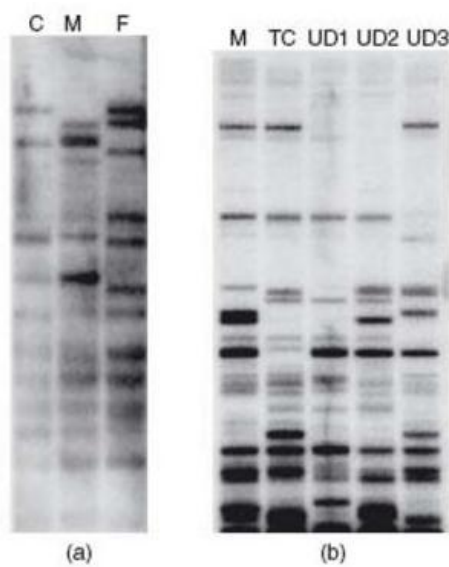
A identificação através do DNA atualmente é uma ferramenta essencial na área forense (Janice et al. 2012; Ioannis et al. 2012). As análises utilizando DNA são extremamente úteis para a identificação humana em situações em que o material biológico é encontrado como evidência em local de crime ou para a identificação de pessoas desaparecidas e de vítimas de desastres, através de comparação com parentes. A análise de DNA também permite a associação de crimes ocorridos em diferentes localidades e/ou espaçados temporalmente. Por se tratar de uma análise extremamente sensível e por requerer pequenas quantidades de material biológico, a identificação humana por DNA tem sido uma ferramenta essencial em várias áreas e abordagens forenses. Além disso, diversas fontes de material biológico podem ser utilizadas, tais como: fluidos e tecidos biológicos e os mais variados utensílios e vestimentas desde que apresentem pequenas quantidades de material humano (Jobling & Gill 2004).

1.1 Histórico da genética forense

A identificação humana por DNA, também conhecida como “DNA fingerprinting” em analogia as digitais do dedo (tecnicamente chamada de datilograma ou dermatóglifo), foi descrita primeiramente por Alec Jeffreys em 1985, na Inglaterra (Gill et al. 1985). Jeffreys demonstrou a presença de regiões repetitivas no DNA humano que podem variar em comprimento entre indivíduos, chamando essa variação de polimorfismo. Além disso, Jeffreys também desenvolveu uma técnica que o permitiu identificar pessoas através da análise de variações de tamanho nessas regiões repetitivas. A terminologia utilizada para essas regiões foi VNTRs (do inglês: “variable number of tandem repeats”) e a técnica desenvolvida para sua análise ficou conhecida como RFLP (do inglês: “restriction fragment length polymorphism”) (Figura 1). Esta técnica se baseia no uso de enzimas de restrição para clivar regiões próximas às sequências polimórficas e gerar fragmentos de DNA (Butler 2005). Diante disso, como os indivíduos possuíam diferentes

repetições nessas regiões, cada amostra apresentaria um perfil de fragmentação de DNA. Sendo assim, cada indivíduo poderia ser identificado de acordo com o seu padrão de fragmentos gerados pelo RFLP.

Figura 1 – Primeiros perfis genéticos utilizados na área forense



Legenda: (a) primeiro “DNA fingerprint”, produzido pelo laboratório de Alec Jeffreys em 1984. Padrão de bandas de uma criança (C), sua mãe (M) e seu pai (P) biológicos. (b) Perfis de uma mãe (M), suposto filho (C) e filhos biológicos desta mãe (UD1, UD2 e UD3).

Fonte: Adaptado de Goodwin, 2007.

Um marco na biologia molecular e na genética forense foi o advento da técnica de PCR (do inglês: “Polimerase Chain Reaction”) em 1983, desenvolvida por Karry Mullis (Saiki et al. 1985). A técnica da PCR permitiu o aumento da sensibilidade das análises de DNA, pois possibilita a amplificação de trechos de DNA que poderão ser utilizados nas análises posteriores. Assim, com esta técnica, tornou-se possível a obtenção de informação genética a partir de pequenas quantidades de material biológico, mesmo em amostras em processo de degradação. Além disso, a PCR permitiu a análise de um maior número de polimorfismos em uma amostra (Goodwin 2007).

1.2 Métodos de extração de DNA

Materiais biológicos coletados com finalidade de se realizar uma análise genética contêm muitas outras substâncias além de DNA. Para que a análise seja realizada é necessária a separação das moléculas de DNA dos demais componentes da amostra. Sendo assim, foram desenvolvidos vários métodos de extração de DNA, com a finalidade de se obter DNA de amostras de naturezas diversas como tecido ósseo, manchas de fluidos, sangue, saliva, etc. As principais técnicas de extração de DNA são a extração orgânica, por resina Chelex, a partir de papel FTA e por fase sólida.

A extração orgânica envolve várias etapas. A primeira é a adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) e proteinase K para promover a solubilização das membranas e a degradação de proteínas. Em seguida, é adicionada uma mistura de fenol-clorofórmio para separar o DNA dos demais componentes celulares. Após centrifugação, o DNA permanece na fase aquosa enquanto os debris celulares migram para a fase orgânica. A fase aquosa é, então, separada e o DNA é precipitado pela adição de solução concentrada de cloreto de sódio (NaCl) e de etanol ou isopropanol. O precipitado de DNA é ressuscitado em tampão apropriado para ser utilizado nas análises. Esta técnica permite a obtenção de moléculas de DNA de alto peso molecular, no entanto emprega muitos reagentes químicos nocivos (Butler 2005). Outra desvantagem é a utilização de múltiplas etapas, aumentando as chances de contaminação.

Um método alternativo para extração de DNA de sangue, saliva, manchas de sangue e sêmen é através da resina Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A presença de grupos quelantes nesta resina sequestra íons polivalentes que podem atuar como cofatores para nucleases, protegendo o DNA de degradação. Nos protocolos de extração, as amostras são acrescidas de suspensão de resina e fervidas por alguns minutos para o rompimento das células e liberação do DNA. Após rápida centrifugação os debris, juntamente com a resina, precipitam e o sobrenadante pode ser utilizado diretamente em reações de PCR. É um procedimento rápido e de baixo custo, mas o DNA obtido por este método não pode ser guardado por longos períodos.

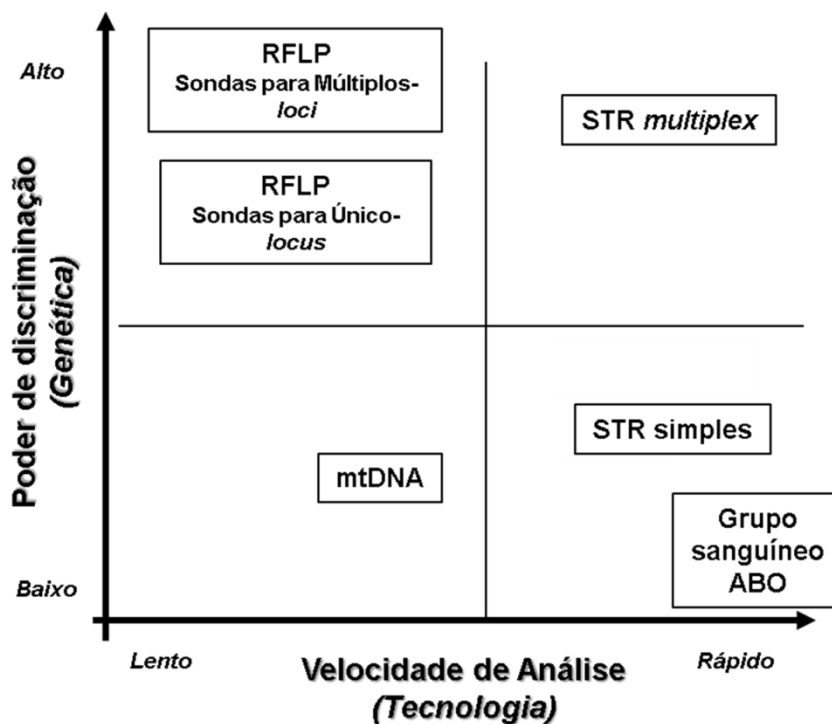
O papel FTA™ é um absorvente que possui quatro substâncias que protegem o DNA de degradação e evitam crescimento de microrganismos por muitos anos (Burgoyne 1996). O uso do papel FTA™ se dá através da adição de uma gota de sangue ao papel e posterior secagem do mesmo. As células são lisadas e o DNA dos glóbulos brancos é retido na matriz do papel. Fragmentos do papel FTA™ contendo uma amostra são retirados e o DNA contido é purificado através de um processo de lavagens para retirada dos grupos heme e outros inibidores de PCR. Então, estes fragmentos com DNA purificado podem ser usados para reações de PCR. O uso do papel FTA™ permite o armazenamento da amostra de DNA por longos períodos e é útil também para seu transporte. No entanto, só pode ser utilizado para evidências líquidas.

Na extração de DNA por fase sólida, os ácidos nucleicos adsorvem a um suporte de sílica na presença de altas concentrações de sais caotrópicos como cloridrato de guanidina e iodeto de sódio (Duncan et al. 2003). Estes agentes caotrópicos desfazem a rede de pontes de hidrogênio da água o que estabiliza, termodinamicamente, as conformações desnaturadas de proteínas e ácidos nucleicos. Em valores de pH inferiores a 7,5 o DNA adsorve à sílica enquanto demais moléculas podem ser separadas. Então, em meio alcalino, o DNA pode ser eluído e utilizado. Este método não é aconselhado para amostras exíguas, uma vez que apenas uma parte do DNA da amostra é recuperada no final do processo.

1.3 Técnicas de identificação humana

Ao longo da história da identificação humana, muitas estratégias foram usadas, tais como: sistema sanguíneo ABO, RFLP com sondas multilocais e sondas local-específicas e técnicas baseadas em PCR. Muitos avanços foram alcançados e, se antes era necessária uma considerável quantidade de amostra biológica bem preservada, hoje é possível a identificação a partir de quantidades mínimas de material biológico (Butler 2005). As diversas metodologias para identificação humana variam muito em velocidade de análise e poder de discriminação, como pode ser observado na figura 2.

Figura 2 – Comparativo das técnicas de identificação humana



Legenda: Foram verificados o poder de discriminação, onde é possível ter a certeza dos resultados, e a velocidade de análise das técnicas, medida do momento da obtenção do material biológico até o resultado final. mtDNA = DNA mitocondrial; STR = "Short tandem repeats".
 Fonte: Adaptado de Butler, 2005.

A análise do sistema ABO, foi desenvolvida em 1900 por Karl Landsteiner (Jobling & Gill 2004), permite uma rápida obtenção de resultados através da comparação dos tipos sanguíneos. No entanto, requer grande quantidade de amostra de tecido sanguíneo bem preservado e possui baixo poder de discriminação uma vez que existem apenas quatro grupos: A, B, AB e O - sendo que 40% da população é do grupo O. Por outro lado, a técnica baseada no DNA mitocondrial, representado por mtDNA, tradicionalmente se dá através do sequenciamento de regiões variáveis presentes nesta molécula, tornando esta análise muito demorada. E ainda, uma vez que o DNA mitocondrial é uma herança matrilinear, esta estratégia de análise fornece baixo poder de discriminação. No outro extremo, está a metodologia de análise RFLP *multi-loci* que possui um elevado poder de exclusão. Entretanto, é uma estratégia metodológica muito trabalhosa, de alto custo e requer tempo e experiência por parte do analista. Outra importante limitação da RFLP *multi-loci* é a

grande dificuldade em analisar misturas de materiais genéticos provenientes de diferentes indivíduos, algo frequente na rotina forense.

Dentre as abordagens discutidas, a alternativa mais atrativa para a rotina forense é a análise multiplex de STRs (do inglês: “Short Tandem Repeats”). STRs são regiões polimórficas do DNA que apresentam repetições em tandem que variam entre 2 a 7 pares de bases. Esta metodologia é de rápida execução e possui alto poder de discriminação. Devido a suas características, permite a análise de misturas e de materiais menos preservados (Butler 2005).

1.4 DNA mitocondrial

Apesar de ser a metodologia utilizada atualmente na prática de determinação humana forense, as análises de STRs apresentam limitações quanto a quantidade e qualidade de DNA nuclear (nucDNA) necessárias nos materiais biológicos coletados de cenas de crimes ou para identificação não criminal (Hu et al. 2014). Desta forma, muitas vezes são obtidos apenas perfis parciais de STRs, frequentemente associados as amostras biológicas que no momento da coleta já encontram-se em processo de degradação. Frente a este quadro, a utilização do DNA mitocondrial como fonte para obtenção de informações genéticas se mostra uma alternativa válida, pois está presente em mais de uma cópia nas células e apresenta um DNA circular que é mais resistente a degradação (Parson et al. 1998).

O genoma mitocondrial possui 16.569 pares de bases e sua sequência foi descrita em 1981 (Anderson et al. 1981), apresentando muitas características divergentes do nucDNA (Quadro 1). O DNA mitocondrial é herdado apenas da mãe e nele existe uma distribuição assimétrica de bases entre as duas fitas, originando uma fita pesada e uma fita leve (Scheffler 2007). O DNA da mitocôndria pode ser dividido em duas regiões. Uma maior, conhecida como região codificante, onde estão presentes 37 regiões transcritas que originam 13 proteínas envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa e produção de energia na célula, 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs de transferência (Fig. 3). Do total de transcritos, 28 são codificados pela fita pesada e apenas 9 são codificados pela fita leve. A segunda região do genoma, com 1200 pares de bases, é chamada de região controle, pois é

nela que se localiza a origem de replicação do DNA mitocondrial. A região controle é altamente polimórfica, com taxa de mutação cerca de dez vezes maior que a região codificante e pode ser subdividida em regiões hiper-variáveis (HV) (Parsons et al. 1997).

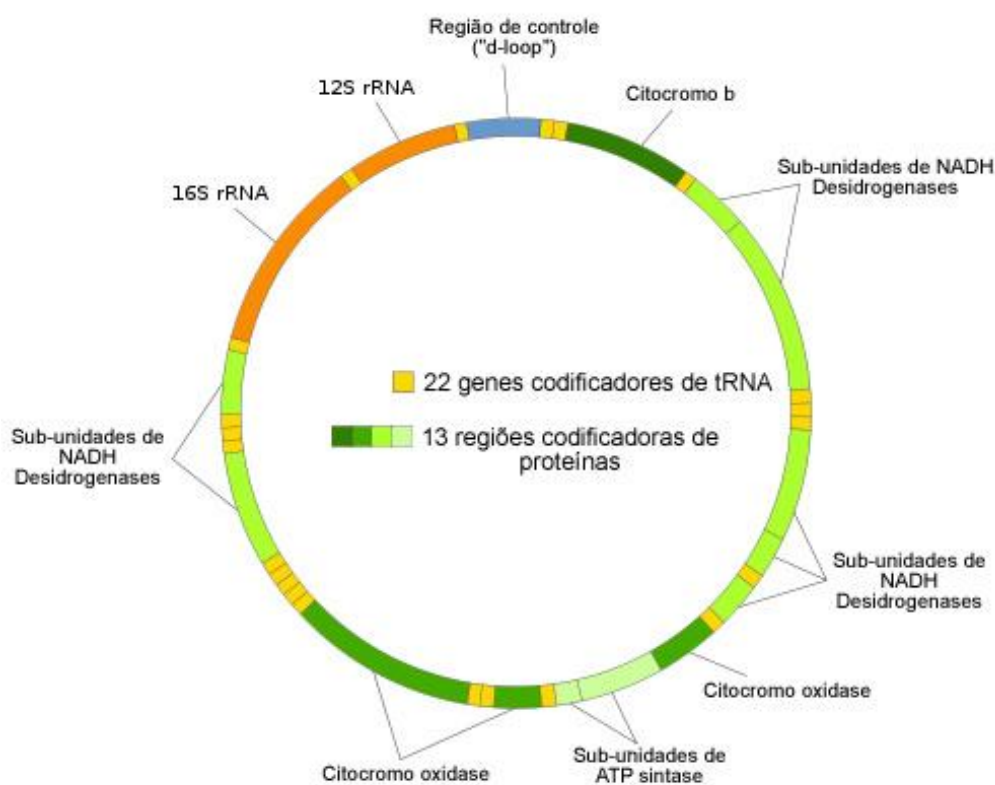
Tabela 1 – Comparação das características dos DNAs autossômico e mitocondrial humanos

Características	DNA Nuclear	DNA Mitocondrial
Tamanho do genoma	~3,2 bilhões de pb	~16569 pb
Cópias por célula	2 (1 alelo de cada parental)	
Percentual no conteúdo de DNA por célula	99,75%	0,25%
Estrutura	Linear, organizado em cromossomos	Circular
Tipo de herança	Paterno e materno	Materno
Pareamento cromossomal	Diploide	Haploide
Recombinação a cada geração	Sim	Não
Reparo de replicação	Sim	Não
Individualidade	Exclusivo para cada indivíduo (exceto gêmeos univitelinos)	Não exclusivo para cada indivíduo (o mesmo para parentes maternos)
Taxa de mutação	Baixa	5 a 10 vezes mais frequente que no nucDNA
Sequência de referência	Descrita em 2001 pelo projeto genoma (NC_012920)	Descrita em 1981 por Anderson e colaboradores

Fonte: Adaptado de Butler, 2005.

Diferente do nucDNA que, geralmente, se apresenta com apenas duas cópias (uma de origem materna e a outra paterna) por célula, o DNA mitocondrial, em média, está presente com 500 cópias por célula (Satoh & Kuroiwa 1991). Outra característica de destaque é a forma circular da molécula do DNA mitocondrial, o que o torna resistente a ação de exonucleases. Sendo assim, o DNA mitocondrial se mostra como uma alternativa para análise genética muito interessante em casos em que há pouco material biológico ou para amostras mal preservadas.

Figura 3 – Representação do DNA mitocondrial mostrando as regiões transcritas e a região controle



Na rotina forense, a análise do DNA mitocondrial se dá através do sequenciamento de Sanger de duas regiões polimórficas (HVI e HVII) da região controle para a detecção de polimorfismos que possibilitem a discriminação de indivíduos (Gidlöf et al. 2009). Em casos onde é necessário um maior poder de discriminação, se faz necessário o sequenciamento completo do genoma mitocondrial para a identificação de um maior número de variações genéticas que

possibilitem a exclusão e ou inclusão de indivíduos. Os resultados da análise do DNA mitocondrial são expressos como perfil de variações em relação à fita leve da sequência revisada de Cambridge (Andrews et al. 1999), também chamada de sequência revisada de Anderson. Por exemplo, a observação de um nucleotídeo A na posição 16012, ocupada por um nucleotídeo G na sequência revisada de Anderson, é reportada como 16012A.

1.5 Dissociação de DNA em Alta Resolução (HRM)

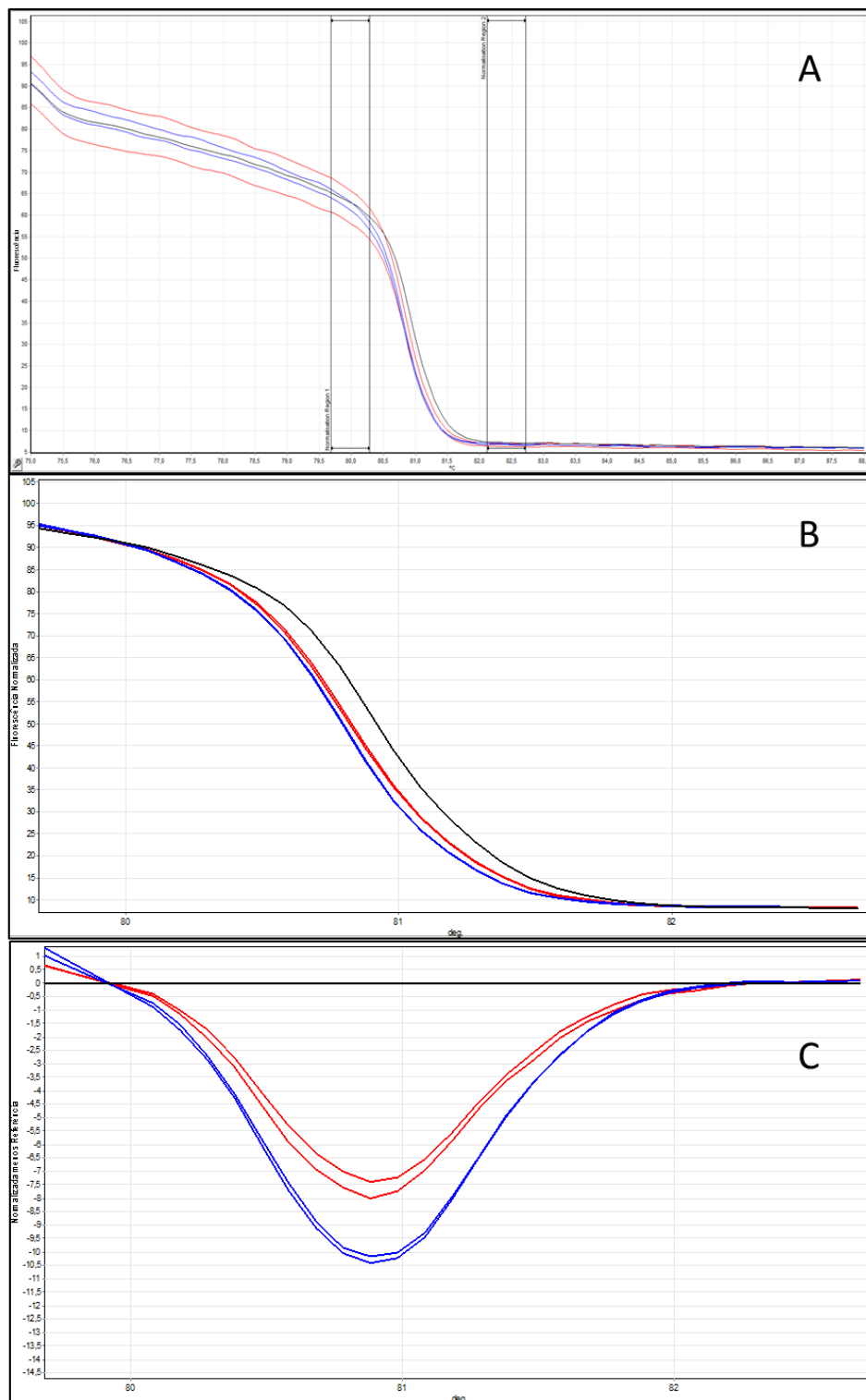
Apesar de úteis e confiáveis, as estratégias de análise de STRs e de sequenciamento de DNA mitocondrial se mostram trabalhosas, lentas e caras. Frente a este quadro, uma metodologia de triagem de amostras, mesmo que com menor poder de discriminação, mas que possibilite excluir amostras não relacionadas com os casos seria de grande valia. Desta forma, seria necessário analisar um número menor de amostras, reduzindo custos e agilizando a rotina de laboratórios forenses.

A dissociação de DNA em alta resolução, também conhecida como HRM (*High Resolution Melting*) é uma ferramenta altamente sensível que possibilita a identificação de variações de pelo menos um nucleotídeo nos produtos de PCR de determinada sequência de DNA (Wittwer et al. 2003). Esta técnica utiliza moléculas fluorescentes que intercalam o DNA de forma saturada. A análise se dá pelo acompanhamento do decaimento da fluorescência dos produtos de PCR frente uma rampa de aquecimento com pequenos incrementos de temperatura, podendo chegar a 0,1 °C. Variações nas sequências de DNA fazem com que ocorram mudanças em seus perfis de dissociação, registrados pelo equipamento para posterior montagem de uma curva de dissociação em alta resolução.

O processo de análise dos resultados inicia com uma normalização dos dados brutos. Duas regiões lineares, uma anterior e outra posterior a transição de fluorescência, são escolhidas (Figura 4-A). Estas regiões definem o 100% de fluorescência e a linha de base. A fluorescência percentual é calculada a cada temperatura como a distância dos dados experimentais em relação às linhas superiores e inferiores selecionadas na normalização (Figura 4-B). Diferentes

genótipos são mais facilmente distinguidos em um gráfico diferencial, onde uma das curvas é adotada como padrão e as diferenças de fluorescência entre as demais curvas e este padrão são plotadas em relação com as temperaturas (Figura 4-C).

Figura 4 – Processo de análise dos dados de HRM



Legenda: A- Gráfico mostrando dado bruto de fluorescência versus temperatura e regiões normalizadoras. B- Gráfico de fluorescência normalizada. C- Gráfico diferencial.

O HRM tem se mostrado muito útil para genotipagem de SNPs, detecção de mutações, e análises de metilação (Liew et al. 2004, Smith et al. 2008 e Wojdacz & Dobrovic 2007).

No entanto, ainda muito pouco vem sendo realizado na área forense de identificação humana. É uma técnica realizada em apenas uma etapa, de rápida obtenção de resultados e barata quando comparada à análise de STRs e sequenciamento de Sanger. Devido a estas características o HRM se mostra uma técnica ideal para ser utilizada em um procedimento de triagem de amostras forenses.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar a metodologia de dissociação em alta resolução para uso como método de triagem de amostras forenses.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a especificidade de *primers* para amplificação de DNA mitocondrial para análise de HRM;
- b) Investigar a possibilidade de alterações no perfil de HRM causadas por metodologias de extração de DNA;
- c) Verificar a influência da concentração de DNA mitocondrial para HRM;
- d) Determinar a amplificação de DNA mitocondrial sob a simulação de amostras biológicas degradadas;
- e) Comparar os resultados de perfis de dissociação obtidos com o HRM com os resultados do sequenciamento das sequências analisadas;
- f) Avaliar a influência do tamanho de produtos obtidos com a amplificação por PCR nas análises de HRM;
- g) Padronizar reações *duplex* de PCR para avaliação de perfis de dissociação de HRM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de DNA

Foram coletadas amostras de mucosa oral de 68 indivíduos utilizando swabes. Estas amostras foram obtidas no Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense da Polícia Civil (IPPGF) do Estado do Rio de Janeiro. Todas as coletas foram realizadas mediante leitura e assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual explicitava a possibilidade do uso das amostras em pesquisas científicas. Os doadores foram pessoas encaminhadas ao IPPGF para a doação de amostras de referência usadas na confecção de laudos de exame de DNA entre os anos de 2010 e 2011. Após a coleta as extremidades dos swabes foram cortadas e mantidas em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão PBS (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de 7.4) a 4 °C. Nas análises, o DNA extraído de linhagem celular humana MDA-MB-231 foi usado como um padrão para comparação com o DNA dos indivíduos.

3.2 Extração e quantificação do DNA

Extração orgânica – O DNA das amostras de material biológico foi extraído através do método de extração orgânico. Os microtubos foram agitados em vortex e os swabes descartados. Adicionou-se 500 µL de solução de fenol-clorofórmio-álcool Isoamílico (25:24:1, v/v) da marca Sigma-Aldrich®. Os microtubos foram novamente agitados em vortex e centrifugados a 11.000 x G por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase superior hidrofílica foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e, a ela, adicionado 0,1 volume de solução de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto. Após incubação a -20 °C por 2 horas, os microtubos foram centrifugados a 11.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e aos precipitados adicionou-se 1 mL de solução de etanol a 75% m/v. Os microtubos foram novamente centrifugados a 11.000 x g por 15 minutos a 4 °C e os

sobrenadantes foram descartados. Os DNAs precipitados foram secos em concentrador a vácuo a 45 °C e, em seguida, ressuspensos em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) e mantidos a -20 °C.

Também foram utilizadas outras metodologias de extração de DNA. São elas: “salting out”, extração com resina Chelex® 100 (BIO-RAD), extração com reagente DNAzol® (Life Technologies) e por kit de extração em coluna.

“Salting out” – Os microtubos foram agitados em vortex e os swabes descartados. Para a lise das células adicionou-se 1 mL de tampão SLR (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5mM NaCl 10 mM, pH 7,5). Os microtubos foram novamente agitados em vortex e centrifugados a 1200 x g por 10 minutos. Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados. Aos precipitados foi adicionado 7 µL de proteinase K 10 mg/mL, 500 µL de tampão SLB (Tris-HCl 20mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0,2 % m/v, pH 7,5). Os microtubos foram incubados a 56°C por 2 horas. Após a incubação foi adicionado 200 µL de solução de NaCl 5M e os microtubos foram agitados por inversão e, em seguida, centrifugados a 11.000 x G por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e, então, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto. Os microtubos foram novamente agitados manualmente e centrifugados a 11.000 x G por 30 minutos a 4 °C. Na etapa seguinte os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram acrescidos de 1 mL de solução de etanol 70 % m/v. Após nova centrifugação a 11.000 x G por 30 minutos a 4 °C os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram secos em concentrador a vácuo a 45 °C e, em seguida, ressuspensos em 50 µL de tampão TE⁻⁴ (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) e mantidos a -20 °C.

Resina Chelex® 100 – Após agitação e descarte dos swabes os microtubos foram centrifugados a 7.000 x g por 5 minutos. O excesso de sobrenadante foi retirado permanecendo 150 µL de solução nos microtubos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de suspensão de Chelex® 100 a 5 % m/v. Os microtubos foram agitados por inversão e incubados a 56 °C por 30 min e, após, em água fervente por 8 minutos. Na etapa seguinte os microtubos foram centrifugados a 5.000 x G por 5 min e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos e mantidos a -20 °C.

DNAzol® - Este método também foi usado para a extração de DNA de cultura de células MDA-MB-231. Após retirada do meio de cultura, 1 mL do reagente DNAzol® foi adicionado à garrafa de 75 cm² de cultura contendo as células aderidas. Após agitação manual o lisado de células foi recuperado e transferido para

um microtubo. Para as amostras de referência de doadores do IPPGF, após agitação em vortex, os swabes foram descartados e os microtubos centrifugados a 7.000 x g por 5 minutos. Uma parte do sobrenadante foi retirada, permanecendo 100 µL do mesmo nos microtubos. Foi adicionado 1 mL de reagente DNAzol® a cada amostra. A homogeneização se deu por pipetagem. Desta etapa em diante o protocolo é o mesmo para as amostras de referência e para as células MDA-MB-231. Após adição de 500 µL de etanol absoluto, os microtubos foram agitados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas a 4.000 x G por 2 minutos para a precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram descartados e procedeu-se com duas etapas de lavagem dos precipitados de DNA: adição de 1 mL de etanol 75%, agitação por inversão, incubação por 1 min a temperatura ambiente e remoção do sobrenadante por pipetagem. Os microtubos foram mantidos abertos até a secagem dos precipitados, os quais foram, depois de secos, ressuspensos em 100 µL de solução de NaOH 8 mM. O pH das soluções foram ajustados para o valor de 7,5 através da adição de 15,9 µL de HEPES 0,1 M. Os DNAs extraídos foram armazenados a -20 °C.

Coluna de sílica – Neste estudo foi utilizado o kit de extração Invisorb® Spin Forensic Kit (Stratec Meloclar). As composições e concentrações das soluções utilizadas não foram especificadas no manual do kit. Após agitação em vortex os swabes foram descartados os microtubos centrifugados a 7.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, aos microtubos, foi adicionado 100 µL de tampão M, 100 µL de água ultrapura, 20 µL de solução de DNA carreador e 10 µL de solução de proteinase K. Os microtubos foram incubados a 56 °C por 10 minutos sob agitação. Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão B6 e as soluções foram agitadas por pipetagem. O conteúdo dos microtubos foi transferido para conjuntos compostos de filtros RTA acoplados a tubos coletores, providos pelo kit, os quais foram centrifugados a 11.000 x g por 2 minutos. Os filtros foram, em seguida, lavados através da adição de 300 µL de tampão de lavagem I e centrifugação a 11.000 x g por 1 minuto. Os tubos coletores foram descartados juntamente com os filtrados. Os filtros RTA foram, então, acoplados a novos tubos coletores e foram adicionados 600 µL de tampão de lavagem II. Os conjuntos foram centrifugados a 11.000 x g por 1 minuto. O conteúdo dos tubos coletores foi descartado e os filtros foram novamente centrifugados a 11.000 x g por 1 minuto para remoção de etanol

residual. Após secos, os filtros foram acoplados a novos tubos coletores. Foram adicionados 100 μL de tampão de eluição pré-aquecido a 56 °C às membranas dos filtros. Após incubação a temperatura ambiente por 1 minuto, os conjuntos foram centrifugados a 11.000 x g por 1 minuto. Os filtros foram descartados e os filtrados, contendo o DNA, foram mantidos a -20 °C.

Os DNAs extraídos pelos diferentes métodos foram quantificados utilizando o equipamento NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare). Para cada técnica de extração realizada, a solução usada para a ressuspensão ou eluição final do DNA foi usada na determinação do 0% de absorbância. A calibração foi realizada em duas etapas, nas quais 5 μL da solução foi aplicada na janela de leitura para a determinação do 100% de transmitância. A quantificação (em ng/ μL) se deu pela aplicação de 2 μL da amostra na janela de leitura.

3.3 Amplificação do DNA e Dissociação em Alta Resolução

As reações de PCR e HRM foram realizadas utilizando Type-it HRM PCR Kit (Qiagen) no equipamento Rotor-Gene Q 2plex HRM (Qiagen). Cada reação foi composta de 1 X de HRM PCR Master Mix; 0,2 μM de primers; 10 ng de DNA e água para um volume total de 25 μL . Foram utilizados primers com alvo nas regiões hiper-variáveis e codificantes do genoma mitocondrial e para o gene autossômico B-RAF (Figura 5) (Tabela 2). Para cada local foram analisadas amostras de 67 ou 68 indivíduos e o do padrão comparativo (DNA de células MDA-MB-231) em duplicatas. O programa usado para a amplificação foi composto de: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos; seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos. Após a ciclagem as reações foram mantidas a 60 °C por 5 minutos e em seguida submetidas a uma rampa de dissociação em alta resolução de 75 a 88 °C com incrementos de 0,1 °C, intervalados de 2 segundos.

Figura 5 – Posição do primers no genoma mitocondrial

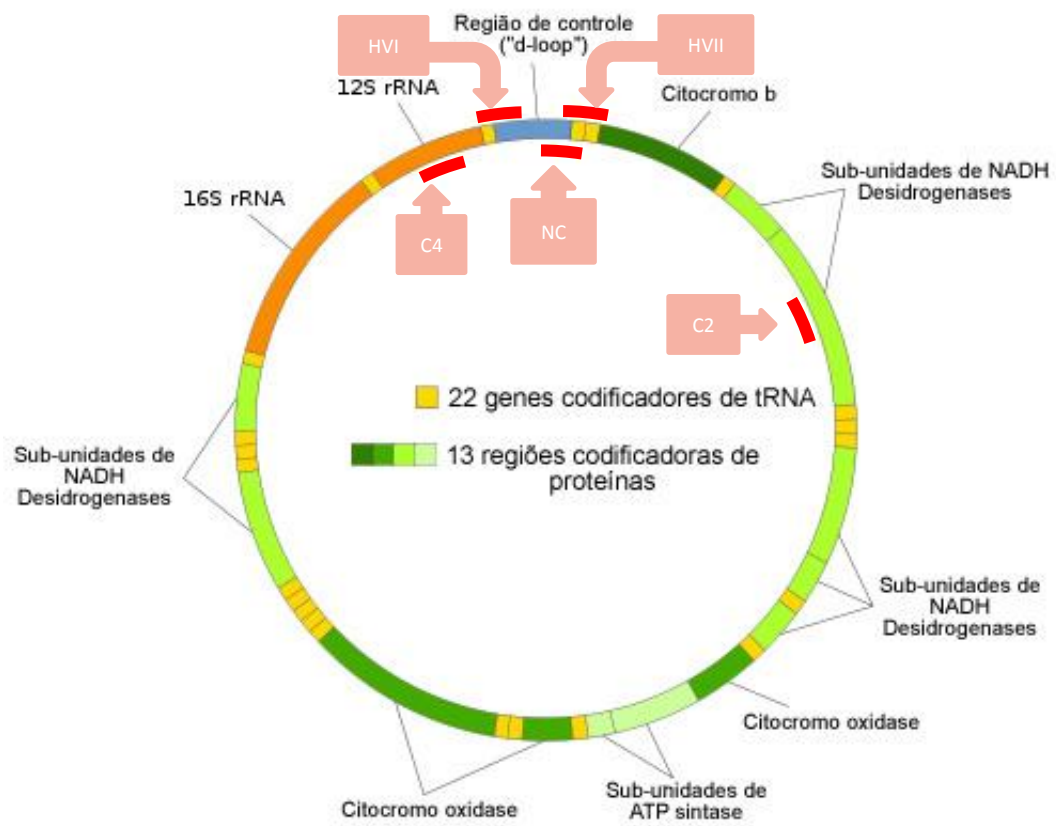


Tabela 2 - Lista de *primers* utilizados para amplificação por PCR

Alvo	Primer	Sequencia (5'-3')	Tamanho do Amplicon (pb)
HVI ^a	HVI-F	TGCCAGCCACCATGAATA	243
	HVI-R	GACTGTAATGTGCTATGTACGGTAAA	
HVII ^a	HVII-F	ATGCATTTGGTATTTTCGTCTG	242
	HVII-R	TTGTTATGATGTCTGTGTGGAAAG	
HVIIB	HVIIB-F	ATCGCACCTACGTTCAATA	110
	HVIIB-R	GAAAGCGGCTGTGCAGACATT	
C2 ^b	C2-F	CGATGTTGGATCAGGACA	228
	C2-R	GGGTGGGTGTGGGTATAA	
C4 ^b	C4-R	ATGACCCCAATACGCAA	202
	C4-F	TGGGCGATTGATGAAAAG	
C4B	C4B-F	ACTTCGGCTCACTCCTTG	86
	C4B-R	TTGAGGCGTCTGGTGAGTAG	
NC ^b	NC-F	GACATCTGGTTCCTACTTCA	222
	NC-R	ATGAGGCAGGAATCAAA	
NCB	NCB-F	GAACGTGTGGGCTATTTAGG	51
	NCB-R	GACATCTGGTTCCTACTTCAG	
B-RAF	B-RAF-F	TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	224
	B-RAF-R	GGCCAAAATTTAATCAGTGGA	

Legenda: Características dos primers utilizados. a – retirado de Gidlöf et al. 2009; b – retirado de Andréasson et al. 2006. Os primers HVIIB, C4B e NCB foram confeccionados com o uso da ferramenta OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies). O primer B-RAF foi cedido pelo Laboratório de Bioquímica da UERJ.

As análises de HRM foram feitas com o programa Rotor-Gene Q Series Software, versão 1.7. A partir do dado de fluorescência bruto foi obtido o gráfico de dissociação normalizado. As regiões normalizadoras foram mantidas para diferentes experimentos com um mesmo alvo. Na etapa analítica seguinte, a amostra padrão foi selecionada como referência para a confecção do gráfico diferencial. Amostras que apresentaram distorções em relação ao padrão foram selecionadas para sequenciamento. Para análises de variação de perfil de HRM, foram consideradas semelhantes ao padrão amostras com percentual de confiança superior a 90%.

3.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR das amostras selecionadas foram purificados com PureLink® PCR Purification Kit (Life technologies). As composições e concentrações das soluções do kit não foram especificadas pelo fornecedor. As duplicatas foram reunidas e, a elas adicionados 200 µL de tampão de ligação B2. As soluções resultantes foram transferidas para colunas de purificação fornecidas no kit. Após centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto os filtrados foram descartados. Foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem às colunas, as quais passaram por nova centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e as colunas foram centrifugadas a 15.000 x g por 3 minutos para eliminação de tampão de lavagem residual. As colunas foram acopladas a tubos de eluição e, em seguida, foram adicionados 50 µL de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) no centro das colunas. Na etapa seguinte, os conjuntos foram mantidos a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugados a 15.000 x g por 2 minutos. As colunas foram descartadas e os DNAs eluídos foram utilizados sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram montadas em placas de 96 poços utilizando BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies) e foram compostas de: 1 µL de reagente BigDye®; 2 µL de 5X Sequencing Buffer; 3,2 pmol de primer; 10 ng de DNA purificado e água ultrapura para volume total de 10 µL. O programa usado para a reação de sequenciamento foi constituído de um passo de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 2 minutos e incubação a 4 °C.

Após a reação de sequenciamento os produtos passaram por uma etapa de purificação. A cada reação foram adicionados 2,5 µL de solução de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 30 µL de etanol absoluto. A placa foi agitada por inversão e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 4.000 x g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa foi centrifugada invertida por 5 segundos. A cada reação foram adicionados 30 µL de etanol 70 % m/v e a placa foi centrifugada a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi, novamente, centrifugada invertida por 5 segundos e mantida a 60 °C por 10 minutos sem cobertura. Os

precipitados foram ressuspensos em 10 μ L de formamida Hi-Di™ (Life Technologies).

A eletroforese capilar foi realizada no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies), utilizando conjunto de capilares de 50 cm e polímero POP-7™ (Life Technologies).

As sequências obtidas foram analisadas no programa Bioedit 7.2.5 (Ibis Bioscience) e Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Foram realizados pareamentos das sequências dos primers senso com as sequências reversas complementares dos primers antissenso para cada um dos alvos.

3.5 Digestão de DNA

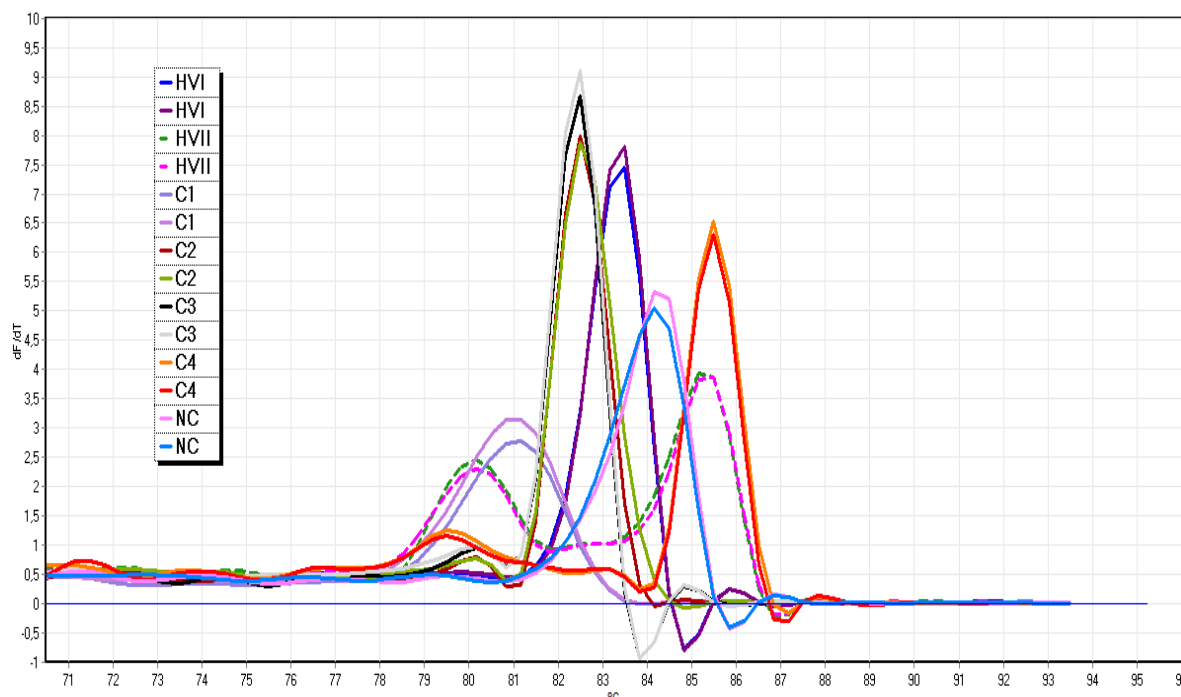
Alíquotas de DNA total extraído de cultura de células MDA-MB-231 foram submetidas à digestão enzimática. Foi utilizada a DNase RQ1 (Promega). 5 μ g de DNA total foram incubados com 10 μ L de tampão de reação 10 X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM), 2 unidade de DNase e água ultrapura para um volume total de 100 μ L. As reações de digestão foram incubadas a temperatura ambiente. Nos tempos determinados (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) alíquotas de 10 μ L foram transferidas para microtubos contendo 1 μ L de solução de parada (EGTA 20 mM, pH 8,0) e incubadas a 65 °C por 10 minutos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da especificidade dos primers

Antes da realização da análise por HRM os primers foram avaliados para obtenção de produtos da PCR específicos. As reações de PCR foram estabelecidas utilizando DNA de cultura de células MD-MBA-231 e cada um dos pares de primers elaborados para amplificação de trechos do mtDNA. Após a etapa e amplificação da PCR, os produtos dessa reação foram submetidos a análise de dissociação em alta resolução. Os resultados estão representados por apenas um pico na razão entre a derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT - Figura 6). Os resultados obtidos demonstraram que todos os primers resultaram em uma amplificação específica. Entretanto, o produto da PCR para HVII apresentou dois picos. Após avaliação em gel de agarose e levantamento bibliográfico, verificou-se a existência de dois sítios de dissociação em um mesmo produto de PCR. Contudo, todos os primers elaborados estavam dentro dos critérios para HRM e foram utilizados nas análises subsequentes.

Figura 6 – Avaliação da especificidade dos primers



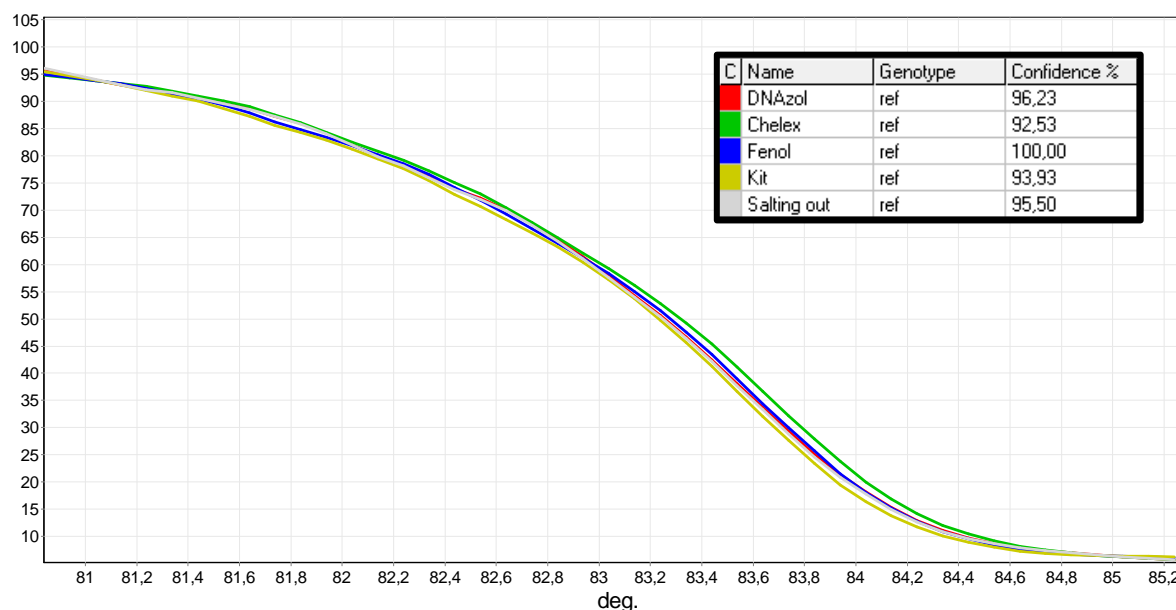
Legenda: Representação das curvas de dissociação obtidas dos produtos das PCRs para os primers cujos alvos foram: região hiper-variável I (HVI) e II (HVII); regiões codificantes (C1, C2, C3 e C4); e região não codificante (NC) do genoma mitocondrial. Eixo Y: razão da derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT). Eixo X: variação de temperatura em graus Celsius (°C). Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.2 Métodos de extração de DNA

Na rotina da genética forense várias metodologias de extração de DNA são utilizadas com base no tipo de evidência a ser processada. Estas metodologias de extração de DNA apresentam grandes diferenças de tratamentos e componentes químicos utilizados. Sendo assim, foi investigado se a forma como o DNA foi extraído poderia gerar variações no perfil de HRM para uma mesma sequência de DNA. Para tanto, amostras de cultura de células MB-MBA-231 foram submetidas a 5 diferentes metodologias de extração de DNA presentes na rotina forense: extração orgânica (Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico), por Resina Chelex® 100, “salting out”, método do DNAzol® e com kit de extração por coluna Invisorb Spin Forensic Kit da empresa Stratec Biomedical. Os DNAs obtidos foram submetidos a análise de

HRM utilizando primer para a região NC. Os resultados obtidos (Figura 7) demonstram que o método de extração empregado para obtenção do DNA não influenciou significativamente no perfil de HRM do mesmo, uma vez que os percentuais de confiança se mantiveram acima de 90%. Assim, sugere-se que a metodologia de HRM pode ser realizada sem prejuízo independentemente do método de extração empregado.

Figura 7 – Influência dos métodos de extração de DNA no perfil de HRM



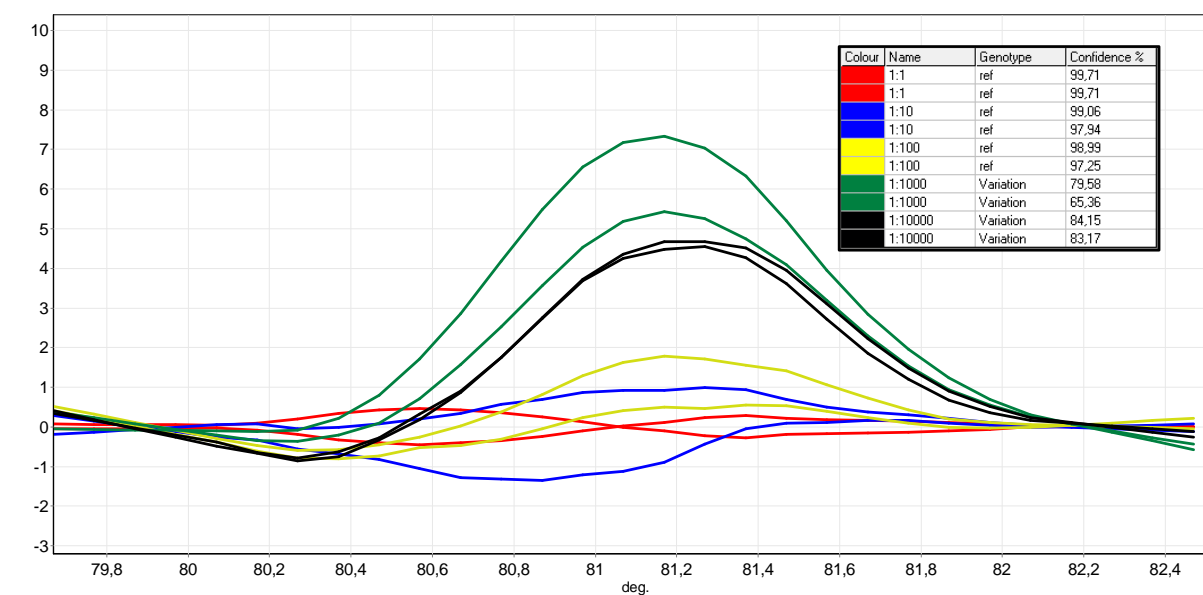
Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região não codificante (NC) de DNA obtido pelos diferentes métodos extração orgânica, por Resina Chelex® 100, por “salting out”, com DNAzol® e com kit de extração por coluna. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.3 Concentração de DNA

Com o intuito de analisar o limite de detecção da PCR utilizando mtDNA e a influência da concentração no perfil de dissociação em alta resolução, foram realizadas reações de qPCR e análise de HRM utilizando primer para a região C2 e diluições seriadas de uma amostra de DNA de cultura de células MD-MBA-231. As diluições utilizadas foram: 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Como observado na figura 8, diluições a partir de 1:1000 promovem distorções significativas no perfil de dissociação em alta resolução, considerando um percentual de confiança de 90%, o

que prejudicaria as análises de HRM para identificação dos indivíduos. Entretanto, nas diluições 1:1, 1:10 e 1:100 os perfis de dissociação permaneceram semelhantes, não apresentando variações significativas, possibilitando uma identificação dos indivíduos avaliados por HRM com maior confiança.

Figura 8 – Influência da concentração de DNA no perfil de HRM

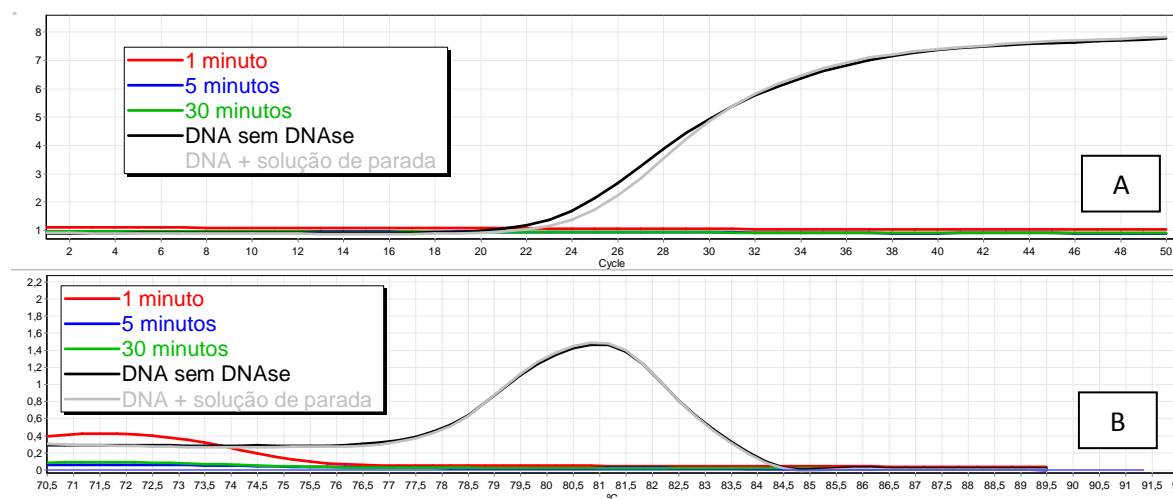


Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região codificante 2 (C2) de DNA em diferentes concentrações a partir da extração inicial. *Ref* = semelhante a curva de referência até 90%; *Variation* = diferente da curva de referência menor do que 90%. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.4 Simulação de amostras de DNA degradadas

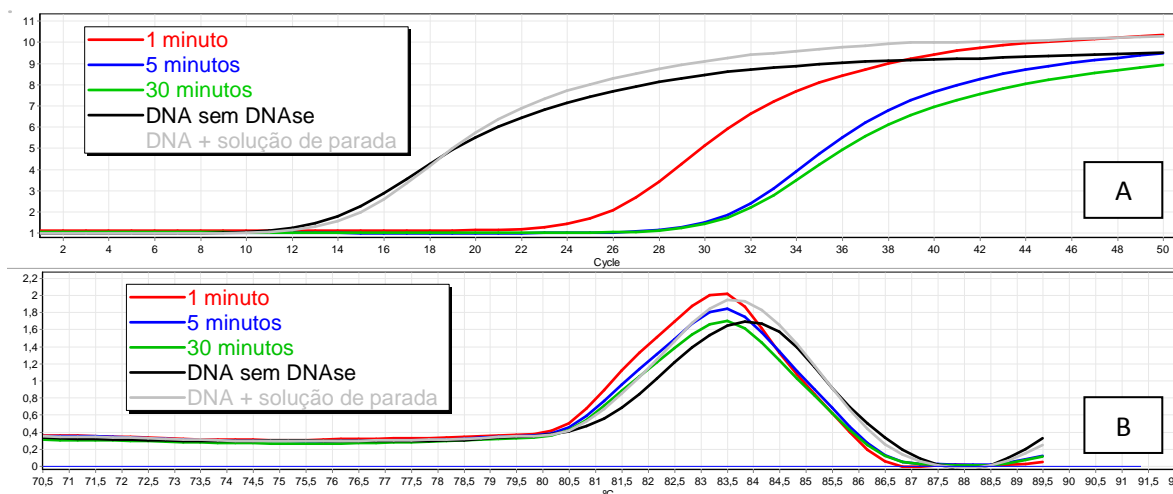
Para avaliar a utilização e vantagens do DNA mitocondrial frente ao DNA autossômico na metodologia de HRM, foi simulado, através de tratamento com DNase, a possibilidade de obtenção de DNA de amostras biológicas em mau estado de conservação frente a um quadro de degradação progressiva do DNA. Para tanto, aproximadamente 5 µg de DNA total extraído de células MD-MBA-231 foram submetidos à ação de DNase e alíquotas desta reação foram coletadas em tempos crescentes e utilizadas como substrato para reação de qPCR. A partir dos dados de amplificação por PCR obtidos verificou-se que a partir de 1 minuto de ação da DNase não é mais possível a amplificação de uma região autossômica (Figura 9). No entanto, a amplificação de DNA mitocondrial se mostrou possível até 30 minutos de ação da DNase (Figura 10). Este resultado demonstra que, para evidências degradadas, alvos DNA mitocondriais apresentam maior probabilidade de fornecer informações em relação a alvos autossômicos para HRM.

Figura 9 – PCR em tempo real para alvo autossômico B-RAF



Legenda: A – gráfico de ganho de fluorescência (eixo Y) pelos ciclos de amplificação (eixo X) para a região autossômica B-RAF. Produtos de Digestão com DNase de 1, 5 e 30 minutos e controles: DNA sem DNase e DNA com solução de parada. B – gráfico de dissociação para o alvo B-RAF com tempos de digestão de 1, 5 e 30 minutos e controles: DNA sem DNase e DNA com solução de parada. Eixo Y: razão da derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT). Eixo X: variação de temperatura em graus Celsius (°C). Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 10 – PCR em tempo real para alvo mitocondrial C2



Legenda: A – gráfico de ganho de fluorescência (eixo Y) pelos ciclos de amplificação (eixo X) para a região mitocondrial C2. Representados os produtos de Digestão com DNase de 1, 5 e 30 minutos e controles: DNA sem DNase e DNA com solução de parada. B – gráfico de dissociação para o alvo C2 com tempos de digestão de 1, 5 e 30 minutos e controles: DNA sem DNase e DNA com solução de parada. Eixo Y: razão da derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT). Eixo X: variação de temperatura em graus Celsius ($^{\circ}C$). Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.5 Determinação de perfis de HRM a partir de regiões do DNA mitocondrial

Os DNAs obtidos dos 68 indivíduos foram submetidos a reação de PCR e determinação de perfil de HRM para regiões do DNA mitocondrial. Foram utilizados 7 pares de primer que geram produtos com tamanho entre 202 e 243 pares de bases. O DNA de cultura de células MD-MBA-231 foi adotado como padrão comparativo e os gráficos diferenciais foram montados tendo este padrão como linha de base. O propósito desta análise é conseguir identificar indivíduos com sequências variantes através da visualização de distorções nos gráficos de HRM que mudem o formato do perfil em relação ao padrão comparativo, caracterizado pela linha reta do gráfico diferencial.

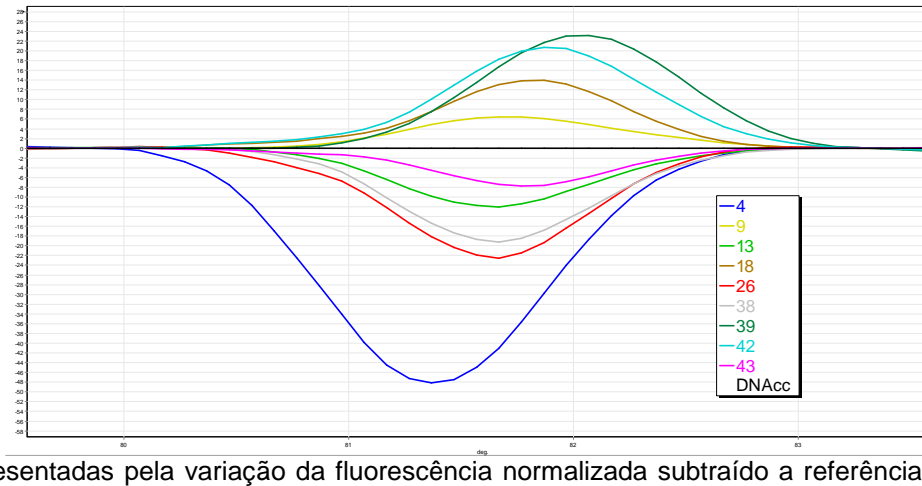
A partir dos resultados obtidos, os DNAs do padrão e de alguns indivíduos com perfis variantes foram selecionados para sequenciamento e confirmação da presença de alterações nas sequências. . A seguir estão apresentados os resultados mais relevantes para cada trecho de DNA mitocondrial a fim de possibilitar uma melhor visualização e análise dos gráficos de HRM e também, em razão de que grupos de indivíduos apresentaram o mesmo padrão de HRM, sendo necessária a presença de apenas uma amostra representativa de cada grupo nos gráficos. Não

foram apresentados dados para os locais C1 e C3 devido ao baixo nível de variação presente nestes locais, característica que não traz informação útil para a análise.

4.5.1 Avaliação do perfil HRM de HVI

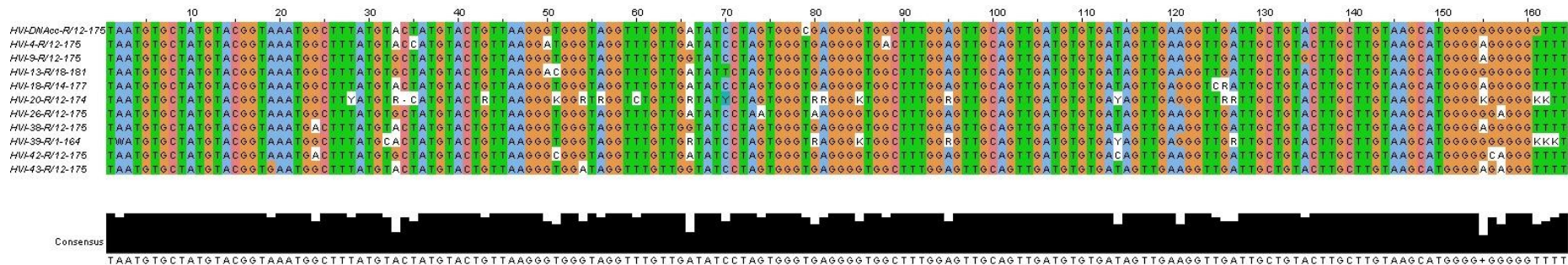
Tratando-se de uma região hiper-variável, os perfis de HRM obtidos das amostras foram muito variados (Figura 11). Esta grande variação foi confirmada pelo sequenciamento dos produtos de PCR (Figura 12). Observam-se variados graus de distorção em relação ao padrão e a presença de alterações ao longo das sequências. Há três regiões com maior concentração de variações: posição 44, 77 e 167. Para este local, dentre as amostras analisadas e representadas na figura 10, pode-se determinar como variantes em relação ao padrão os indivíduos 4, 18, 26, 38, 39 e 42. Para os indivíduos 9, 13 e 43 não é possível excluir sua semelhança ao padrão por este local. As exclusões através da análise das distorções do HRM foram compatíveis com a presença de alterações nas sequências obtidas.

Figura 11 – Perfis HRM para região HVI



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região hiper-variável I para os indivíduos 4, 9, 13, 18, 26, 38, 39, 42 e 43. DNacc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 12 – Alinhamento das seqüências para região HVI

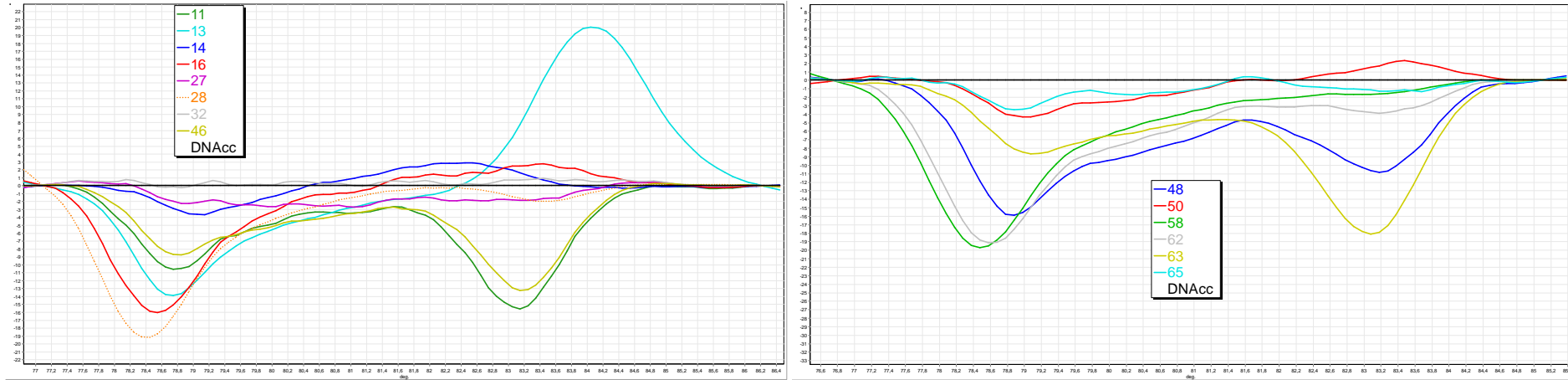


Legenda: Alinhamento das seqüências amplificadas com o primer HVI-R para os indivíduos selecionados. As barras pretas representam a frequência da seqüência consenso, presente na parte inferior da figura. Imagem obtida e editada da ferramenta Clustal Omega 1.2.1. R= A, G; K= G, T; Y= C, T.

4.5.2 Avaliação do perfil HRM de HVII

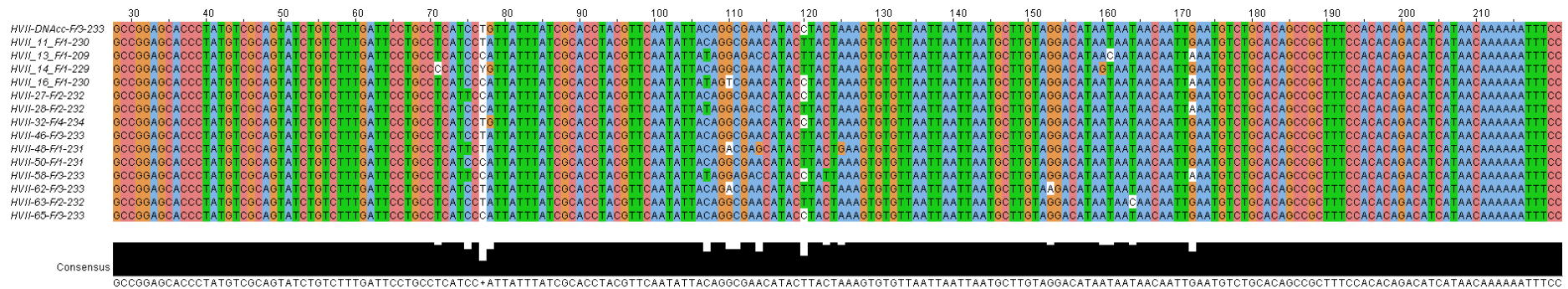
A região HVII também apresentou grande quantidade de variações nos perfis de HRM e nas sequências obtidas (Figura 13). Como descrito na literatura, esta região possui dois domínios de dissociação (Gidlöf et al. 2009), característica que gera duas distorções em relação a reta do padrão no gráfico diferencial. Os domínios de dissociação encontram-se nas temperaturas de 78°C e 84°C respectivamente. As sequências obtidas revelam a presença de três regiões de maior incidência de variações: posição 77, 120 e 172 (Figura 14). Foi possível identificar os indivíduos 11, 13, 16, 28, 46, 48, 58, 62 e 63 como diferentes do padrão. As exclusões através da análise das distorções do HRM foram compatíveis com a presença de alterações nas sequências obtidas.

Figura 13 – Perfis HRM para região HVII



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região hiper-variável I para os indivíduos 11, 13, 14, 16, 27, 28, 32, 46, 48, 50, 58, 62, 63 e 65. DNacc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 14 – Alinhamento das seqüências para região HVII

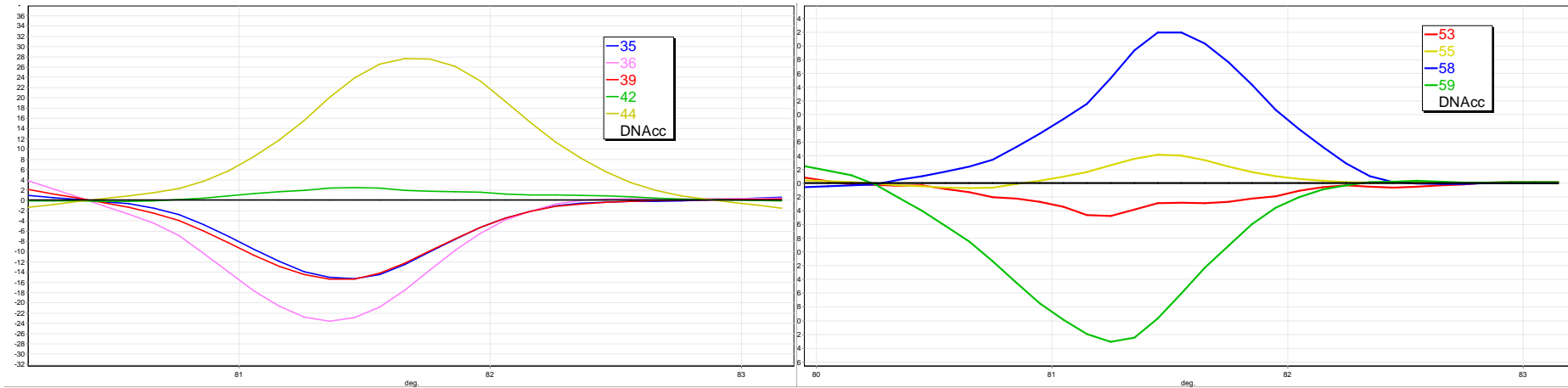


Legenda: Alinhamento das seqüências amplificadas com o primer HVI-R para os indivíduos selecionados. As barras pretas representam a frequência da seqüência consenso, presente na parte inferior da figura. Imagem obtida e editada da ferramenta Clustal Omega 1.2.1. Y= C, T.

4.5.3 Avaliação do perfil HRM de C2

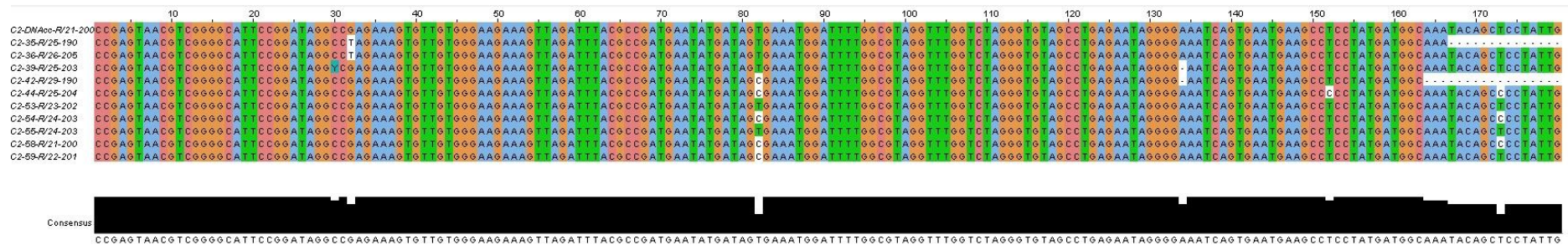
No local C2 foi obtida uma menor variedade de perfis de HRM (Figura 15), reflexo da localização dessa região na porção conservada do genoma mitocondrial. A análise das sequências revelou um número reduzido de variações quando comparado as regiões hiper-variáveis (Figura 16). Foram identificadas como variantes os indivíduos 35 (32G/T) e 36 (32G/T), 39 (30Y; delA134), 42 (82T/C; delA134); 44 (82T/C, 152T/C; 173T/C), 54 (82T/C; 173T/C) 58 (82T/C) e 59 (82T/C; 173T/C). Das 16 variações observadas, 9 estão localizadas em duas posições: 52 e 102. Não houve variação nos indivíduos 53 e 55. As exclusões através da análise das distorções do HRM foram compatíveis com a presença de alterações nas sequências obtidas.

Figura 15 – Perfis HRM para região C2



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região codificante 2 para os indivíduos 35, 36, 39, 42, 44, 53, 55, 58 e 59. DNAcc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 16 – Alinhamento das seqüências para região C2

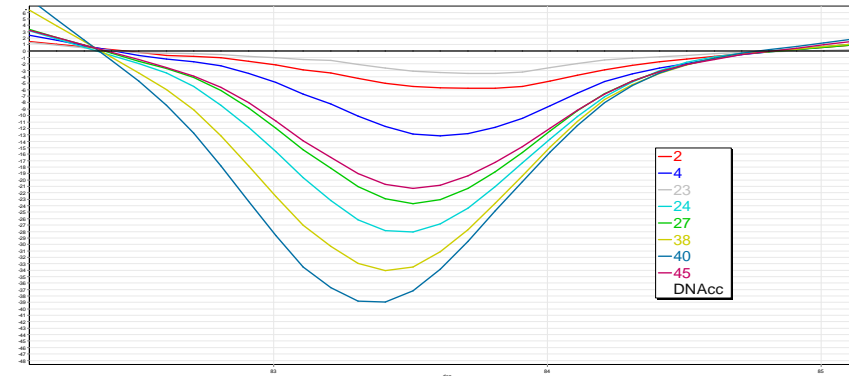


Legenda: Alinhamento das seqüências amplificadas com o primer C2-R para os indivíduos selecionados. As barras pretas representam a frequência da seqüência consenso, presente na parte inferior da figura. Imagem obtida e editada da ferramenta Clustal Omega 1.2.1. Y= C, T.

4.5.4 Avaliação do perfil HRM de C4

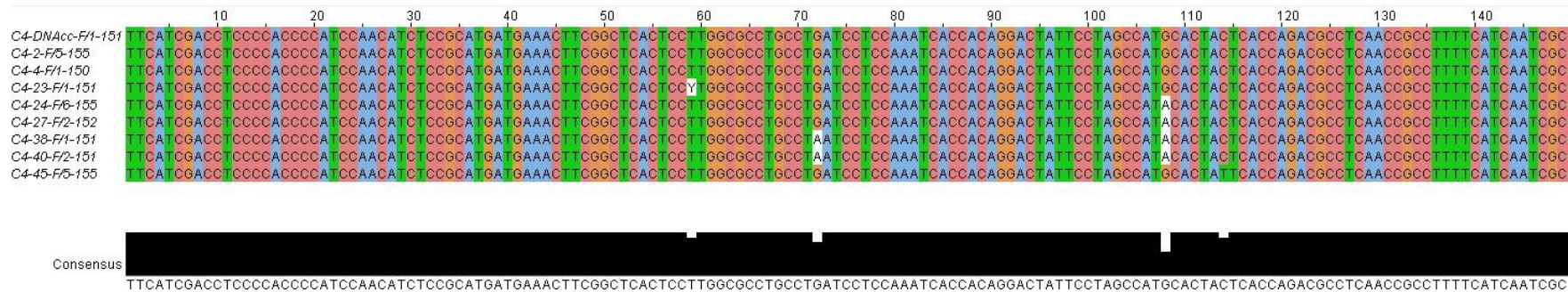
Foram observados poucos variantes nos perfis de HRM no local C4 (Figura 17). As sequências obtidas demonstram uma menor ocorrência de variações (Figura 18). Com base nos gráficos de HRM foi possível identificar os indivíduos 24, 27, 38, 40 e 45 como variantes. Há uma concentração das variações presentes na posição 108 das sequências. As exclusões através da análise das distorções do HRM foram compatíveis com a presença de alterações nas sequências obtidas.

Figura 17 – Perfis HRM para região C4



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região codificante 4 para os indivíduos 2, 4, 23, 24, 27, 38, 40 e 45. DNacc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 18 – Alinhamento das sequências para região C4

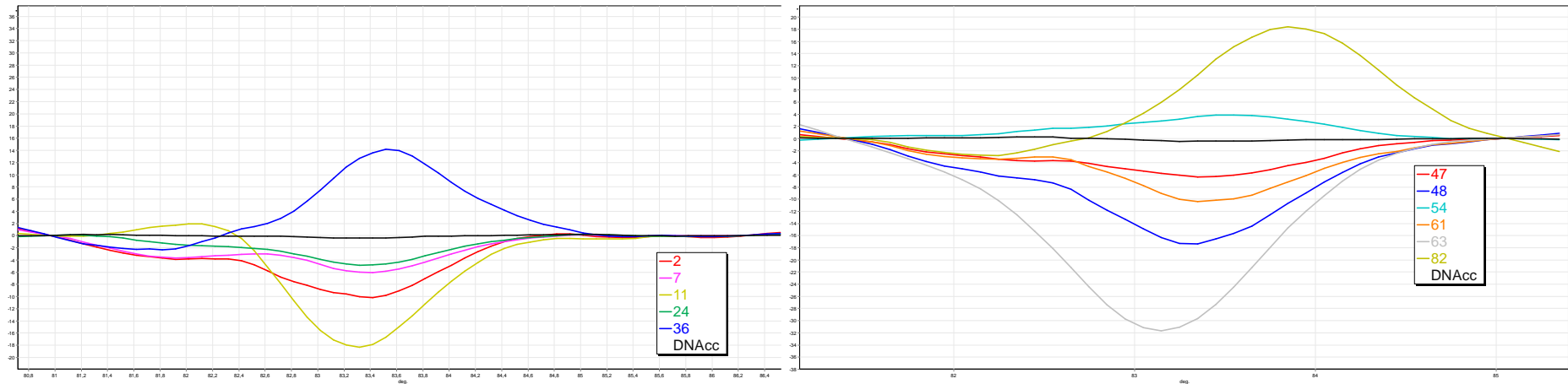


Legenda: Alinhamento das sequências amplificadas com o primer C4-f para os indivíduos selecionados. As barras pretas representam a frequência da sequência consenso, presente na parte inferior da figura. Imagem obtida e editada da ferramenta Clustal Omega 1.2.1. Y= C, T.

4.5.5 Avaliação do perfil HRM de NC

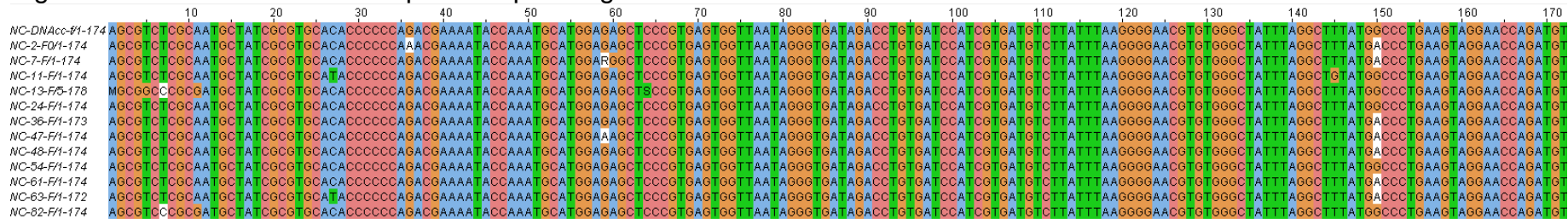
A região NC, por estar situada em parte na região hiper-variável 2, apresenta uma maior quantidade de variantes no HRM (Figura 19) em comparação com os alvos de regiões codificantes. As variações encontradas foram, amostra 2 (36G/A; 150G/A), 7 (59R; 150G/A; 60A/G), 11 (27C/T; 145T/G), 13 (10 nucleotídeos iniciais; 64S), 36, 48, 61 (150G/A), 47 (59G/A; 150G/A) e 63 (27A/T; 150G/A). O resultado do sequenciamento (Figura 20) demonstrou grande frequência de variações na posição 150. Sete das 15 amostras (46%) sequenciadas apresentam uma variação de G para A nesta posição. Baseado nos gráficos de HRM caracterizam-se como variantes os indivíduos 11, 36, 82 e 83. As amostras 24 e 54 não tiveram alterações no sequenciamento em comparação ao DNA padrão. As exclusões através da análise das distorções do HRM foram compatíveis com a presença de alterações nas sequências obtidas.

Figura 19 – Perfis HRM para região NC



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR da região não codificante para os indivíduos 2, 7, 11, 24, 36, 47, 45, 54, 61, 63 e 82. DNAcc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 20 – Alinhamento das seqüências para região NC



Consensus
 AGCGTCTCGCAATGCTATCGCGTGCACACCCCCAGACGAAAAATACCAAAATGCATGGAGAGCTCCCGTGAGTGGTTAATAGGGTGATAGACCTGTGATCCATCGTGATGCTTTAATTAAGGGGAACGTTGGGCTATTTAGGCTTTATGACCCCTGAAGTAGGAACCAAGATGT

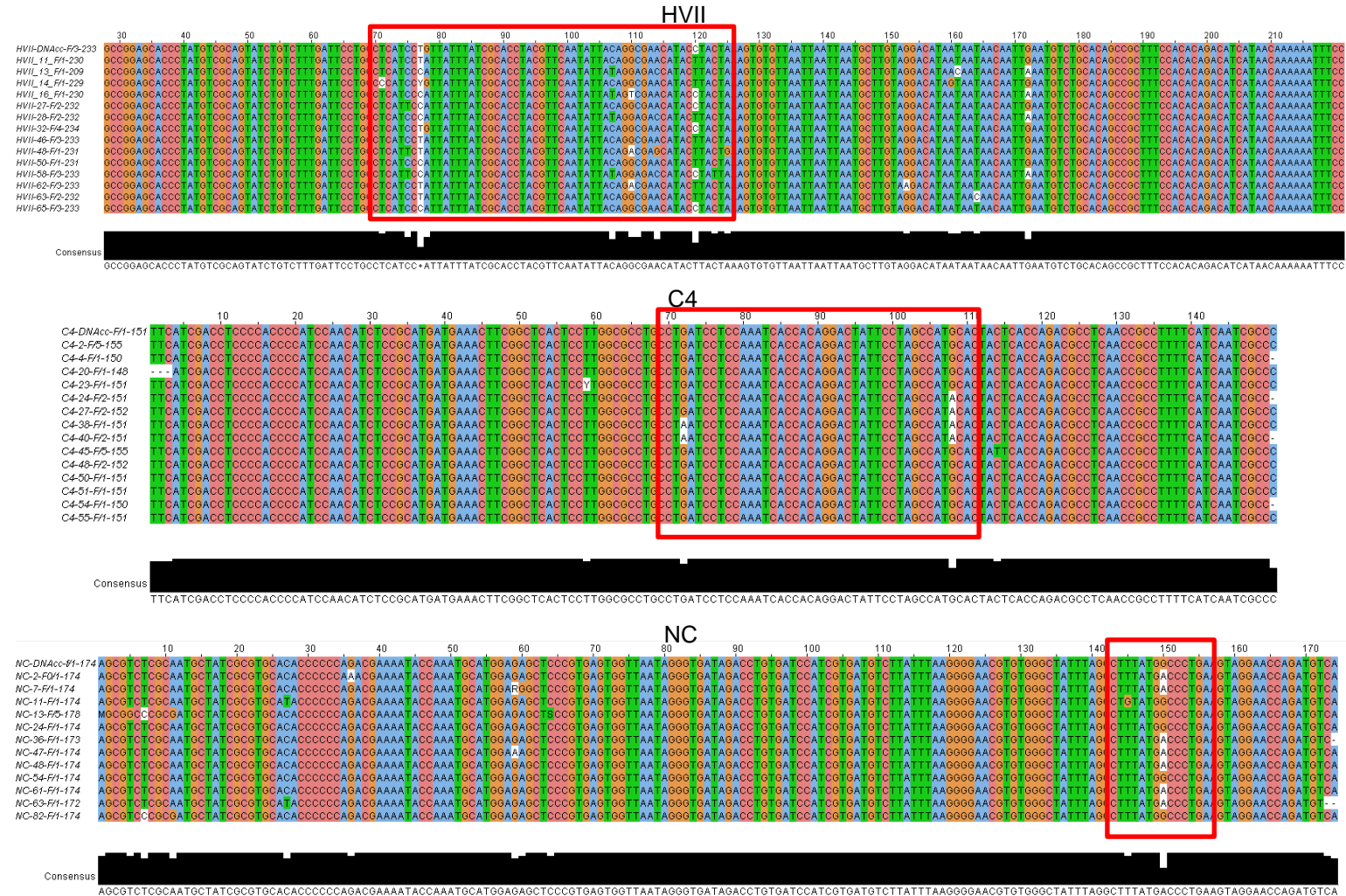
Legenda: Alinhamento das seqüências amplificadas com o primer NC-F para os indivíduos selecionados. As barras pretas representam a frequência da seqüência consenso, presente na parte inferior da figura. Imagem obtida e editada da ferramenta Clustal Omega 1.2.1. R= A, G; S= C, G.

O perfil de HRM de algumas amostras apresentou níveis de distorções discretos, que impossibilitam sua determinação como variante ou semelhante ao padrão. Com isso, foi adotada a estratégia de reduzir o tamanho dos produtos analisados no HRM.

4.6 Determinação de perfis de HRM utilizando produtos menores de PCR

Para aumentar a sensibilidade da análise de HRM foram utilizados primers secundários que flanqueiam regiões com concentração de variações e geram produtos de amplificação mais curtos (Figura 21), variando de 51 a 110 pares de bases. Desta forma, obtém-se uma maior discrepância entre sequências semelhantes e distintas em relação ao padrão, facilitando a caracterização dos indivíduos.

Figura 21 – Regiões amplificadas pelos primers secundários para os locais HVII, C4 e NC

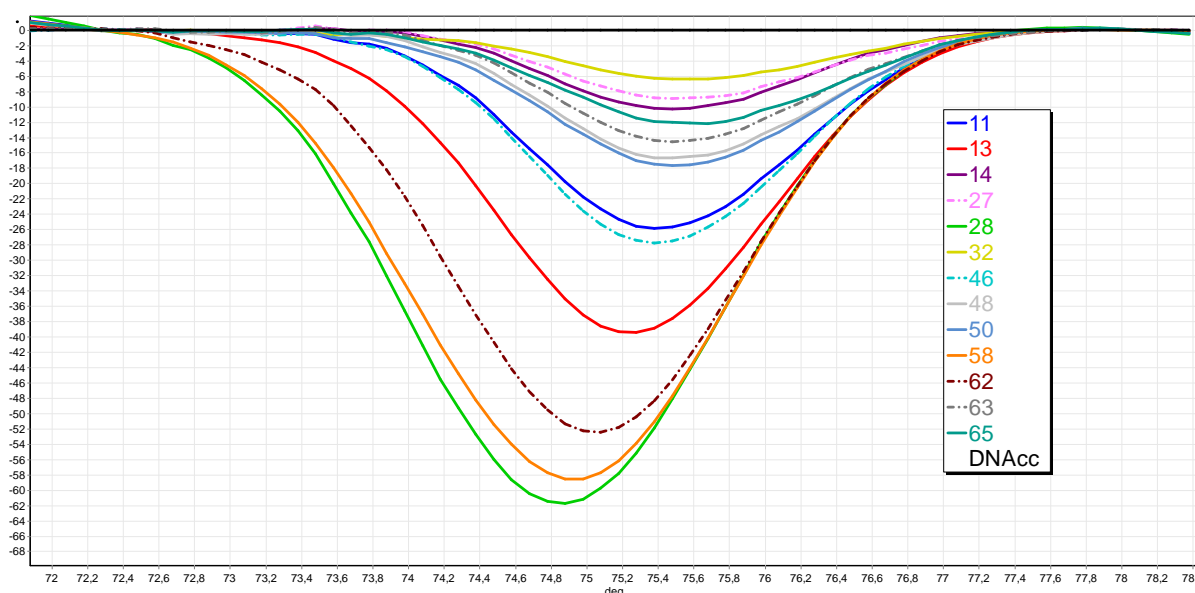


Legenda: Alinhamentos das seqüências dos alvos HVII, C4 e NC com demarcações para as regiões amplificadas pelos primers secundários em cada um dos locais. Imagem obtida e editada da ferramenta Clustal Omega 1.2.1.

4.6.1 Avaliação de 110 pb do HVII

Para esta região o produto da PCR foi reduzido de 242 para 110 pares de bases. A partir dos perfis obtidos (Figura 22), pode-se caracterizar como variantes os indivíduos 11, 13, 28, 46, 58 e 62. As distorções detectadas no HRM dos produtos reduzidos foram compatíveis com as variações presentes nas sequências obtidas para os indivíduos selecionados.

Figura 22 – Perfis de HRM para a região HVII com primers secundários

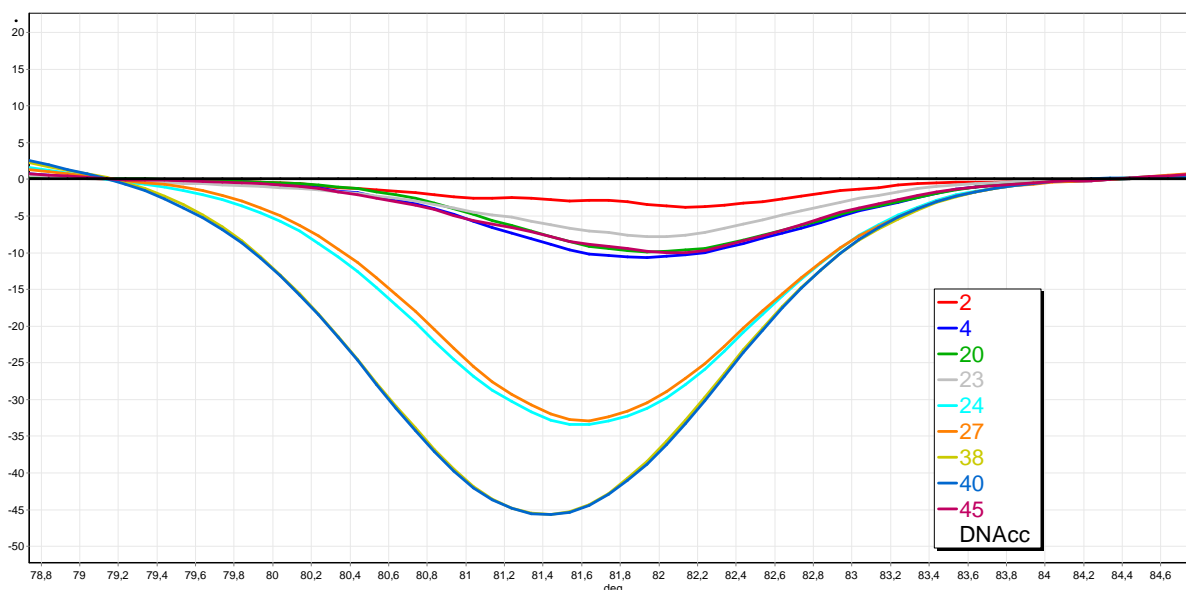


Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR reduzido da região hiper-variável I para os indivíduos 11, 13, 14, 27, 28, 32, 45, 48, 50, 58, 62, 63 e 65. DNAcc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.6.2 Avaliação de 86 pb do C4

A redução do produto amplificado para esta região foi de 202 para 86 pares de bases. A partir dos perfis obtidos (Figura 23), os indivíduos 24, 27, 38 e 40 foram classificados como variantes em relação ao padrão. As distorções detectadas no HRM dos produtos reduzidos foram compatíveis com as variações presentes nas sequências obtidas para os indivíduos selecionados.

Figura 23 - Perfis de HRM para a região C4 com primers secundários

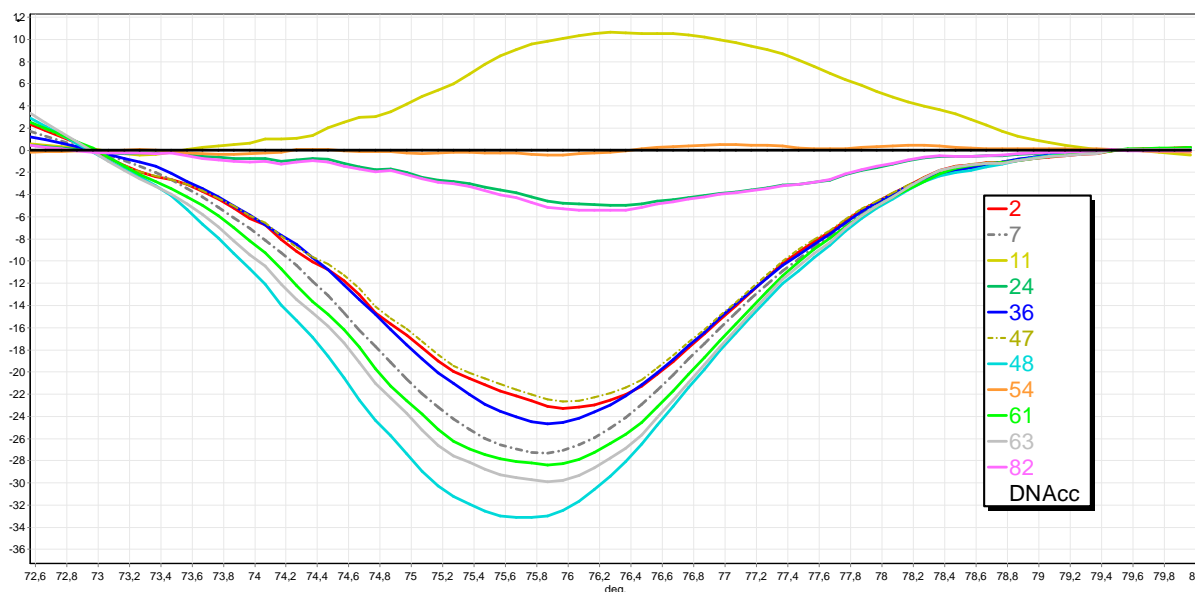


Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR reduzido da região codificante 4 para os indivíduos 2, 4, 20, 23, 24, 27, 38, 40 e 45. DNAcc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.6.3 Avaliação de 51 bp do NC

A região NC sofreu a maior redução no tamanho do produto de PCR, de 222 para 51 pares de bases. Com os novos primers é possível caracterizar como variantes os indivíduos 2, 11, 36, 47, 48, 61 e 63 (Figura 24). Mais especificamente, houve a formação de três grupos que foram identificados mais nitidamente do que utilizando primers maiores, estes foram compostos por: não variantes amostras 2, 4, 20, 23 e 45; grupo variante 2 composto pelas amostras 24 e 27 e grupo variante 3 representado por 38 e 40. As distorções detectadas no HRM dos produtos reduzidos foram compatíveis com as variações presentes nas sequências obtidas para os indivíduos selecionados. A utilização de produtos menores aumentou as discrepâncias nos gráficos de HRM facilitando a caracterização dos indivíduos para os três locais: HVII, C4 e NC.

Figura 24 - Perfis de HRM para a região NC com primers secundários



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraído a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) do produto da PCR reduzido da região não codificante para os indivíduos 2, 7, 11, 24, 36, 47, 48, 54, 61, 63 e 82. DNAcc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

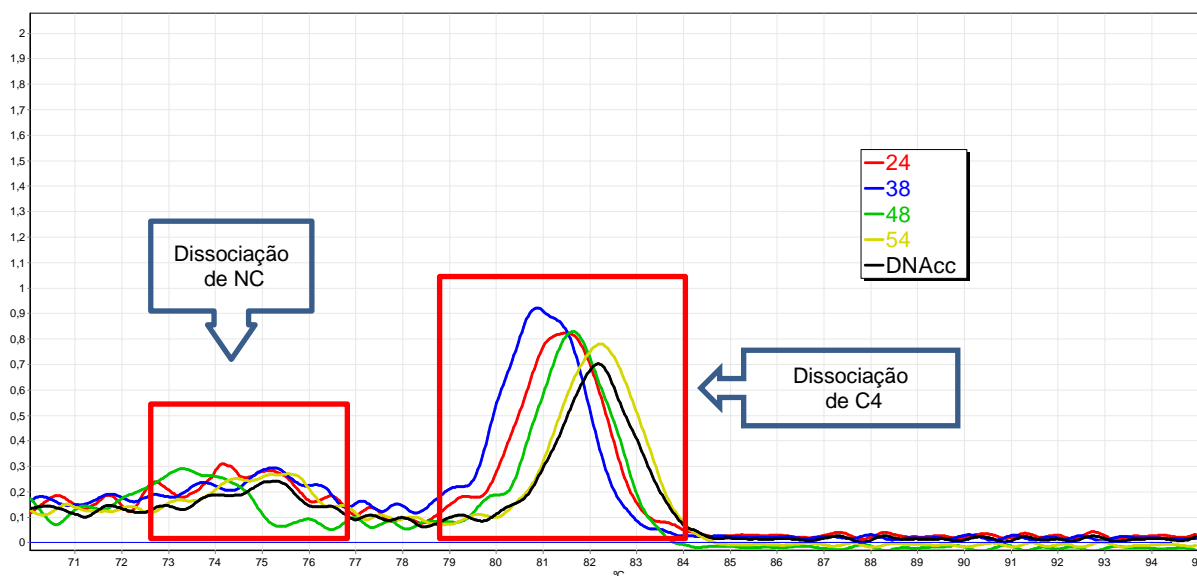
4.7 Reações duplex para HRM

Uma vez que as temperaturas de dissociação de dois alvos sejam suficientemente diferentes pôde-se fazer a análise de dissociação em alta resolução para estes alvos em uma única reação (duplex). Com isso, foram montadas duas reações duplex utilizando um par de primers com produto maior e um par de primers secundários com produto reduzido: C4/NC e C2/HVII.

4.7.1 Duplex C4/NC

Para este duplex foram utilizados os primers para o produto de 202 pares de bases de C4 e primers para o produto reduzido de 51 pares de bases de NC. O gráfico de dissociação (Figura 25) demonstra que houve amplificação preferencial para o produto de C4.

Figura 25 – Dissociação para a reação duplex C4/NC

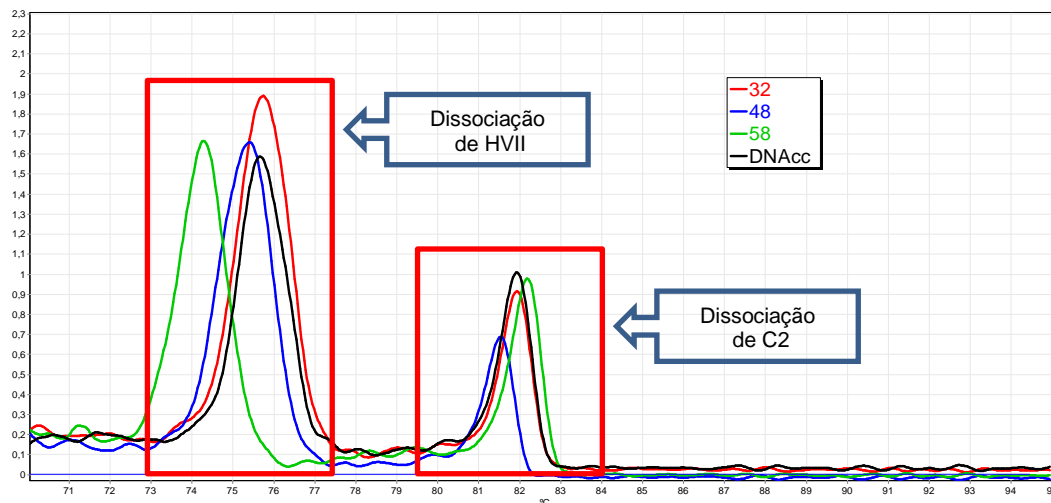


Legenda: Gráfico da dissociação dos produtos da PCR com os primers para o alvo de 202 pb de C4 e 51 pb de NC dos indivíduos 24, 38, 48 e 54. DNAcc: DNA de células MD-MBA-231. Eixo Y: razão da derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT). Eixo X: variação de temperatura em graus Celsius (°C). Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

4.7.2 Duplex C2/HVII

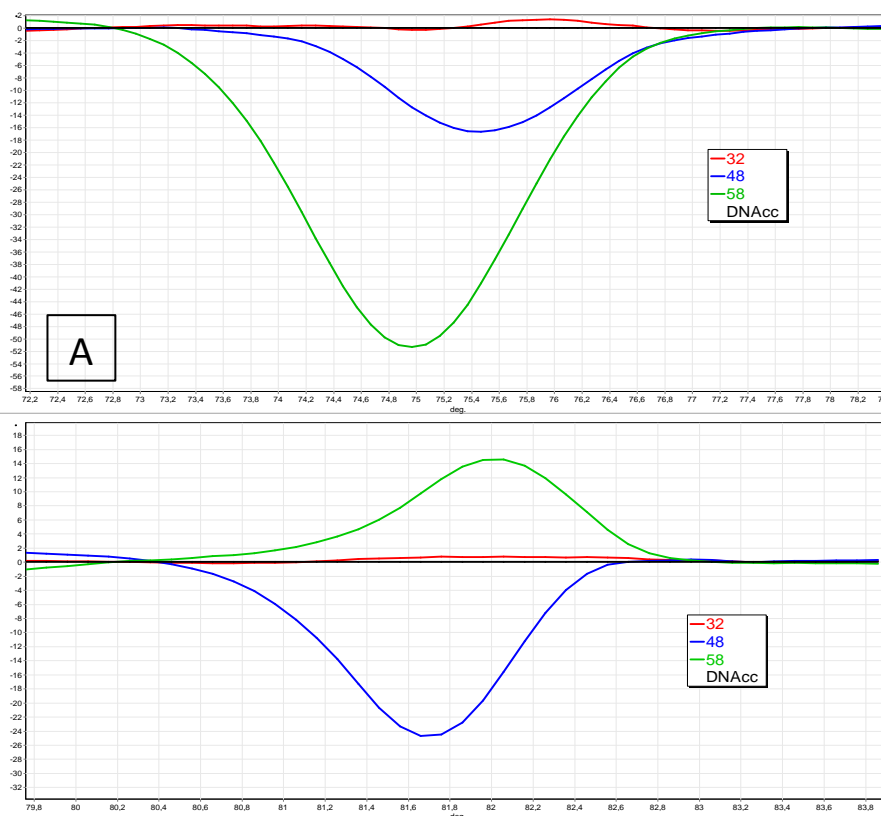
A reação duplex foi montada com os primers para o produto de 228 pares de bases de C2 e os primers para o produto reduzido de 110 pares de bases do local HVII. O gráfico de dissociação demonstra que houve amplificação dos dois alvos (Figura 26). No entanto, o produto de HVII alcançou níveis um pouco mais altos de variação de fluorescência, indicando maior eficiência de amplificação em relação a C2. Selecionando a região de dissociação para cada alvo foi possível gerar o gráfico diferencial para cada uma das regiões separadamente (Figura 27). Os perfis de HRM obtidos para os indivíduos selecionados nas reações duplex mantiveram os mesmos formatos apresentados em reações isoladas para o local HVII.

Figura 26 – Dissociação para a reação duplex C2/HVII



Legenda: Gráfico da dissociação dos produtos da PCR com os primers para o alvo de 228 pb de C2 e 110 pb de HVII dos indivíduos 32, 48 e 58. DNacc: DNA de células MD-MBA-231. Eixo Y: razão da derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT). Eixo X: variação de temperatura em graus Celsius (°C). Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

Figura 27 - Perfis de HRM para o duplex C2/HVII



Legenda: Curvas de dissociação representadas pela variação da fluorescência normalizada subtraída a referência (eixo Y) pela variação de temperatura (eixo X) (A) – do produto da PCR de HVII de 110 pb para os indivíduos 32, 48 e 58 e (B) – do produto da PCR de C2 de 228 pb para os indivíduos 32, 48 e 58. DNacc: DNA de células MD-MBA-231. Imagem obtida e editada do software Rotor Gene Tee Chart Editor (Qiagen).

5 DISCUSSÃO

Com advento da biologia molecular a prática de identificação humana tornou-se rotina na determinação de paternidade, parentesco e, em especial, na forense criminal. Tal fato, só foi possível com a criação de técnicas próprias e direcionadas a amplificação e caracterização de sequências de DNA que permitiria a identificação do suspeito e/ou indivíduo. As metodologias evoluíram a partir da primeira proposta descrita por Alec Jeffreys em 1985 que demonstrou que utilizando regiões repetitivas no DNA poderia identificar indivíduos. Como mencionado, a rotina das práticas forenses vem aumentando em uma escala grandiosa o que tem incentivado a busca por metodologias mais modernas, mais rápidas, de baixo custo e com a mesma especificidade das rotinas convencionais já existentes. Diante disso, neste trabalho buscou-se avaliar alternativas para a prática forense, de encontro as necessidades atuais descritas, com foco na metodologia de dissociação de DNA em alta resolução, também conhecida pela sigla HRM.

Para uma análise de HRM é recomendável utilizar DNAs extraídos com o mesmo protocolo para evitar interferências vindas dos reagentes utilizados na extração do DNA. No entanto, a rotina forense utiliza protocolos muito variados para a extração de DNA, dependendo do material biológico e estado de conservação das evidências criminais. A averiguação de que os principais protocolos utilizados não afetam de forma significativa o perfil de HRM de uma amostra, traz a possibilidade de se utilizar qualquer método de extração em uma análise, independente da fonte de DNA extraído. Em um hipotético caso forense, poderiam ser analisadas por HRM amostras de DNA extraídas de manchas de sangue, swabes de superfícies, fragmentos de ossos e referências de vítimas e suspeitos, por exemplo. A partir dessas observações, nossos resultados indicam que não há interferência no perfil de dissociação do DNA nos vários métodos de extração testados. Sendo assim, sugere-se que o método de HRM pode ser utilizado sem prejuízo, independente do protocolo utilizado na extração do DNA.

De acordo com a fabricante do reagente de HRM utilizado deve-se manter as concentrações de DNA das amostras usadas na análise de HRM aproximadas (Type-it[®] HRM[™] PCR Handbook). É recomendado que a diferença de C_T seja inferior a 3 ciclos de reação. Esta exigência é um empecilho na rotina forense, uma

vez que muitas vezes as amostras são exíguas ou com interferentes que impossibilitam a quantificação precisa da concentração de DNA. Entretanto, o resultado obtido variando a quantidade de DNA introduzido na reação de PCR demonstrou que diferenças de quantidade de DNA até a ordem de 100 vezes não alteram o perfil de HRM obtido para uma amostra. Este resultado foi condizente com o obtido por Nicklas e colaboradores, os quais demonstraram que, mesmo diluindo o DNA em uma razão de 1/512, para serem usados em reações de PCR, os perfis de HRM obtidos não sofreram alterações (Nicklas et al. 2012). Sendo assim, técnicas que forneçam apenas uma estimativa da concentração de DNA (espectrofotometria, por exemplo) podem ser empregadas para a quantificação de amostras a serem utilizadas na análise de HRM.

Como muitas vezes algumas amostras biológicas das quais são extraídas DNA para prática forense encontram-se em estado crítico de conservação, nossas análises foram direcionadas a amplificação de DNA mitocondrial. Assim, seria possível aplicar o método de HRM também em amostras biológicas mal conservadas, que dificilmente poderiam ser testadas nos protocolos convencionais forenses. Embora não tenha sido possível testar o método de HRM em amostras biológicas mal conservadas, há trabalhos que utilizam o método de digestão de DNA para simular um estado de degradação (Nicklas et al. 2012). O experimento com digestão de DNA total demonstrou um resultado compatível com as características dos DNA nuclear e mitocondrial. Estando presente em apenas uma cópia por célula, DNA autossômico é mais susceptível a ação de endonucleases. . Após 1 minuto de ação de DNase, o DNA autossômico já alcançou um estágio de degradação que impossibilitou a amplificação de um fragmento de DNA de 224 pares de bases, utilizando par de primers para amplificação de parte do gene *B-RAF*. Entretanto, o DNA mitocondrial, presente em grande número de cópias por célula e de formato circular, possibilitou a obtenção de produtos de PCR mesmo após ação prolongada da DNase. Para amostras em avançado grau de degradação esta estratégia, adotando alvos mitocondriais, se mostra vantajosa e possibilita a geração de informações úteis em uma análise forense. Diante disso, o incentivo a criação e padronização das metodologias que tem como alvo o DNA mitocondrial podem ser bastante úteis na rotina forense.

Tendo como alternativa à amplificação de STR em DNA genômico, buscou-se avaliar os perfis de dissociação em alta resolução dos produtos da PCR, de trechos

variáveis e não variáveis do DNA mitocondrial, comparativamente as sequências de DNA. Para as regiões HVI e HVII, foram obtidos perfis de HRM muito variados condizente ao alto grau de variabilidade destas regiões. A maior parte das variações observadas foram alterações de A/G, que causam variação de 0,5 °C no T_m dos fragmentos de DNA. No entanto, devido ao grande tamanho do fragmento amplificado estas variações não se converteram eficientemente em distorções nos perfis de HRM. Amostras com o mesmo número de variações A/G apresentam distanciamentos diferentes em relação ao padrão no gráfico de HRM. Mesmo assim, este local amplificado se mostrou útil, pois amostras sem variações no DNA tiveram perfis de HRM próximos ao padrão de DNA na análise de HRM. O sequenciamento da região HVI demonstrou que, apesar de uma concentração em certas posições (44, 77 e 166), as alterações estão presentes ao longo de toda região amplificada. Apesar de ser uma região de difícil análise por HRM, devido ao alto grau de variação, nossos resultados sugerem que seria possível identificar, ou melhor, excluir suspeitos, ao se interpretar a curva de dissociação gerada por HRM, uma vez que sequências de DNA que apresentam as mesmas variações são semelhantes em seus perfis. Entretanto, melhor seria se buscássemos avaliar trechos de DNA mitocondrial mais conservado para aumentar o poder de discriminação da metodologia.

A presença de dois domínios de dissociação na região HVII prejudicou a análise de HRM, uma vez que é necessário aumentar o intervalo entre as regiões normalizadoras na montagem do gráfico diferencial. Isto acarreta uma perda na sensibilidade da análise, sendo necessário um maior número de alterações ou alterações que causem distorções mais acentuadas para que o perfil do HRM de uma amostra se distancie de forma significativa do padrão no gráfico diferencial. Mesmo assim, 9 de 14 amostras representadas puderam ser caracterizadas como diferentes do padrão. A amostra 32, cuja sequência não apresenta alterações apresentou perfil de HRM próximo ao padrão, demonstrando a capacidade da técnica de diferenciar amostras variantes e semelhantes ao padrão. Para a região HVII observou-se a concentração das variações em três posições (77, 120 e 172), com predominância de alterações C/T e G/A, que acarretam alteração de 0,5 °C no T_m dos fragmentos de DNA. Embora os dois domínios de dissociação dessa região prejudique a análise por HRM, poderia restringir a amplificação somente a um dos

domínios de dissociação o que poderia aumentar a sensibilidade para identificação utilizando os perfis de HRM.

O menor número de variantes para a região C2 foi condizente com as sequências obtidas, as quais apresentaram 16 alterações ao todo. Os indivíduos 35 e 36 possuem sequências semelhantes, mas apresentaram graus de distorções diferentes no gráfico de HRM. Isto pode ser devido a alterações presentes nas extremidades dos produtos de PCR, não detectados pela técnica de sequenciamento. Apenas amostras com variação de C/T (44 e 58) na posição 173 apresentaram inversão da inflexão da curva de HRM. Para este local predominaram variações C/T. Diferentemente das regiões hipervariáveis, na região codificante, que é mais conservada, os resultados dos perfis de HRM foram mais condizentes com as alterações encontradas através do sequenciamento.

O local C4 possui o menor número de variações observadas nas sequências. A quase totalidade de alterações é do tipo G/A. A distorção intermediária do perfil de HRM do indivíduo 4 é reflexo da sensibilidade reduzida na análise de HRM de fragmentos de 200 pares de bases. No entanto, os perfis mais discrepantes para os indivíduos 38 e 40 em relação aos indivíduos 24 e 27 são reflexos da presença de 2 alterações G/A nos dois primeiros e de apenas uma alteração do mesmo tipo nos dois últimos indivíduos. Diante dos resultados, estratégias futuras poderiam focar as análises em regiões mais conservadas do DNA mitocondrial para identificação por HRM.

As alterações presentes nas sequências para o produto do local NC não se refletiram em distorções significativas em todos os indivíduos analisados. Esta baixa sensibilidade pode ser devida ao tamanho do produto. Nas sequências analisadas, pôde-se observar uma alta taxa de variações, aproximadamente 50%, G/A na posição 150. Entretanto, uma abordagem com maior número de indivíduos na população poderia revelar se realmente esta frequência de 50% corresponde a nossa população. Essa percentual de variação, 150G/A, em aproximadamente 50% dos indivíduos mostrou-se interessante ao passo que amplificar estritamente este trecho do DNA mitocondrial poderia dar a identificação/exclusão de metade dos indivíduos analisados.

Gudrun e Wittwer demonstraram que a redução no tamanho do produto de PCR analisado no HRM traz um aumento na sensibilidade da técnica (Gudrun & Wittwer et al. 2004). Esta estratégia foi adotada para locais que possuem posições

com alto índice de variação circundadas por regiões conservadas. A redução de tamanho dos produtos analisados trouxe um aumento na sensibilidade, gerando perfis de HRM que se aproximam ou se afastam mais do padrão para os três locais onde esta estratégia foi adotada. Para o local C4 pode-se distinguir mais claramente os perfis que se aproximam do padrão e os discrepantes. Além disso, dois padrões de variação podem ser observados: 24 e 27, que possuem uma variação G/A e 38 e 40, com duas alterações G/A. No local NC a amostra 11 se destaca com inflexão invertida em relação aos demais indivíduos. A causa pode ser a presença de uma alteração T/G na posição 145 exclusiva para este indivíduo. Dois grupos de perfis de HRM se diferenciam neste local: um grupo sem alterações que se aproxima do padrão e outro com alteração G/A na posição 150. Esta diferenciação não é tão evidente quando se analisa o produto de 222 pares de bases. Em uma abordagem de HRM para obtenção de perfis de dissociação de DNA e identificação humana deve-se buscar amplificação de pequenos trechos de DNA a fim de aumentar a resolução e confiabilidade nas análises.

Para o nosso caso, só foi possível a combinação de dois trechos, uma vez que alguns produtos da PCR possuem picos de dissociação muito próximos ou iguais, o que impediria a análise em reações multiplex. Diante disso, foi possível realizar reações duplex combinado C4/NC e C2/HVII.

No gráfico de dissociação para o duplex C4/NC observa-se uma discreta variação de fluorescência na faixa de temperatura de dissociação de NC. A fim de se obter uma amplificação conjunta dos dois produtos pode-se reduzir a quantidade de primers para o local C4 ou aumentar a quantidade de primers para o local NC.

O duplex C2/HVII requer um leve ajuste no equilíbrio da quantidade de produto gerado para os dois locais. No entanto, já foi possível realizar análise de HRM para ambos os locais. As amostras mantiveram seus perfis semelhantes ou discrepantes observados em análises feitas a partir de produtos gerados isoladamente.

Alguns trabalhos foram publicados usando análise de HRM para a determinação de perfis genéticos de STRs autossômicos (French et al. 2008; Gale et al. 2008 e Nicklas et al. 2012). No entanto, foi demonstrado que nem todos os alelos puderam ser diferenciados por HRM. Outro fator prejudicial é a amplificação de dois alelos, característica que dificulta a análise dos resultados. Sendo assim, a utilização

de HRM de STRs autossômicos em metodologias que visam a completa discriminação de indivíduos não demonstrou um poder de exclusão suficiente.

Gidlöf e colaboradores demonstraram que é possível a discriminação de indivíduos através da análise de HRM das regiões hiper-variáveis do DNA mitocondrial (Gidlöf et al. 2009). Na estratégia usada no presente estudo, a adição de locais situados na região codificante do genoma mitocondrial trouxe uma quantidade maior de dados analisáveis, aumentando o poder de discriminação e trazendo a possibilidade de montagem de reações duplex.

CONCLUSÃO

A técnica de HRM com alvos no DNA mitocondrial se mostrou confiável e robusta, permitindo a análise de amostras com concentrações diferentes entre si e em diversos estágios de degradação, quadros comuns na rotina forense.

Foi possível a identificação de indivíduos não relacionados com a referência comparativa adotada. Para algumas amostras as distorções apresentadas não foram suficientes para sua caracterização. No entanto, com a redução dos fragmentos analisados houve um ganho na sensibilidade e os perfis de HRM puderam ser resolvidos mais claramente. Vale destacar que a proposta deste trabalho é combinar a análise dos cinco alvos descritos, tarefa facilitada com o desenvolvimento de reações duplex. Desta forma, mesmo que um local não traga informação útil, a análise dos demais locais muito provavelmente trará a definição do perfil da amostra.

A metodologia de análise de HRM para alvos no DNA mitocondrial desenvolvida neste estudo não visa substituir a análise de STRs convencional na rotina forense. O propósito é justamente complementar esta rotina, permitindo uma triagem rápida e de baixo custo que identifique quais amostras possuem relação com o caso e qualidade suficiente para a posterior análise de STRs.

REFERÊNCIAS

- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290 (5806):457-465.
- Andréasson H., Nilsson M., Styrman H., et al. Forensic mitochondrial coding region analysis for increased discrimination using pyrosequencing technology. *Forensic Science International: Genetics*. 2007; 1: 35-43.
- Andrews R. M., Kubacka I., Chinnery P. F., et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23 (2): 147.
- Bowien B. e Dürre, P. *Nucleic Acids Isolation Methods*. 2003: 7-19. American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, California.
- Burgoyne L.A. Solid medium and method for DNA storage. *Patente Norte Americana*. 1996;5 496-562.
- Butler J. M. *Forensic Dna Typing: Biology, Technology, And Genetics Of STR Markers*. 2005. Elsevier, EUA.
- French D. J., Howard R. L., Gale N., et al. Interrogation of short tandem repeats using fluorescent probes and melting curve analysis: A step towards rapid DNA identity screening. *Forensic Science International. Genetics*. 2008; 2: 333-339.
- Gale N., French J. D., Howard R. L., et al. Rapid typing of STRs in the human genome by HyBeacon melting. *Org. Biomol. Chem*. 2008; 6: 4553-4559.
- Gidlöf O., Burvall S., Edvinsson L., et al. Complete discrimination of six individuals based on high-resolution melting of hypervariable regions I and II of the mitochondrial genome. *BioTechniques* 2009; 47:671-678.
- Gill p., Jeffreys A. J., Werrett D. J. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*. 1985; 318: 577 – 579.
- Goodwin W., Linacre A., Hadi S. *An Introduction to Forensic Genetics* 2007. [S.I.] John Wiley & Sons. 162 p.
- Gudrun H. R., Wittwer C. T. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry* 2004; 50 (10): 1748–1754.
- Hoong L. L., Lek K. C. Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. *As. Pac J. Mol. Biol. Biotechnology* 2005; 13 (2): 78-85.

Hu Q., Liu Y., Yi S. et al. A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 16C: 94-97.

Ioannis G., Christos B., Panagiotis M., et al. Barcode-DNA High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis as a novel close-tubed and accurate tool for olive oil forensic use. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012; E-pub. DOI: 10.1002/jfsa.6040.

Janice A. N., Noreault-Conti T., Buel E. Development of a Fast, Simple Profiling Method for Sample Screening Using High Resolution Melting (HRM) of STRs. *Journal of Forensic Sciences* 2012; 57 (2): 478-488.

Jobling M. A., Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 10:739-51.

Liew M., Pryor R., Palais R., et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin. Chem.* 2004; 50: 1156-1164.

Nicklas J. A., Noreault-Conti T., Buel E. Development of a Fast, Simple Profiling Method for Sample Screening Using High Resolution Melting (HRM) of STRs. *J. Forensic Sci.* 2012; 57. No. 2 doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01981.x.

Parson W., Parsons T.J., Scheithauer R., et al. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA D-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *International Journal of Legal Medicine* 1998; 111: 124-132.

Parsons T.J., Muniec D.S., Sullivan K., Woodyatt N., et al. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics* 1997; 15: 363-367.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-4.

Satoh, M. and Kuroiwa, T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research* 1991; 196: 137–140.

Scheffler I.E. *Mitochondria* 2007. 2nd Ed. Wiley-Liss, Nova Iorque. 492 p.

Smith G. D., Chadwick B. E., Willmore-Payne C., et al. Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilizing high-resolution melting amplicon analysis. *J. Clin. Pathol.* 2008; 61: 487-493.

Wittwer C. T., Reed G. H., Gundry C. N., et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 2003; 49(6 Pt 1): 853-860.

Wojdacz T.K., Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: e41.

APÊNDICE – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

CASO: _____ - _____ - _____ LAUDO: _____ / _____
 Órgão Solicitante: _____ C.I./Ofício: _____
 Código da Amostra _____ Proced. /RO/ IP / Proc: _____
 Nome: _____
 Nome da Vítima: _____
 Relação com o Caso: _____ R.G: _____
 CPF: _____ Sexo: () M () F
 Data de Expedição: ____ / ____ / ____ Órgão Expedidor: _____
 Natural de: _____ Data de Nascimento: ____ / ____ / ____
 Filiação: _____

Estado Civil: _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____
 Cidade: _____ CEP: _____
 Telefone: () _____ Celular: () _____
 Origem Paterna: _____ Origem Materna: _____

Há parentesco entre os envolvidos? () sim () não. De que tipo? _____
 Realizou transplante de medula ou recebeu transfusão de sangue nos últimos 3 meses?
 () Sim () Não
 Tem irmão gêmeo idêntico (univitelínico)? () Sim () Não
 Responsável pelo cadastramento: _____
 Tipo de amostra: _____ Quantidade: _____
 Responsável pela coleta : _____

Autoridade ou Agente que acompanhou a coleta _____

Considerando os princípios elencados na Constituição da República Federativa do Brasil, promulgada em 05 de outubro de 1988 e atendendo ao que refere o artigo 5º e seus incisos, eu,.....

....., supra identificado, concordo de **livre e espontânea vontade** a submeter-me a coleta de material biológico, com a finalidade de realizar exame de Investigação de Vínculo Genético junto ao IPPGF / DPTC da PCERJ, assumindo a responsabilidade por qualquer consequência advinda desta prática. Declaro, ainda, que concordo que uma amostra de meu material genético seja usada em pesquisa científica, como alíquota anônima. As informações contidas neste documento são verdadeiras.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 2011.

Assinatura: _____

Doador