

UMA SIMULAÇÃO DE TESTE DE PATERNIDADE: QUEM É O PAI DO BEZERRO?

Rogério Fernandes de Souza¹

1 - Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, Pr, Brasil. E-mail: rogfs@uel.br

Palavras-chave: exame de paternidade, Reação em Cadeia da Polimerase, teste de DNA.

RESUMO

Devido ao fato das mutações poderem afetar o DNA de diferentes formas – trocando, adicionando ou retirando um ou mais pares de bases – é possível encontrar muita variação no material genético dos indivíduos de uma espécie. Algumas técnicas de biologia molecular atualmente disponíveis permitem identificar tal variação, podendo ser utilizadas, dentre outras coisas, em exames de paternidade e/ou análises criminalísticas.

INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase, ou simplesmente PCR (do inglês *Polimerase Chain Reaction*), é uma técnica de biologia molecular muito utilizada atualmente em diferentes tipos de estudos, que vão desde a caracterização da diversidade genética das espécies até os exames de paternidade e à elucidação de crimes.

Basicamente, ela é utilizada para amplificar determinados trechos do genoma dos organismos a fim de permitir que esses possam ser mais facilmente analisados. Para compreendermos como alguém pode ser identificado via PCR, é preciso conhecer um pouco sobre a fundamentação dessa técnica. Um esquema simplificado de uma PCR é mostrado na Figura 1.

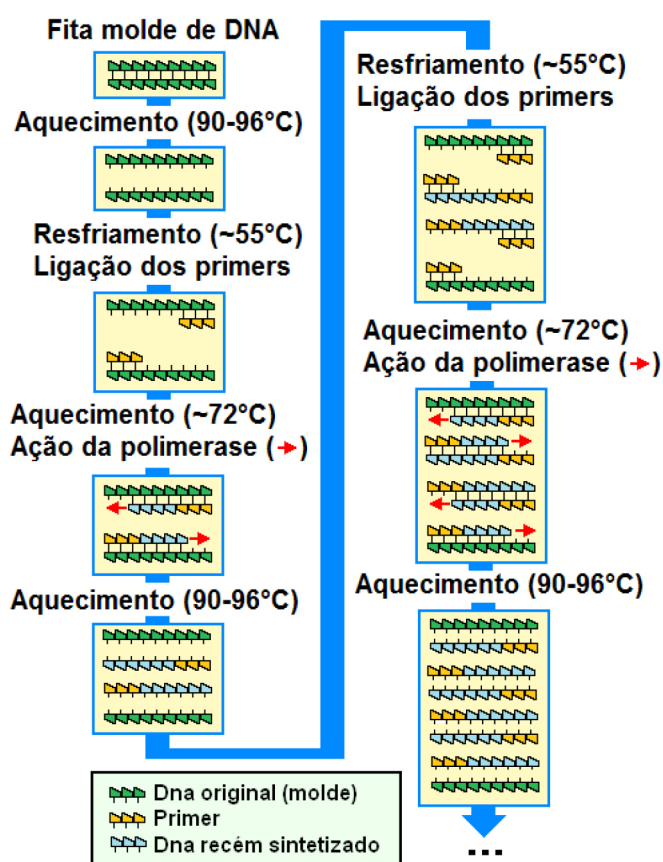


Figura 1. Os principais passos envolvidos na amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase ou PCR.

De um modo geral, o DNA de amostras biológicas (sangue, sêmen etc) de um indivíduo é extraído e purificado, sendo em seguida submetido a ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento em um aparelho conhecido como termociclador. Nesse processo são utilizados, além do DNA a ser examinado, uma enzima capaz de sintetizar novas moléculas de DNA (chamada *Taq* polimerase), iniciadores ou primers (pequenas moléculas de ácidos nucleicos com cerca de 10 a 20 nucleotídeos de comprimento que demarcam o trecho a ser amplificado), bem

como os deoxinucleosídeos trifosfatados ou dNTPs (os precursores das novas moléculas de DNA a serem produzidas), dentre outros componentes. Depois de uns 30 ciclos de aquecimento e resfriamento, que dura poucas horas, um determinado trecho da molécula de DNA pode ser duplicado mais de um bilhão de vezes.

Para podermos comparar o DNA de diferentes indivíduos da população, ou dos progenitores e de seus respectivos descendentes, é necessário que, depois da PCR, ele seja submetido a uma separação eletroforética, conforme exemplificado na Figura 2. Findada a eletroforese, o meio que serviu de suporte para a separação do DNA, que nesse tipo de experimento é normalmente um gel de poliacrilamida, é colocado em uma solução de brometo de etídio ou de nitrato de prata para corar os fragmentos amplificados.

Por que essa técnica pode ser utilizada na identificação de indivíduos?

Determinadas mutações que afetam o DNA podem alterar o tamanho dos fragmentos amplificados pela PCR. Diferentes indivíduos da população podem apresentar fragmentos com diferentes comprimentos e, nesse caso, como são herdáveis, eles podem ser passados para a prole seguindo os princípios convencionais da herança mendeliana.

Sendo assim, nesses tipos de estudos são comumente escolhidas para amplificação aquelas regiões do genoma que apresentam grande variação de tamanho. Quando diferentes regiões do genoma de um mesmo indivíduo são submetidas à PCR e à separação eletroforética, é possível gerar um perfil de amplificação praticamente exclusivo, algo que se assemelha a uma impressão digital.

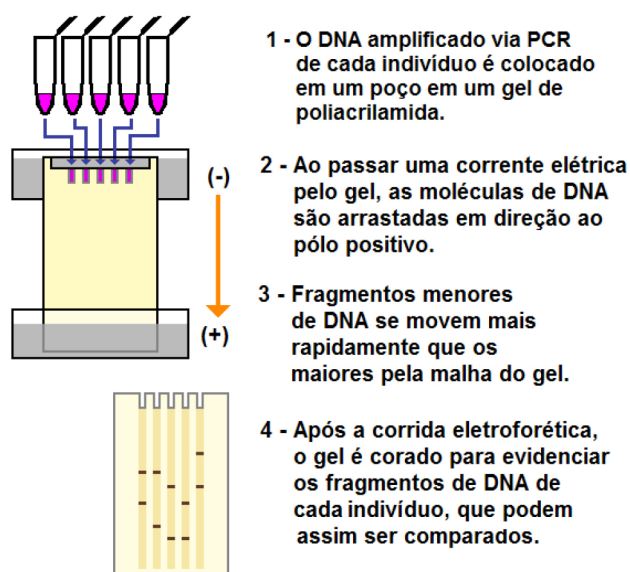


Figura 2. Esquema demonstrando a eletroforese de DNA. Cada ponto corado, também chamado de banda, representa um trecho de DNA de mesmo tamanho que foi amplificado via PCR.

OBJETIVO DA PRÁTICA

O objetivo dessa prática é mostrar como a técnica de PCR pode ser utilizada na identificação dos indivíduos de uma determinada população e, de uma maneira mais específica, como isso pode ser utilizado, por exemplo, em exames de paternidade.

CONTEXTUALIZANDO A SITUAÇÃO

Devido a problemas de manejo, a vaca campeã em produção de leite do seu Osvaldo, acabou cruzando, de maneira não programada, com um dos touros de seu rebanho. Deste cruzamento, nasceu um bezerro que pode combinar os genes campeões da sua mãe com os genes de um ótimo touro, ou então, de um outro animal não tão bem qualificado.

Nesse rebanho existem três touros suspeitos de terem cruzado com a vaca. O laboratório onde você trabalha foi convocado para definir qual deles pode ou não tê-la fecundado. Para tanto, amostras de sangue da vaca, do bezerro e dos três supostos progenitores foram coletadas e purificadas separadamente por você. Cabe agora realizar a PCR e a eletroforese dos fragmentos amplificados.

PROCEDIMENTO

1. Os *primers* utilizados para amplificar um trecho do DNA desses animais são mostrados na Figura 4, juntamente com a região do DNA de cada animal por eles reconhecida;
2. Recorte os *primers* e procure identificar nos dois cromossomos de cada animal o local em que eles conseguem se ligar; preste atenção à regra de amplificação do DNA que determina que: a) o *primer* deve reconhecer um trecho onde todas as suas bases se pareiem corretamente com as bases do DNA (segundo a regra A=T e C=G); b) as polaridades do *primer* e da molécula de DNA a qual ele se liga devem ser invertidas (por exemplo, se a molécula de DNA segue no sentido 5' à 3', o *primer* que se ligará a ela deverá seguir o sentido 3' à 5', e vice-versa); c) a nova fita de DNA é sintetizada somente no sentido 5' à 3' a partir de uma extremidade 3' livre (a do *primer*);
3. Determine o tamanho dos trechos amplificados em cada um desses indivíduos, considerando desde onde começa o *primer* 1 até onde termina o *primer* 2;
4. Em seguida, simule a separação desses fragmentos pela eletroforese de DNA, de acordo com os seus tamanhos, utilizando o esquema da Figura 3 (por exemplo, um fragmento de 55 pares de bases deve-

rá ficar na posição 55, marcada a esquerda da Figura 3);

5. Lembre-se de que o fragmento presente no bezerro e que não for encontrado na vaca deve ter sido herdado de seu pai;
6. Procure então ver qual dos touros possui um fragmento de igual tamanho ao do bezerro; os que não tiverem, deverão ser automaticamente descartados da suposição de paternidade desse filhote.

ENTENDENDO ESTA ATIVIDADE

1. Quais foram os tamanhos dos diferentes fragmentos amplificados nesses animais? Cada um desses fragmentos poderia ser considerado um alelo?
2. Depois de realizar a separação dos fragmentos de acordo com os seus tamanhos, qual touro não pode ser excluído da paternidade do bezerro?
3. Por que o touro 1 não pode ser o pai, tendo em vista que este possui um alelo igual ao do bezerro?
4. Em que se baseiam os testes reais de paternidade a partir do exame do DNA?
5. Qual seria o grau de exatidão dos testes de paternidade baseados no exame de DNA?
6. Os testes de paternidade ou identificação de amostras de suspeitos de crimes são realizados dessa mesma maneira?

RESPOSTAS ÀS QUESTÕES

1. O tamanho dos fragmentos variou de 56 a 74 pares de nucleotídeos. Considerando que representam uma determinada região do genoma, possuindo apenas diferenças no seu comprimento, e que são herdados de maneira mendeliana, cada um deles pode ser chamado de alelo.
2. O alelo que o bezerro não compartilha com a mãe e, portanto, foi herdado do pai, não é encontrado nos touros 1 e 2. Já, um dos alelos do touro 3 é igual ao do bezerro. Logo, nesse caso, somente a paternidade desse touro não pode ser excluída.
3. O bezerro possui um alelo de igual tamanho ao encontrado tanto na vaca como no touro 1. Acontece que esse alelo só pode ter vindo da vaca, pois o outro alelo do bezerro não é encontrado em sua mãe. Além disso, se o touro também tivesse passado esse mesmo alelo para o bezerro, este seria homozigoto e produziria uma única banda no gel, ao invés de duas.

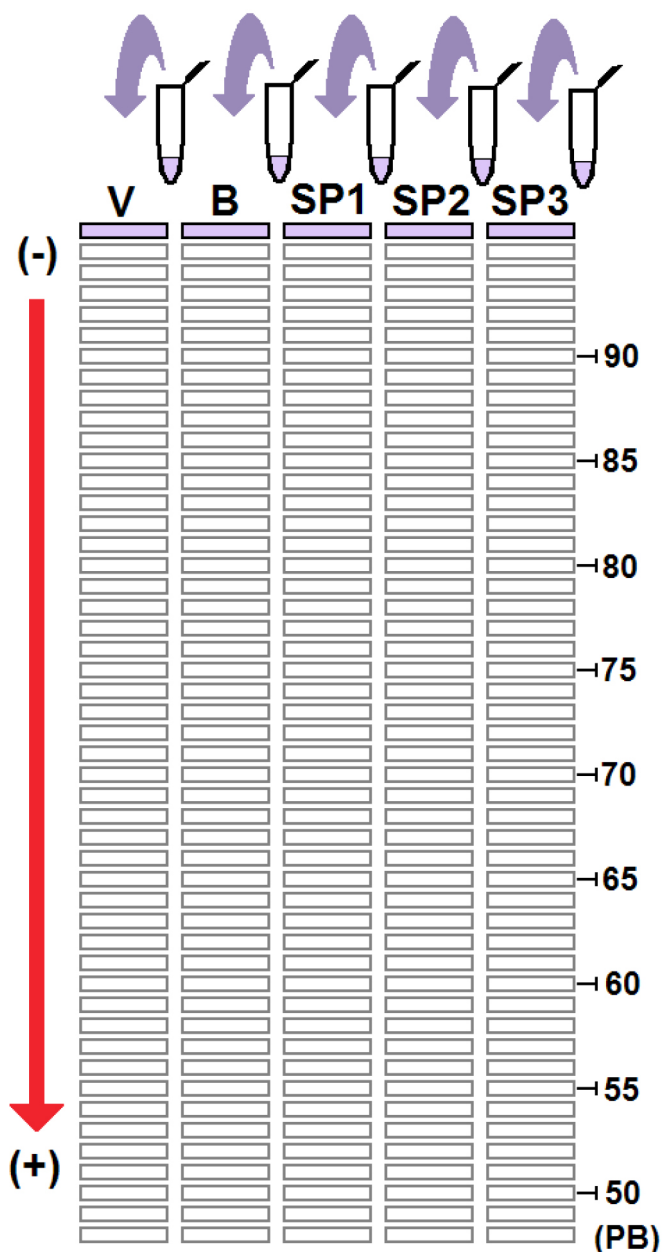


Figura 3. Eletroforese dos diferentes fragmentos amplificados (canaletas onde devem ser colocados o DNA do(a): V = vaca; B = bezerro; SP = supostos pais 1, 2 e 3).

4. Tais testes partem da premissa de que herdamos um conjunto completo de moléculas de DNA de cada um de nossos progenitores. Contudo, embora contenham praticamente as mesmas informações genéticas, podem haver diferenças sutis nas sequências de bases que herdamos de cada um deles. São justamente essas pequenas diferenças que nos fazem geneticamente diferentes uns dos outros. Ao longo do nosso genoma é possível encontrar regiões que apresentam grande variação de tamanho entre os indivíduos. Isso ocorre devido a mutações

ao acaso que acrescentam ou retiram trechos repetidos de nucleotídeos (como a sequência GAC/CTG mostrada nessa simulação). Tais mutações normalmente não afetam de forma negativa os seus portadores, podendo se acumular ao longo das gerações. Isso garante a manutenção de uma grande quantidade de alelos na população. Tecnicamente, tais regiões repetidas são conhecidas como micros-satélites ou repetições curtas em tandem (STRs, de *Short Tandem Repeat*), pelo fato das sequências que se repetem serem pequenas em comprimento, sendo normalmente compostas por dois até nove pares de bases. Além disso, o número de vezes que essas sequências se repetem, numa dada região, variam frequentemente de 7 a 40 vezes;

5. Para um único loco, existirão na população em geral indivíduos com alelos de tamanhos iguais e diferentes. O fato de dois indivíduos possuírem alelos idênticos não significa que eles sejam aparentados. Afinal, as mutações que os originam são fortuitas. Portanto, por uma questão de puro acaso, é possível que uma criança e um suposto pai com-partilhem um ou mais alelos em comum sem que tenham alguma relação de parentesco (o fato de você ter sangue do tipo A e o seu vizinho também, não significa que ele seja o seu pai). Entretanto, os exames de paternidade são executados com muitos locos diferentes, normalmente entre 12 a 20, e os resultados são submetidos a testes estatísticos. Se um suspeito de paternidade possui todos os alelos paternos presentes na criança, a chance disso acontecer, por puro acaso, é muito baixa e ele não pode ser excluído da paternidade. No entanto, se existem três ou mais alelos na criança que não estão presentes no DNA do suposto pai, este é automaticamente excluído da

paternidade¹. Atualmente, a acurácia destes testes ultrapassa 99,99%. Ou seja, o risco de um indivíduo ser falsamente identificado como pai de uma criança é muito baixo.

6. A identificação de criminosos pelo teste do DNA funciona de maneira semelhante. Nesse caso, se um criminoso deixa uma pequena amostra de sangue, pele, espermatozoides ou outro tecido que contenha DNA, este é colhido, purificado e amplificado para uma série de locos. A diferença é que todos os alelos amplificados de todos os locos serão utilizados na identificação do suspeito. Nos Estados Unidos da América, existe um banco nacional de dados conhecido pela sigla CODIS (de *Combined DNA Index System* ou Sistema índice de DNA Combinado). Este concentra os dados de perfis genéticos de infratores condenados, evidências de cenas de crimes não resolvidos e de pessoas desaparecidas. Esse sistema foi cedido ao governo brasileiro, estando em fase de implantação pela Polícia Federal.

¹ Existem casos raros de paternidade legítima nos quais nem todos os alelos presentes na criança foram identificados nos seus progenitores masculinos. Por isso, hoje se recomenda que a exclusão somente ocorra a partir da detecção de três ou mais incompatibilidades.

REFERÊNCIAS

- PIERCE, B. (2004). Genética. Um enfoque conceitual. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 1ª. ed. 758p.
- SNUSTAD P & SIMMONS MJ (2008). Fundamentos de Genética. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 4ª ed. 922p.
- KLUG WS; CUMMINGS MR; SPENCER CA; PALLADINO MA (2010). Conceitos de genética. Porto Alegre: Art med. 9ª Ed. 863 p.

Primer 2: 3'-GCTGCTGCTAA-5'

5 -TTAACACCCGACCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATTTTACTCCGACACGGACCCTAC-3
3 -AATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAATGAAGGCCTGTGCCCTGATGC-5
5 -AATGCTTTAACACCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATTTTACTCCGACACGGACCCTACG-3
3 -TTACGCAATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAATGAAGCCTGTGCCCTGATGC-5

5'-AATGCTTTAACACCCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATTTACTCCGACACCGGAACCTTAG-3'
3'-TTACGAATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAATGAGGCTGTGCCCTGATGC-5'

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

5'-TTTAAACACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATTTTACTCCGACAACGG-3'
3'-AATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAATGAGGCCTGCC-5'

Grom. 1:

5'-TTTAACACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA-3'
3'-AATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAATGAGGCTGT-5'

Grom. 2:

5'-TTTAACACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA-3'
3'-AATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAATGAGGCTGTGCTTGG-5'

[illegible][illegible]

Grom. 1:

5'-TTTACACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATTTTACTCCGACACGGACC-3'
3'-AATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTAAATGAGGCTGTGCCCTGG-5'

5'-CCTTAGGCATGCTTTAACACCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATTTTACTCCGACACGGACCTAC-3'
3'-GGATCCGTTACGAATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTAATGAGGCTGTGCCCTGGATG-5'

Grom. 2:

5'-TTAACACCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATTTACTCCGACACGGACC-3'
3'-AATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTAATGAGGCTGTGCCCTGG-5'
5'-CCTAGGCAATGCTTAAACACCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATTTACTCCGACACGGACCTTAC-3'
3'-GGAATCCGTTACGAATTGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTAATGAGGCTGTGCCCTGGATTG-5'

[illegible]

8