

## APLICAÇÃO DE MINI-STRS NON-CODIS NA CASUÍSTICA FORENSE

C. A. Barbosa\*, R.A Faria \*, M. Malaghini\*\* e K. A. Nogozyky\*\*

\*Engenharia Biomédica/ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

\*\*Laboratório de Genética Molecular Forense/Instituto de Criminalística do Paraná, Curitiba, Brasil.

carlos.barbosa@policiacientifica.pr.gov.br

**Resumo:** A identificação humana através da genotipagem de regiões específicas do DNA, se tornou a mais importante ferramenta para a ciência forense. Entretanto, em muitas situações, a amostra disponível está prejudicada, inviabilizando a recuperação da informação genética intacta. Marcadores genômicos específicos, como os mini-STRs, são utilizados para a obtenção do perfil genético dessas amostras, por terem maior especificidade. Neste trabalho, a eficiência de marcadores mini-STRs non-CODIS será avaliada em comparação com os kits STRs comerciais. Amostras de casos reais foram submetidas a extração orgânica e inorgânica, e posterior amplificação por PCR, com o uso de sistemas comerciais e incorporação de marcadores mini-STRs. Os resultados demonstram recuperação completa da informação genética de amostras degradadas, quando utilizados junto com os STRs comerciais e marcadores non-CODIS.

**Palavras chave:** DNA degradado, mini-STR, ciências forenses, CODIS.

**Abstract:** *Human identification through genotyping performed in specific regions of DNA has become the most important tool for forensic science. However, in many situations, available in a DNA sample is not detrimental for the recovery of intact genetic information contained therein. Genome specific markers, such as mini-STRs, are used to obtain the genetic profile in degraded samples, because they have higher specificity. In this paper, the efficiency of mini-STRs marker non-CODIS will be evaluated in comparison to the commercial kit Strs Samples of actual cases, were submitted to organic and inorganic extraction, with subsequent PCR amplification with the use of commercial systems and incorporation of mini-STRs markers. The results demonstrate the complete recovery of genetic information from degraded samples, when are used with STRs commercial and non-CODIS markers.*

**Keywords:** *DNA degraded, mini-STR, forensic science, CODIS.*

### Introdução

Os grandes avanços das ciências forenses iniciaram em meados da década de 80, quando o geneticista inglês, Alec Jeffreys demonstrou que sondas multilocais eram capazes de reconhecer simultaneamente diversas regiões variáveis do DNA, compostas por conjuntos de nucleotídeos que se repetiam sequencialmente [1]. Tais seções de repetição diferem-se de indivíduo para

indivíduo, possibilitando assim, usa-las como bases para a identificação por métodos moleculares [2].

A determinação de identidade genética pelo DNA permite demonstrar a culpabilidade dos criminosos, inocentar acusados erroneamente, identificar corpos em desastres em massa, determinar paternidade, além de elucidar trocas de bebês em berçários [3].

As regiões repetitivas do DNA, que contém de 2 a 7 unidades de nucleotídeos de comprimento, são chamadas de repetições curtas em conjunto (STRs - *short tandem repeats*), microssatélites, ou sequências repetitivas simples (SSRs) [4].

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação do DNA *in vitro*, utilizando-se reações enzimáticas canalizadas pela polimerase, uma enzima termoestável. A amplificação simultânea de vários loci STRs em uma reação única, ou multiplex, é realizada empregando-se iniciadores de reação, marcados com fluoróforos de comprimento de onda distintos, de modo a permitir a sobreposição de marcadores com faixa de tamanhos semelhantes. A amplificação de múltiplos loci em reações multiplex permite aliar as vantagens de alcançar um elevado poder de discriminação com baixo consumo de amostra e rapidez de análise [5].

Há conjuntos comerciais próprios para amplificação simultânea de 15 ou mais diferentes loci STRs, em uma única reação de amplificação. Os produtos de PCR resultantes desta amplificação possuem, em geral, de 100 a 450 pares de base de comprimento.

Entretanto, em várias situações, a obtenção de DNA é comprometida, prejudicando possíveis investigações. A viabilidade da amostra pode ser prejudicada pela quantidade limitante de material biológico e/ou pela presença de inibidores de amplificação.

Moléculas de DNA, quando expostas à água, ou calor por determinado tempo, podem iniciar processo de decomposição, fragmentando-se em segmentos curtos, devido à ação bacteriana, bioquímica, ou por processos oxidativos [6]. Este fato pode resultar em um perfil genético parcial, pela perda de alelos ou loci [7].

Um método cada vez mais utilizado para recuperar as informações de amostras de DNA fragmentado é reduzir o tamanho dos produtos de PCR [8]. A constatação de que produtos de PCR de tamanhos menores (denominados de mini-STRs) amplificam mais eficientemente as amostras de DNA degradado. Isto foi primeiramente reportado em 1995 [2].

A Figura 1 ilustra, esquematicamente, a diferença conceitual entre STRs convencionais e mini-STRs.

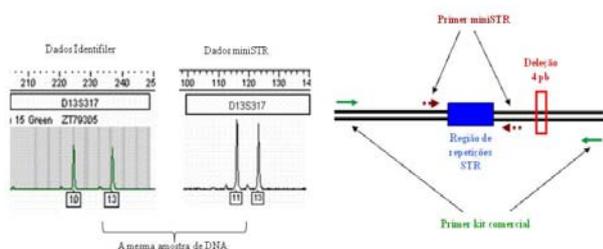


Figura 1 - Diferença da região de ligação dos *primers* de STRs e mini-STRs.

Fonte: Adaptado de Hill et al., 2006.

Por esta abordagem, os iniciadores de reação são projetados para anelar o mais próximo possível da sequência repetitiva, reduzindo o comprimento do produto final de amplificação, sem alterar o polimorfismo intrínseco do locus [9].

Marcadores mini-STRs possuem, classicamente, comprimento de até 150 nucleotídeos, podendo também, ser amplificada em reações únicas de PCR (multiplex). A aplicabilidade de mini-STRs aumenta a probabilidade de amostras degradadas serem genotipadas, proporcionando maior suporte estatístico em uma comparação genética [10].

Em 1995 foi implementado pelo Serviço de Ciência Forense (FSS - *Forensic Science Service*) da Inglaterra, uma rede integrada de banco de perfis genéticos de criminosos. Em 1997, a Polícia Federal Norte-americana (FBI - *Federal Bureau of Investigation*) desenvolveu o programa CODIS (*Combined DNA Index System*), sendo, atualmente, o principal sistema de gerenciamento de bancos de perfis genéticos empregados no mundo. A implementação do sistema CODIS em diversos países possibilitou a padronização dos marcadores genéticos de uso em análises forenses, por estabelecer a obrigatoriedade de análise de um grupo mínimo de 13 loci STRs (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11), distribuídos em diferentes cromossomos autossômicos [11].

Em Hill et al (2008), foram caracterizados 26 marcadores mini-STRs que não se integram ao CODIS, sendo chamados de marcadores NC (non-CODIS) [12].

Este projeto tem por objetivo implementar e analisar a eficiência de 9 mini-STRs non-CODIS (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D1S1677, D2S441, D4S2364, D20S482, D3S3053 e D6S474) na casuística forense do Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Estado do Paraná.

## Materiais e Métodos

Casos reais na rotina do Laboratório foram disponibilizados para a realização deste estudo, constituídos por amostras sanguíneas de familiares e amostras ósseas, denominadas padrão e evidência, respectivamente. As amostras foram submetidas ao processo de extração de ácido nucleico, com posterior amplificação por conjuntos comerciais Identifiler (*Applied Biosystems*), Profiler (*Applied Biosystems*) e

PowerPlex16 (*Promega*) e sistema *in-house* para amplificação de marcadores mini-STRs NCs, seguida de análise em equipamento automatizado de eletroforese capilar e detecção de fluorescência laser induzida em sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystem*), com posterior avaliação estatística de valor de prova.

## Extração de DNA

Manchas de sangue, provenientes de familiares para o confronto genético, coletadas em cartão FTA, que tem como princípio a lise celular e a imobilização do DNA presente, foram extraídas por método inorgânico. Fragmentos de 3 mm<sup>2</sup> da amostra foram incubados com 200 µl solução FTA reagente (*Wathman*) *overnight* para a eliminação de inibidores. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de solução chelex 5% (*Biorad*) e acondicionados em termobloco a 56°C e 105°C, conforme FBI Laboratory: PCR - *based typing protocols*.

As amostras ósseas foram submetidas ao processo de moagem criogênica. A extração foi realizada com 400 µl de tampão de extração de ossos (NaCl - Tris HCl 1M - EDTA 0,5M - SDS 20% e água ultrapura), 30 µl de proteinase K (*Invitrogen*) e 15 µl de DTT 1 M (*Sigma*) a incubação de 56°C *overnight*. A extração orgânica foi finalizada utilizando 300 µl de fenol-clorofórmio/álcool-isoamílico (*SIGMA*), na proporção de 25:24:1.

O sobrenadante foi purificado e concentrado através de microconcentradores YM-100 filtros (*Millipore*).

## Amplificação por PCR

Foram amplificadas 9 regiões mini-STRs distribuídos em 3 multiplex, as quais são denominadas NC1 (D10S1248, D14S1434 e D22S1045), NC2 (D1S1677, D2S441 e D4S2364) e NC3 (D20S482, D3S3053 e D6S474). Os iniciadores de reação foram sintetizados por Life Technologies baseados nas sequências publicadas [12].

As reações de amplificação constituem-se de 5,5 µl de mix de reação (Multiplex PCR Master Mix 2X, *Qiagen*), 2,2 µl de primer e 0,2 µl de Taq Gold (*Applied Biosystems*) adicionados a 3 µl da amostra extraída, totalizando 10 µl de volume final de reação.

A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) nas condições térmicas, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Condições térmicas.

Temperatura	Tempo
95°C - ativação da enzima	10'
30 ciclos	
94°C - desnaturação	1'
55°C - anelamento	1'
72°C - extensão	1'
60°C - extensão final	45'

Fonte: Modificado de Coble; Butler (2005).

### Detecção e análise de DNA

Alíquotas de 2 µl dos produtos de amplificação foram diluídos em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e 0,2 µl de GS Rox 500 (controle interno).

As amostras foram previamente desnaturadas e, em seguida, analisadas em sequenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), de acordo com protocolo do fabricante. Os dados obtidos da corrida eletroforética foram avaliados com os programas GeneMapper ID v 3.2, GeneScan 3.7 e Genotyper 3.7 (*Applied Biosystems*).

A base de dados de frequência alélica da população foi estabelecida de acordo com [13], através da qual foram realizadas as análises estatísticas [14].

### Resultados

Sete situações reais da casuística forense do Laboratório foram submetidas à análise complementar pelos mini-STRs non-CODIS, objeto desse trabalho. Para maior clareza, os casos foram classificados da seguinte forma: identificação de cadáveres, exame de paternidade com suposto pai falecido (reconstrução genética) e casos atípicos de paternidades.

Os índices de vínculo genético foram calculados pela razão entre duas hipóteses mutuamente excludentes, a saber: Hipótese I – o padrão de polimorfismo apresentado pela evidência apresenta vínculo genético com a amostra padrão; Hipótese II – o padrão de polimorfismo apresentado pela evidência é consequência do vínculo genético não do padrão e sim de outro indivíduo, não testado e não relacionado à evidência. Seu resultado indica quantas vezes mais provável é a Hipótese I do que a Hipótese II.

### Identificação de cadáveres

Quatro casos de identificação de cadáveres foram abordados pela análise de mini-STRs non-CODIS. O exame de registro 420.327-1 consistiu na identificação de cadáver carbonizado. A análise pelo sistema comercial PowerPlex16 revelou a presença de diversas incompatibilidades de origem paterna e apenas uma incompatibilidade materna (locus D21S11). O emprego de mini-STRs non-CODIS teve por objetivo a confirmação da presumível conclusão pela condição de exclusão vínculo entre evidência e genitores. Foram constatadas quatro incompatibilidades adicionais entre suposta mãe e evidência, especificamente nas regiões D10S1248, D22S1045, D2S441 e D6S474, excluindo, categoricamente, a possibilidade de vínculo parental em relação ao cadáver não identificado.

Os exames 415.331-2, 425.707-1 e 418.528-1 consistiram na identificação de cadáveres em elevado estado de degradação, os quais não foram passíveis de recuperação de perfil genético viável pelos sistemas comerciais ora disponíveis no LGMF, a saber, PowerPlex16, Identifiler e Profiler. Todos os casos citados foram satisfatoriamente analisados por meio de mini-STRs non-CODIS, permitindo o alcance de índices de parentesco de moderada (45,76 e 34,52, para os casos

418.528-1 e 415.331-2, respectivamente) e de elevada intensidade (613.010,55 para o caso 425.707-1).

### Reconstrução genética

Uma situação de reconhecimento de paternidade cível foi complementada pela análise de mini-STRs non-CODIS. O caso consistiu na reconstrução de perfil genético do suposto pai falecido por meio de duas filhas biológicas e a genitora destas. O objetivo do trabalho era pesquisar a presença de vínculo genético de paternidade entre o falecido e um indivíduo do sexo masculino, suposto meio irmão paterno das filhas biológicas incontestes. O Índice de Parentesco Cumulativo com emprego do sistema comercial Profiler (nove locus) foi de 53,70. O valor de prova aumentou significativamente com a utilização de nove mini-STRs non-CODIS para 10.117,91.

### Paternidades atípicas

Trata-se de três exames de paternidade cível, onde foi observada a presença de duas incompatibilidades entre suposto pai e filho. Como o número de inconsistências alélicas constatado é insuficiente para uma conclusão por exclusão de vínculo genético, foi necessário o emprego de marcadores genéticos adicionais. O exame 329.054, analisado pelo sistema comercial Identifiler (15 locus) apresentou incompatibilidades nas regiões D5S818 D16S539, que incorporadas ao cálculo de valor de prova, gerou um índice de verossimilhança de 377,73. O emprego de mini-STRs NCs permitiu a detecção de nove compatibilidades alélicas adicionais elevando o índice para 256.133,27, suportando fortemente a existência de vínculo genético entre suposto pai e filho.

No exame 313.984 foram verificadas inconsistências alélicas entre suposto pai e filho nas regiões VWA e D3S1358 em uma bateria inicial de 15 marcadores genéticos (sistema comercial Identifiler) gerando um índice de verossimilhança de apenas 46,22, o emprego de 06 locus adicionais pelos sistemas comerciais FFFL e PowerPlex16 elevou o índice a 21.009,14. 07 marcadores mini-STRS NCs adicionais permitiram o alcance de Índice de Parentesco Cumulativo 23.058.464,79, suportando fortemente, a existência de vínculo genético de paternidade.

O exame 335.867 apresentou incompatibilidades alélicas nas regiões TPOX e D2S1338, esta última pouco provável de ser atribuída a mutação pela grande diferença de tamanho entre alelo paterno obrigatório do filho e seus possíveis correspondentes no suposto pai. O Índice de Paternidade Cumulativo calculado foi de 6,34 e 527,96, com o emprego de 15 (sistema comercial Identifiler) e 17 marcadores STRs (acrescido do sistema comercial Powerplex16), respectivamente. Foi empregada também, análise complementar dezessete STRs de cromossomo Y (sistema comercial Yfiler), revelando total compatibilidade haplotípica entre suposto pai e filho, suportando a hipótese que ambos compartilhem a mesma patrilinhagem. O emprego

adicional de 5 mini-STRs autossômicos non-CODIS permitiu a constatação de uma terceira incompatibilidade alélica entre suposto pai e filho, permitindo a conclusão pela exclusão de vínculo entre ambos.

### Discussão

Os marcadores mini-STRs non-CODIS descritos e utilizados neste estudo mostraram ser eficientes na amplificação de DNA obtido de amostras em adiantado processo de degradação. Sua eficiência se deve ao fato de possuir um produto de amplificação de tamanho reduzido, menos suscetível, portanto, à fragmentação do genoma decorrente dos processos de decomposição de matéria orgânica. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram-se coerentes quando comparados aos dados obtidos por amplificação em conjuntos comerciais STRs.

Em algumas situações, o perfil genético contido nas evidências foi alcançado somente através da utilização dos marcadores mini-STRs non-CODIS. Os conjuntos comerciais STRs, quando aplicados na amplificação de amostras deterioradas, mostram com frequência, perda de alelos e/ou loci, podendo inviabilizar a obtenção de resultados conclusivos [9,10].

Este trabalho demonstrou também, a necessidade de marcadores adicionais, além dos atualmente disponíveis, especialmente em pesquisas de vínculos genéticos complexos, tais como situações em que o suposto pai está falecido ou ausente.

Há de ressaltar a importância de uma extensa bateria de marcadores disponíveis em uma unidade de rotina do porte do Laboratório de Genética Molecular Forense, para a resolução de situações atípicas de paternidade, tais como as estudadas neste trabalho. Para tal, os marcadores mini-STRs non-CODIS foram fundamentais, senão indispensáveis, para a efetiva conclusão diagnóstica. Salienta-se que, em um dos casos estudados foram evidenciados indícios significativos da existência de vínculo genético entre um parente consanguíneo próximo ao suposto pai em relação ao filho investigante. Situação esta entre as de manejo mais complexo em um laboratório de identificação humana forense, pela expressiva possibilidade de falsa inclusão de paternidade.

### Conclusão

Os marcadores mini-STRs non-CODIS usados nesse estudo foram eficientes na resolução de situações reais envolvendo a identificação de cadáveres, reconstrução genética e casos de paternidades atípicas.

O presente trabalho mostra viabilidade na implementação destes marcadores no Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Estado do Paraná.

### Referências

[1] JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, v.314, p.67-73, 1985.

- [2] BUTLER, J.M. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press, 2ª edição, p.2, 2005.
- [3] PENA, S. *Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA*. Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas, v. 20, p. 447 - 460, 2005.
- [4] BUTLER, J.M. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press, 2ª edição, p.85, 2005.
- [5] BUTLER, J.M. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*, v.43, p.ii-v, 2007.
- [6] BAR, W.; KRATZER, A.; MACHLER M.; SCHMID, W. Postmortem stability of DNA. *Forensic Science International*, v.39, n.1, 1988.
- [7] COBLE, M. D.; BUTLER, J. M. Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. *Journal Forensic Science*, v. 50, p.43-53, 2005.
- [8] MALAGHINI, M.; SCHNEIDER, V.; LEITE, F. Genetic analysis of 9 non-CODIS miniSTR loci in the Brazilian population of Parana. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2005.
- [9] OPEL, K.L.; CHUNG, D.T.; DR.BEK, J.; BUTLER, J.M; BRUCE R. MCCORD, B.R. Developmental validation of reduced-size STR miniplex primer sets. *Journal Forensic Science*, v. 52, n. 6, 2007.
- [10] GRUBWIESER, P.; MÜHLMANN, R.; BERGER, B.; NIEDERSTÄTTER, H.; PAVLIC, M.; PARSON, W. A new “miniSTR-multiplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *International Journal Leg Med*, v.120, 2006.
- [11] MORETTI, T. R.; BAUMSTARK, A. L.; DEFENBAUGH, D. A.; KEYS, K. M.; SMERICK, J. B.; BUDOWLE, B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal Forensic Science*, v.46, p. 647-650, 2001.
- [12] HILL, C.R.; KLINE, M.C.; COBLE, M.D.; BUTLER, J.M. Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. *Journal Forensic Science*, v.53, p.1-6, 2008.
- [13] GRATTAPAGLIA, D.; SCHMIDT, A.B.; COSTA e SILVA, C.; STRINGHER, C.; FERNANDES, A.P.; FERREIRA, M.E. Brazilian population database for the 13 STR loci of the AmpF/STR, Profiler Plus and Cofiler multiplex kits. *Forensic Science International*, v. 118, p. 91-94, 2001.
- [14] RIANCHO, J.A.; ZARRABEITIA, M.T. A Windows-based software for common paternity and sibling analyses. *Forensic Science International*, v. 135, p. 232-234, 2003.
- [15] RAIMANN, P.E. Uso dos Mini-STR NC01 e NC02 na Prática Forense: (I) Validação; (II) Análise em DNA Degradado; (III) Estudo Populacional no Rio Grande do Sul. IV Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação – PUCRS. P. 110-111, 2009.