

MARCADORES MOLECULARES

“Ferramentas moleculares de ampla aplicação”

Dra. Maria Rosa Travassos da Costa

Dr. Marcelo Murad Magalhães



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

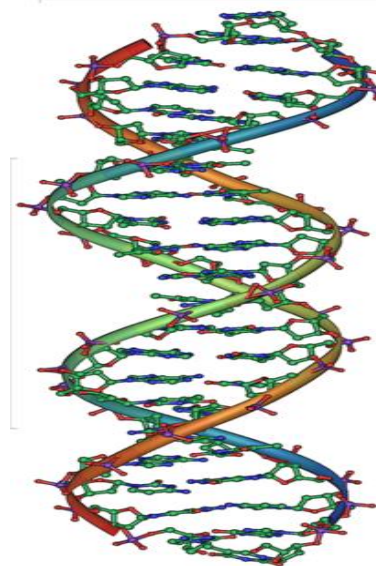


- Século XIX - cromossomos contêm as unidades informacionais transferidas de uma geração para a outra
- Século XX - identificação e descrição do DNA como a molécula que contém esta informação

Célula



DNA



As análises de variabilidade de fenotípica e genotípica permitem identificar pontos de referência próprios ou comuns a determinado grupo de organismos, tecnicamente denominados “marcadores genéticos”.

Marcadores genéticos

Qualquer característica morfológica ou molecular que diferencia indivíduos, e que seja facilmente detectável e herdável é um potencial marcador genético

1980 - David Botstein propôs a utilização de regiões de DNA para se fazer o mapeamento de genes de doenças nos cromossomos.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Aplicações dos Marcadores Genéticos

- Identificação de parentais
- Estudos filogenéticos
- Utilização na indústria alimentícia
- No melhoramento de plantas
- Análise de diversidade genética e análises de fingerprinting
- Confirmação da hibridação artificial de plantas
- Melhoramento genético por meio de seleção recorrente
- Utilização em programas de conservação e uso de recursos genéticos
- Estabelecimento de coleções nucleares e de trabalho compostas por um menor número de acessos
- Na identificação de doenças
- Genética forense

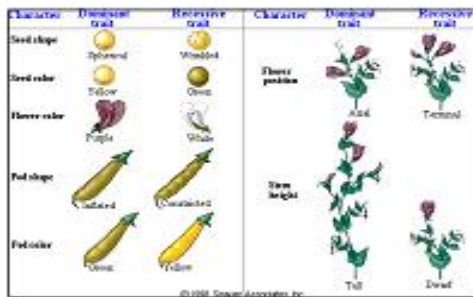


Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Marcadores Genéticos

Morfológicos



Bioquímicos



DNA



Marcadores moleculares

- **Morfológicos:** Fenótipos de fácil identificação visual (único alelo).
- **Bioquímicos:** Eletroforese de proteínas. Sujeito a influências ambientais; limitado em número.
- **Moleculares:** Eletroforese de DNA. Não possui influências ambientais; potencialmente ilimitado em número; técnicas e equipamentos mais complexos.

Marcadores Genéticos

Características Desejáveis:

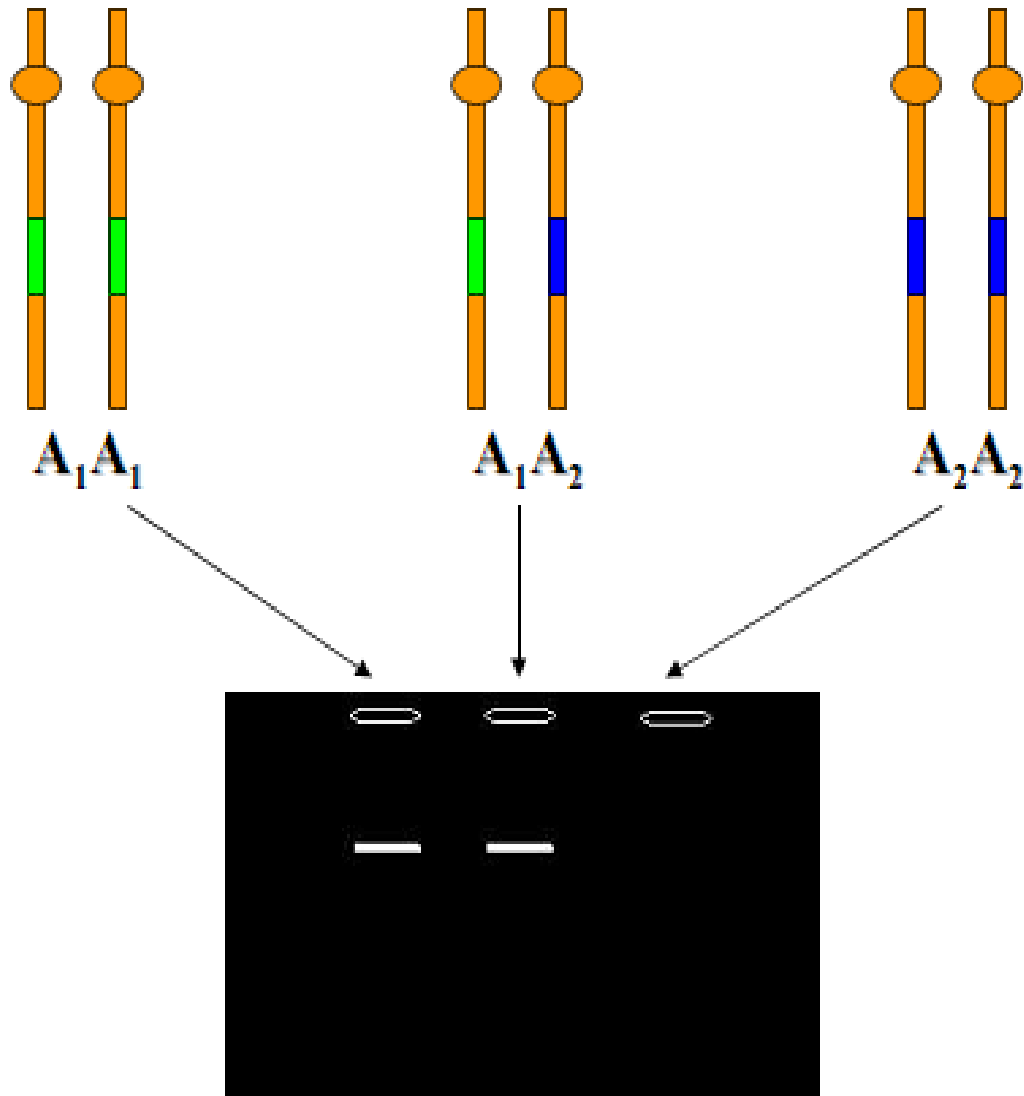
- Alto polimorfismo;
- reprodutibilidade;
- amplamente distribuído através do genoma;
- discriminação;
- ausência de influências ambientais;
- barato;
- fácil diagnóstico;
- codominante;



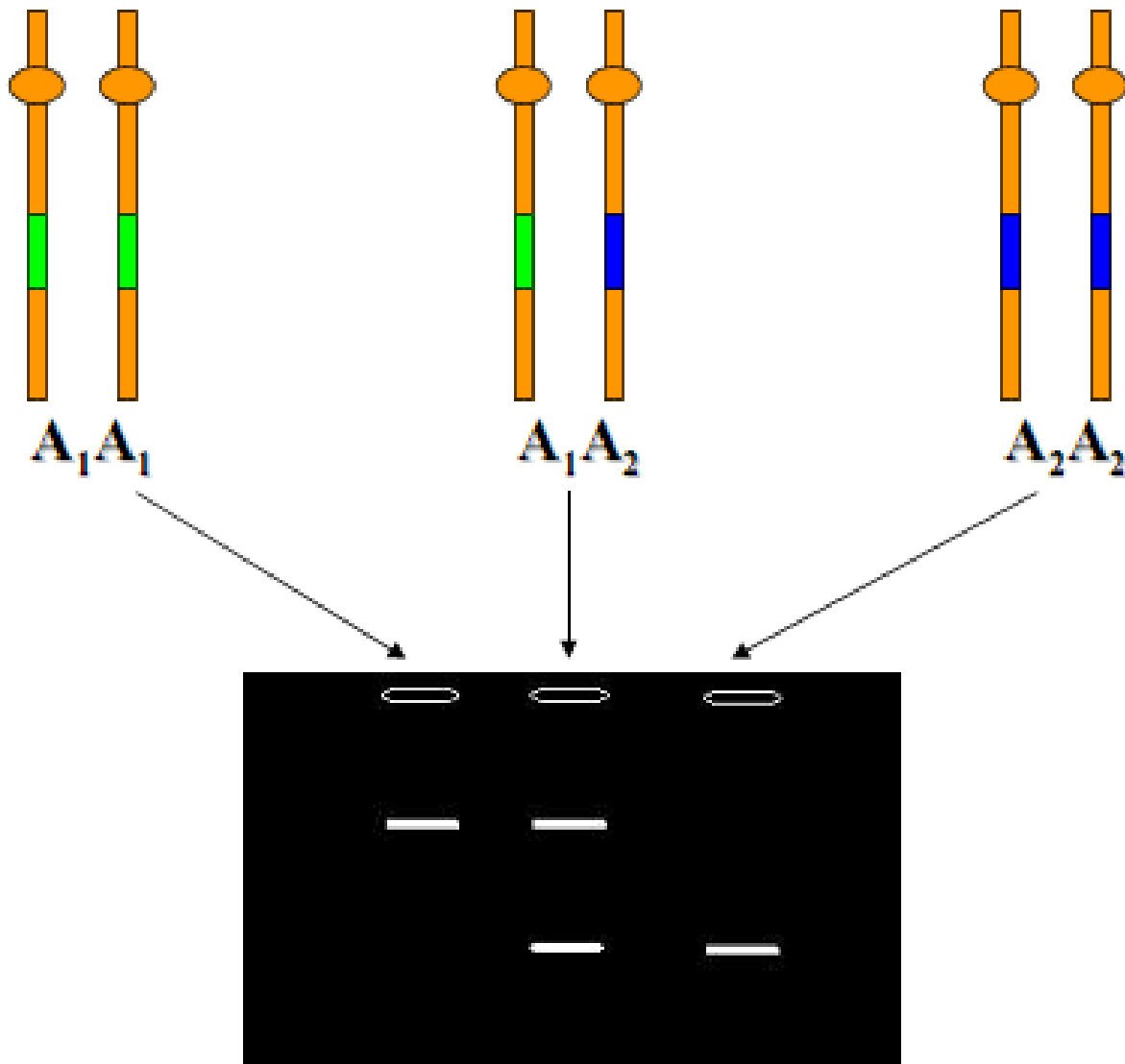
Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Marcadores dominantes



Marcadores codominantes



Marcadores Moleculares



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

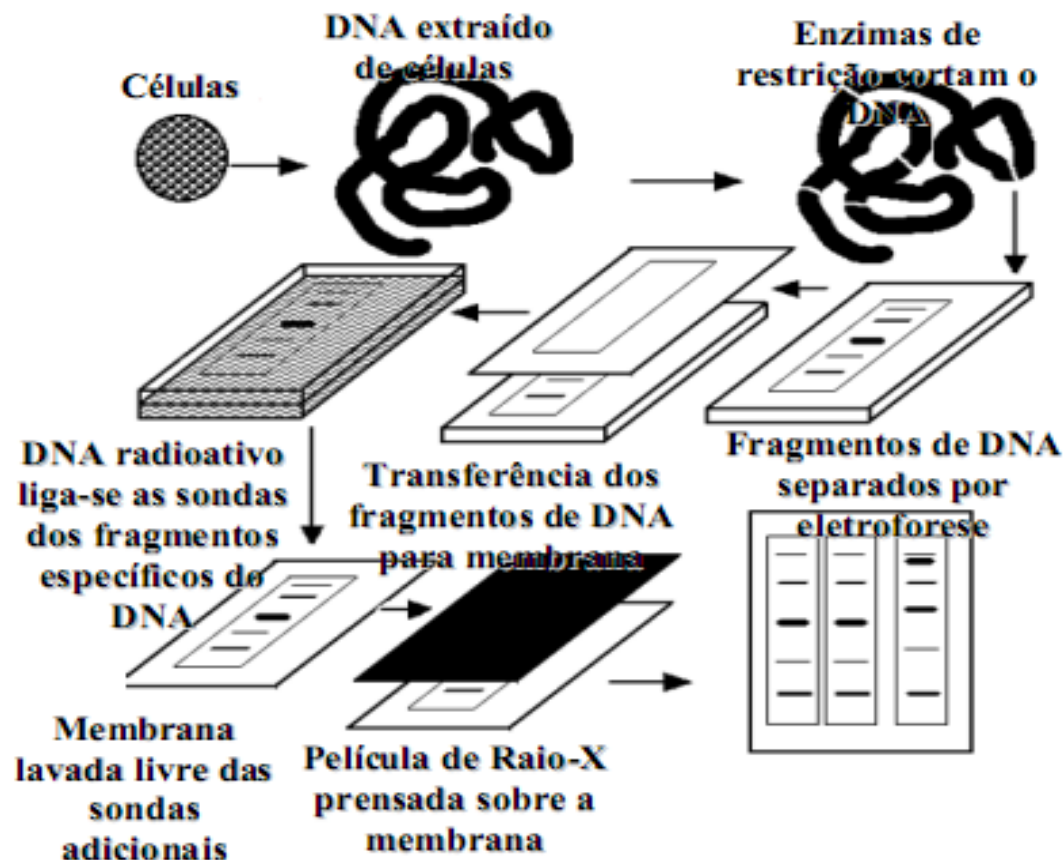
Classificação dos marcadores de DNA conforme o método usado:

- Hibridização: RFLP e minissatélites
- Amplificação de DNA: RAPD; SCAR; STS; Microsatélite; SNP e AFLP.

* RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

-Consiste na fragmentação do DNA usando enzimas de restrição.

-Baseado na diferença entre os sítios de restrição entre indivíduos (impressão digital).



* RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Significa polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, e se caracteriza pela presença ou ausência de banda

Princípio:

Usa primers aleatórios de pequeno tamanho (10 pb);
Amplifica seqüências desconhecidas de DNA.

Etapas no Laboratório:

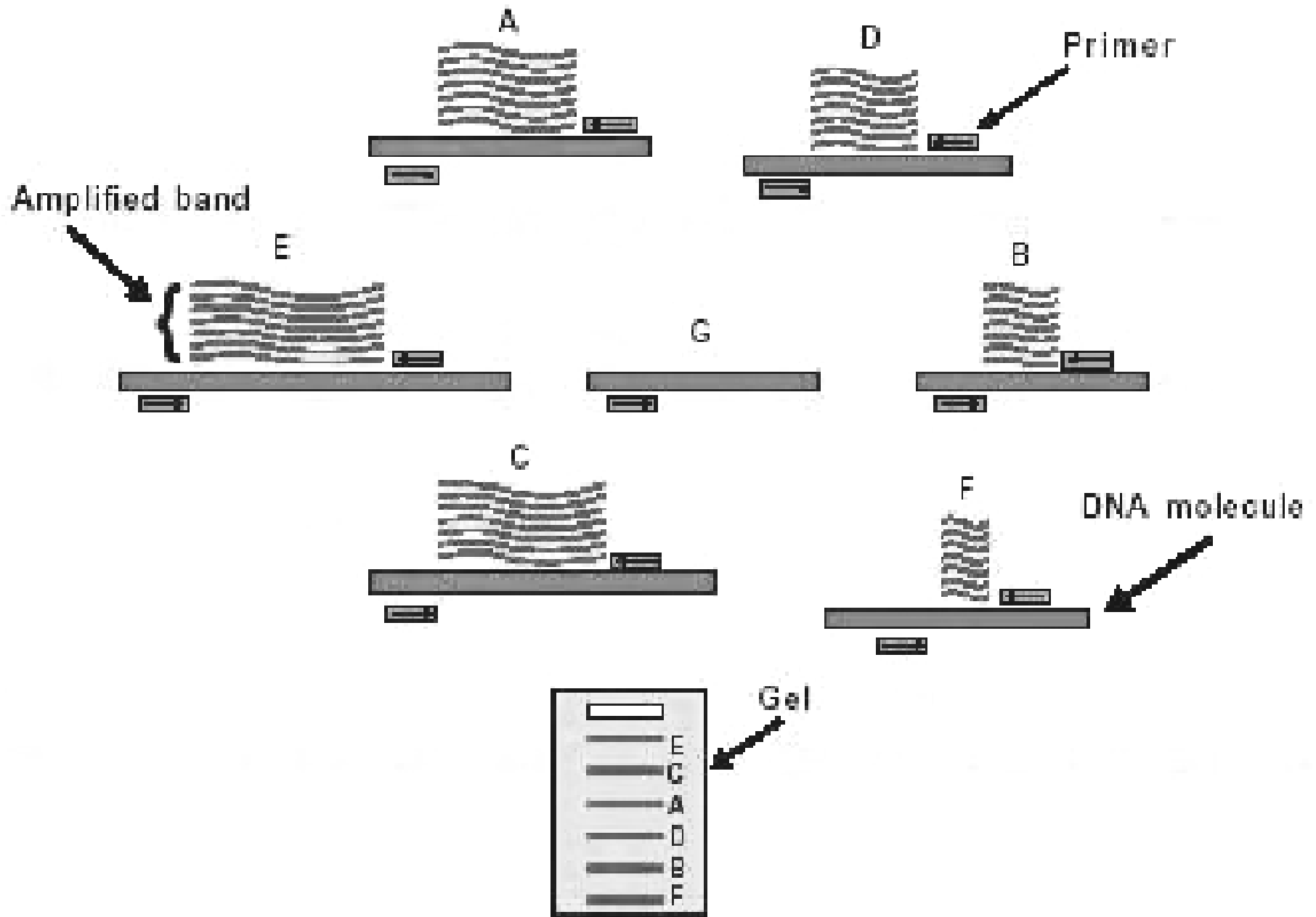
- Isolamento de DNA
- Pequenas quantidades de DNA são suficientes.
- DNA deve ser limpo.
- Se uma mínima qualidade de DNA não é conseguida, a reprodutibilidade dos resultados pode ser seriamente comprometida.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



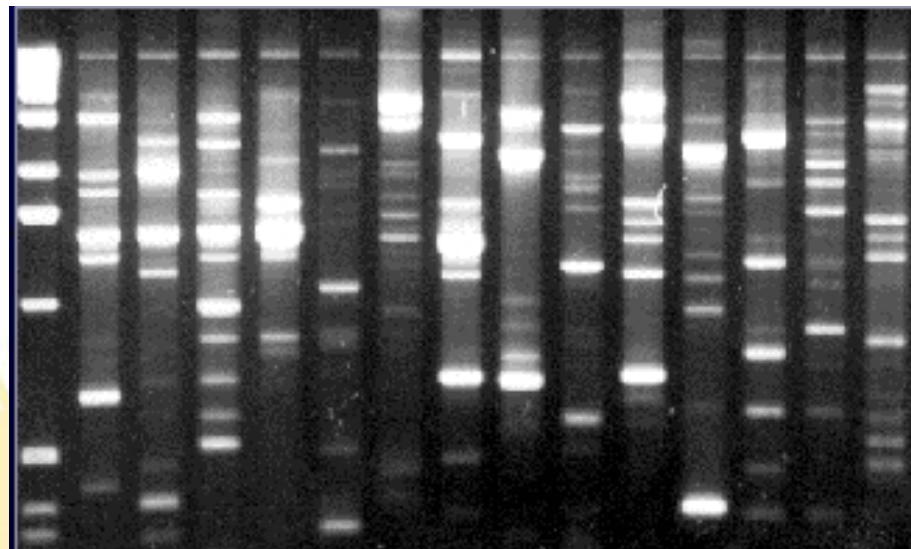
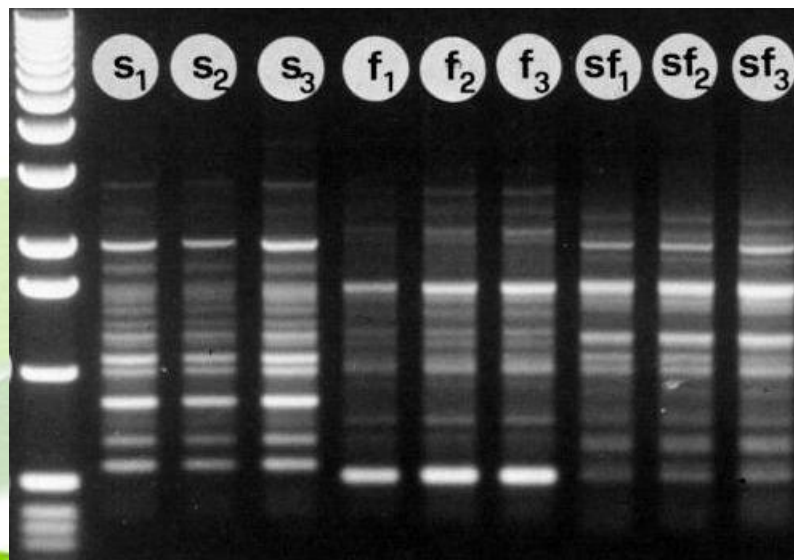
Visão Geral da Técnica



Reação de PCR

Componentes para a reação:

- Primers (10 pb).
- Adição de $MgCl_2$ é usual.
- Ciclos de anelamento são conduzidos a baixa temperatura (aproximadamente $40^\circ C$).



Vantagens

- Grande número de fragmentos
- Técnica simples e rápida
- Primers aleatórios são facilmente adquiridos, sem a necessidade de informação genética.
- Pequena quantidade de DNA
- Pouca mão-de-obra;
- Visualização direta das bandas no gel;
- Não requer biblioteca genômica para o organismo em estudo;
- Não necessita de radioisótopos;
- Distribuição em todo o genoma;
- Baixo custo;
- Uso cotidiano em programas de melhoramento.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Desvantagens

- Dominante;
- Falta de um conhecimento a priori do produto amplificado;
- Problemas com reprodutibilidade

Interpretação do padrão de bandas RAPD

Polimorfismo de DNA entre indivíduos pode ser devido a:

- Ausência do sítio do *primer*.
- Surgimento de um novo sítio.
- Ao comprimento da região amplificada entre sítios de primer.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



* **Microssatélites – SSR (*Simple Sequence Repeats*)**

Significa Seqüências Simples Repetidas, a qual consiste de pequenas seqüências de nucleotídeos (1 a 4) repetidas em tandem.

- Essas seqüências são distribuídas ao acaso no genoma e constituem a classe de marcador mais polimórfica hoje disponível.

Base Genética

- Amplificação de SSR através de PCR utilizando-se um par de “primers” específicos (20 a 30 b).
- Polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos.
- Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



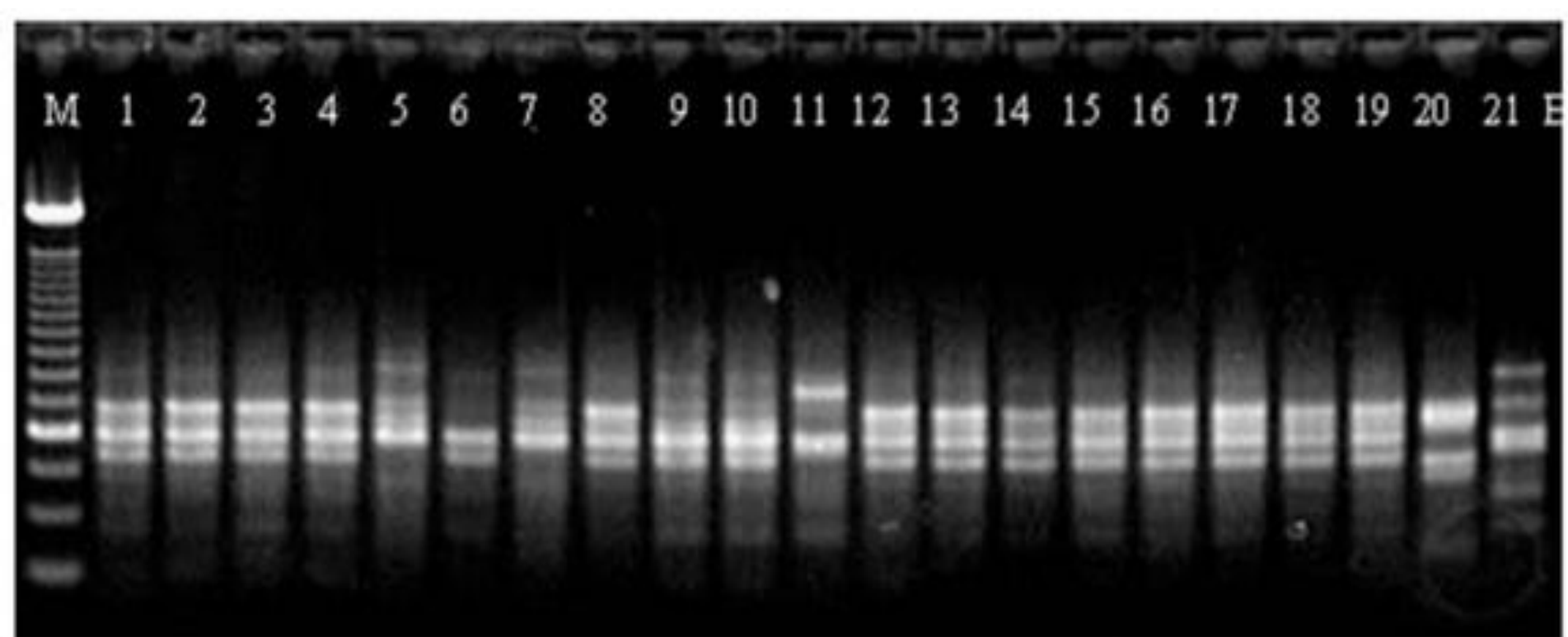


FIGURA 1- Amplificação com o “primer” OPD 03. M- Marcador de DNA (Lambda clivado com PST I); 1-Fhia 18; 2- Prata Anã; 3- UENF 1526; 4- Pacovan; 5- Caipira; 6- Maçã; 7- UENF 1527; 8- Nanicão; 9- Thap Maeo; 10- UENF 1528; 11- UENF 1529; 12- Grande Naine; 13- Ambrósia; 14- Bucaneiro; 15- Calipso; 16- PV42-68; 17- PV42-85; 18- PV42-142; 19- ST12-31; 20- Calcutta; 21- BB da França.

Vantagens

- Codominante
- Multialélico
- Elevado conteúdo de informação de polimorfismo
- Microssatélites são freqüentes e distribuídos ao acaso (cobertura completa do genoma).

Limitações

- Requer biblioteca de fragmentos genômico para o organismo de interesse;
- Grande mão-de-obra;
- Pessoal especializado;
- Equipamentos sofisticados (sequenciador automático).



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comparação entre marcadores moleculares para cinco atributos de importância para o melhoramento de plantas.

Tipo de marcador	Consistência	Tempo para resultados	Custo	Facilidade de implementar	Polimorfismo*
RFLP	Maior	Maior	Maior	Menor	Baixo-médio
VNTR	↓	↓	↓	↑	Alto
AFLP	↓	↓	↓	↑	Alto
Microssatélite	↓	↓	↓	↑	Alto
RAPD	Menor	Menor	Menor	Maior	Médio-alto

* Varia conforme a espécie.



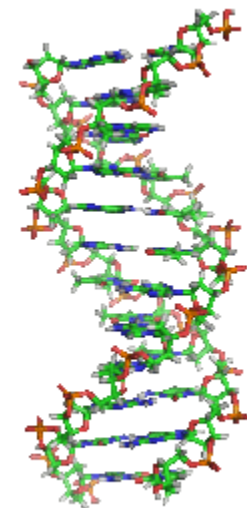
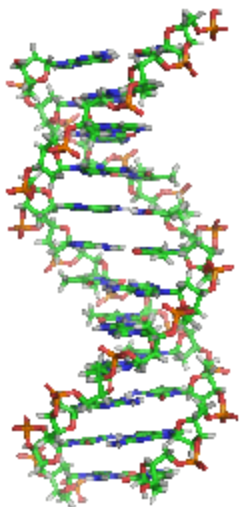
Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Polymerase Chain Reaction

Reação de polimerização em cadeia ou Polimerização em cadeia do DNA



PCR - consiste em copiar e multiplicar segmentos de DNA “in vitro”, usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA.



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

PCR se constitui hoje no método de rotina para isolar rapidamente sequências específicas a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou de cDNAs.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Utilidade da PCR

- Clonagem de genes
- Estudo do padrão de expressão gênico
- Produção de mutações e identificações de mutações
- Sequenciamento de DNA
- Diagnóstico de doenças
- Controle de qualidade - indústria alimentícia
- Medicina forense
- Taxonomia - fingerprints: RAPD, SSR, ISSR, AFLP
- Estudos genéticos
- Engenharia de novas sequências - ligações de DNAs



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



1984 - PCR foi apresentada pela primeira em um encontro científico

Publicação:

Kary Mullis and Faloona, 1987 -> Nobel de Química (1993)

1988: Esta DNA polimerase foi usada por Saiki et al. para fazer PCR.

1976: Thomas D. Brock descobriu a DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*.



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Thomas D. Brock no lago do “Yellowstone National Park”
de onde foi isolado o *Thermus aquaticus*



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



PCR requer 7 componentes essenciais:

- DNA polimerase termoestável
- Um par de oligonucleotídeos para iniciar a síntese de DNA
- Deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs)
- Cátion divalente: toda DNA pol. requer cátion divalente, usualmente Mg^{2+}
- Tampão para manter o pH
- DNA molde



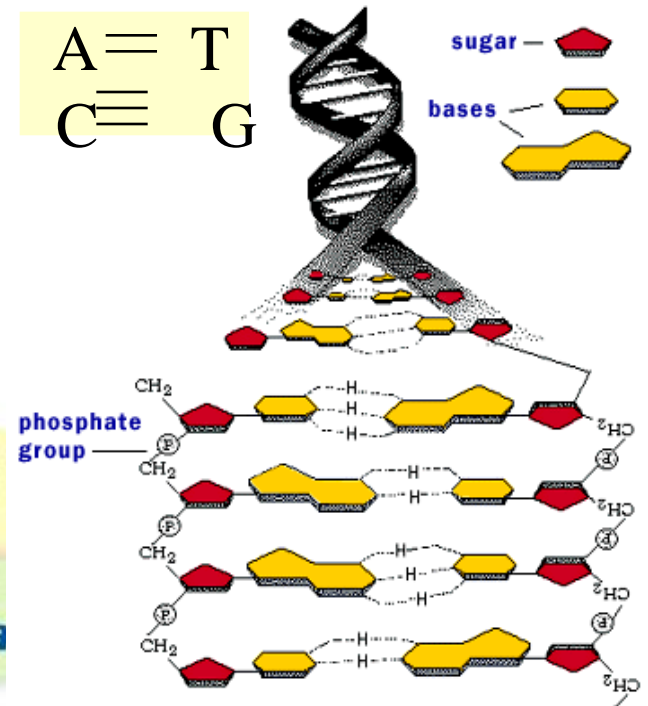
Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Virtualmente, qualquer seqüência alvo de DNA pode ser amplificada por PCR.

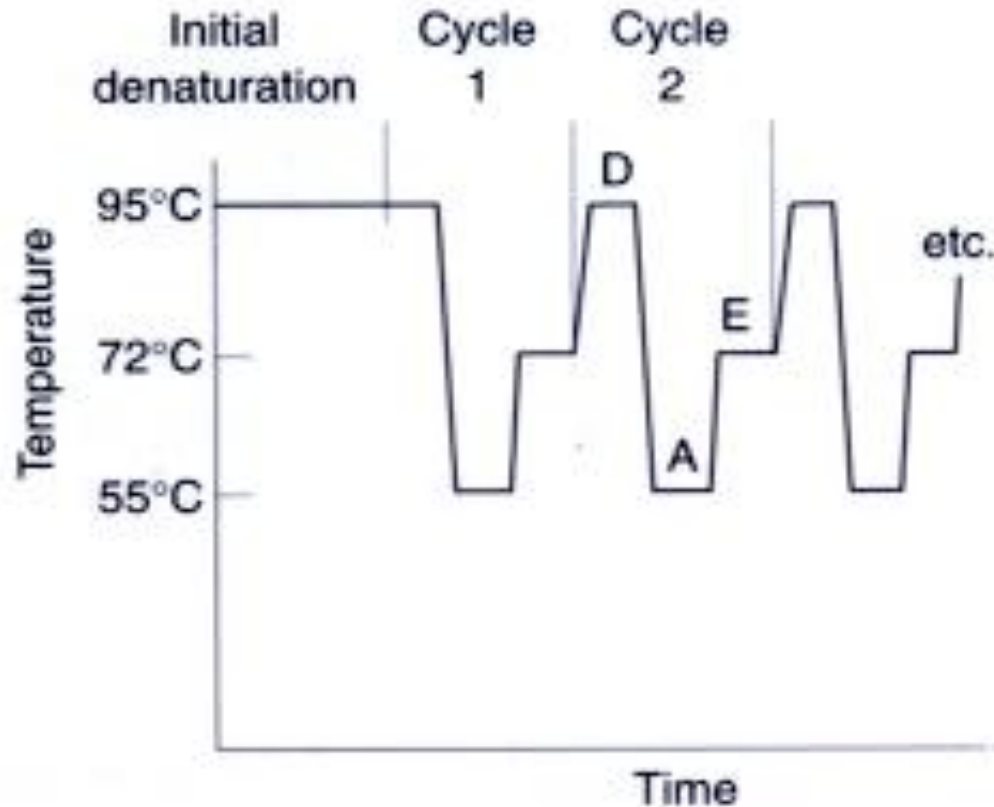
- A localização da seqüência alvo é feita pelos iniciadores (*primers*). Oligonucleotídeos com 20-24 bases são usualmente seletivos o suficiente para localizar um sítio único em um genoma de alta complexidade

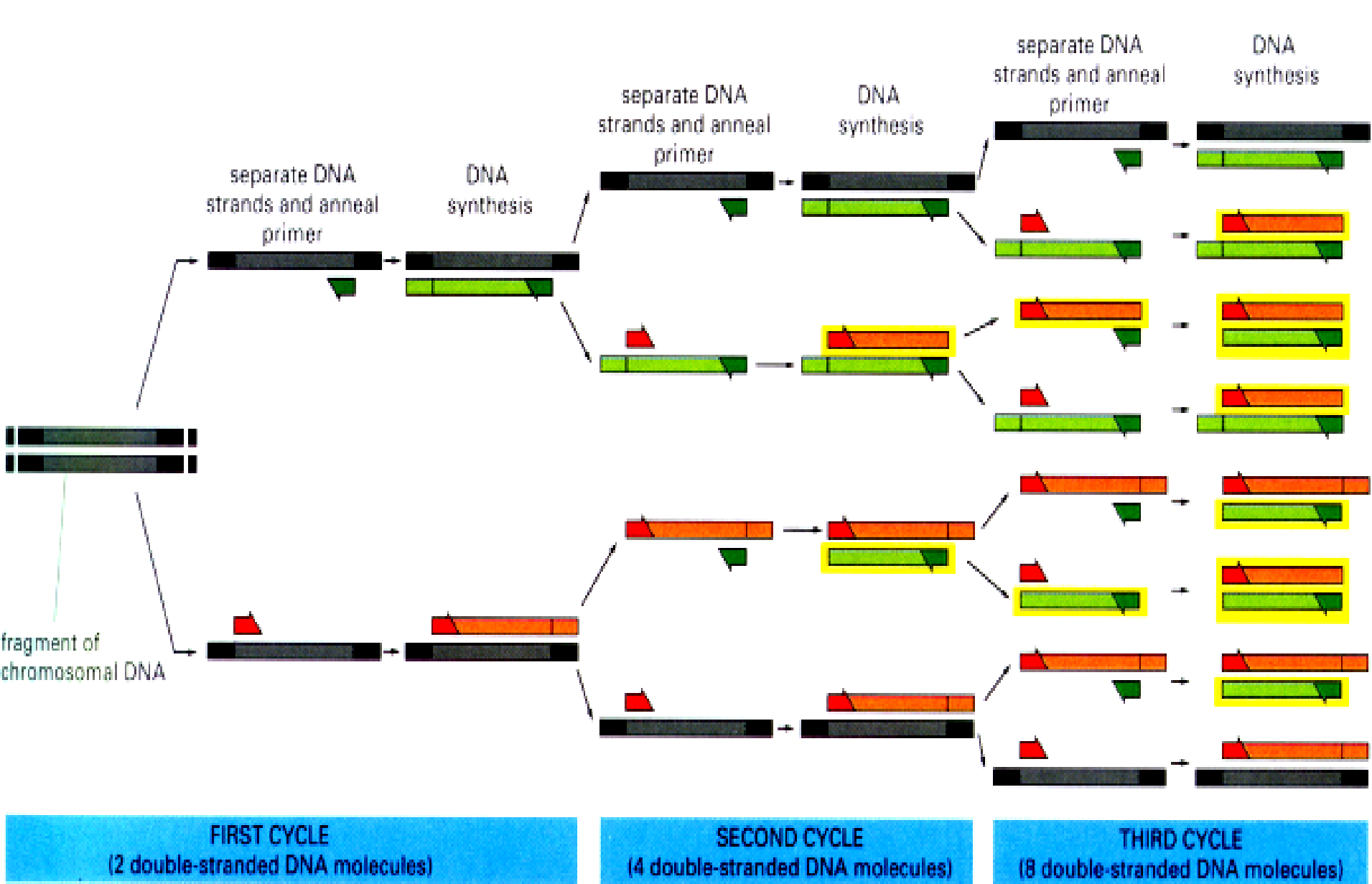
- O pareamento dos “primers” com a seqüência alvo se faz pelo estabelecimento de pontes de hidrogênio, obedecendo o pareamento convencional descrito por *Watson e Crick*



PCR é um processo iterativo, consistindo de três etapas:

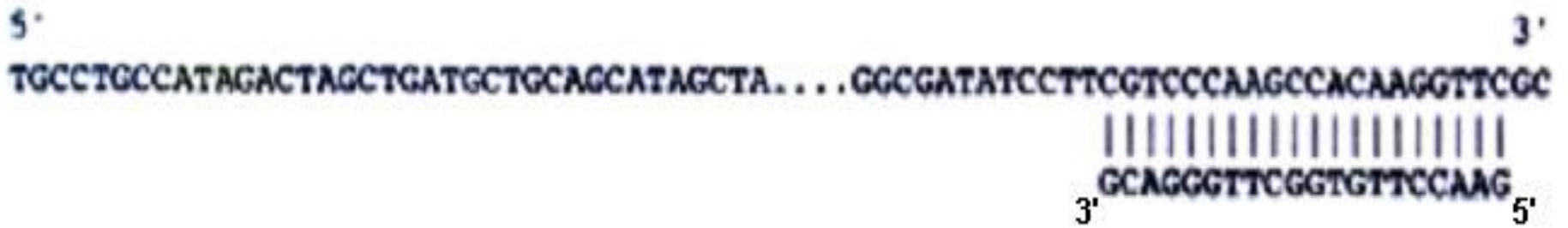
- Desnaturação da fita de DNA por aquecimento (D)
- Pareamento dos iniciadores à seqüência alvo fita única (A)
- Extensão dos iniciadores pela DNA polimerase termoestável (E)





Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento





Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Duplicação de DNA

DNA POLIMERASES



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

DNA POLIMERASES

POLIMERIZAÇÃO: 5'---> 3'

- Todas as DNA-POLIMERASES requerem para seu funcionamento:
 - Molécula de DNA - molde
 - “*Primer*” de oligonucleotídeo (iniciador)
 - Magnésio
 - dNTPs



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Cinética da PCR:

1) Fase de “screening” - ciclos iniciais:

- Os “*primers*” procuram as sequências que lhes são complementares no molde de DNA;

2) Fase intermediária:

- O processo de amplificação está ocorrendo, com os primers agindo de modo a permitir o acúmulo exponencial do fragmento de DNA.
- O pareamento do primer está bem facilitado, pois já existem várias cópias das sequências alvos.

3) Fase tardia ou fase de platô:

- A amplificação já é sub-ótima devido à limitação dos reagentes e à competição dos produtos gerados com os *primers*.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



- O aumento exponencial do N^o de cópias ocorre até um determinado N^o de ciclos, que será variável de reação para reação

As causas do platô são várias:

- Perda da atividade da enzima
- Todas as enzimas disponíveis estão ocupadas com a síntese da nova fita de DNA
- Acúmulo de produtos amplificados que tendem a parear entre si, em detrimento do pareamento com os “*primers*”. Aumenta possibilidade de amplificação de produtos inespecíficos.
- Gasto dos reagentes, especialmente inativação da DNA polimerase
- Acúmulo de pirofosfato (PiPi)
- Competição com outros produtos que vinham sendo amplificados com eficiência menor mas também foram se acumulando, etc



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Taq DNA Polymerase

1. Taq DNA Polimerase Nativa

- DNA polimerase termo-estável
- Isolada de *Thermus aquaticus*

2. AmpliTaq DNA Polimerase

- Enzima recombinante
- Forma modificada do gene da Taq DNA Polimerase expressado em *E. coli*



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Efeito da Temperatura na Taxa de Síntese de DNA

Temperatura

**Taxa de Síntese
(nucleotídeos /seg)**

22°C

0,25

37°C

1,5

55°C

24

70°C

> 60

75°C

> 150

Estabilidade da Taq sob Altas Temperaturas

Temperatura

Tempo 1/2 (minuto)

92,5°C

130

95,0°C

40

97,5°C

5



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Condições que afetam a fidelidade da amplificação do DNA

	Increase Fidelity	Decrease Fidelity
[dNTP]	↓ balanced 40-50µM each	↑ 1-2mM each; imbalanced
[Mg ⁺⁺]	↓ 1:1 with dNTP	↑ 6-8mM Mg ⁺⁺
Temp _{anneal}	↑	↓
[Enzyme] or ext. time	↓	↑
# cycles	↓	↑



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Otimização da PCR

Otimizar a amplificação para:

- Aumentar a quantidade de produto final (eficiência)
- Aumentar a especificidade, principalmente quando há grande background
- Melhorar a reprodutibilidade (de tubo para tubo e de reação para reação)

Parâmetros a serem considerados na otimização:

- Desenho dos primers
- Condições de ciclagem
- Concentração dos reagentes
- Composição do tampão



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Desenho dos primers

Tamanho ideal:

- Depende de seu conteúdo de A+T e da T_m do primer oposto
- Deve ser complexo o suficiente para evitar o pareamento em regiões inespecíficas

- Usualmente oligonucleotídeos de ~20 bases (a probabilidade de uma sequência específica de 20 bases ocorrer em um genoma é uma vez a cada 4^{20} bases)
- O pareamento específico depende criticamente da (T), além de ser influenciado pela concentração de cátions, pelo tempo na T_m (alta)

RECOMENDAÇÕES:

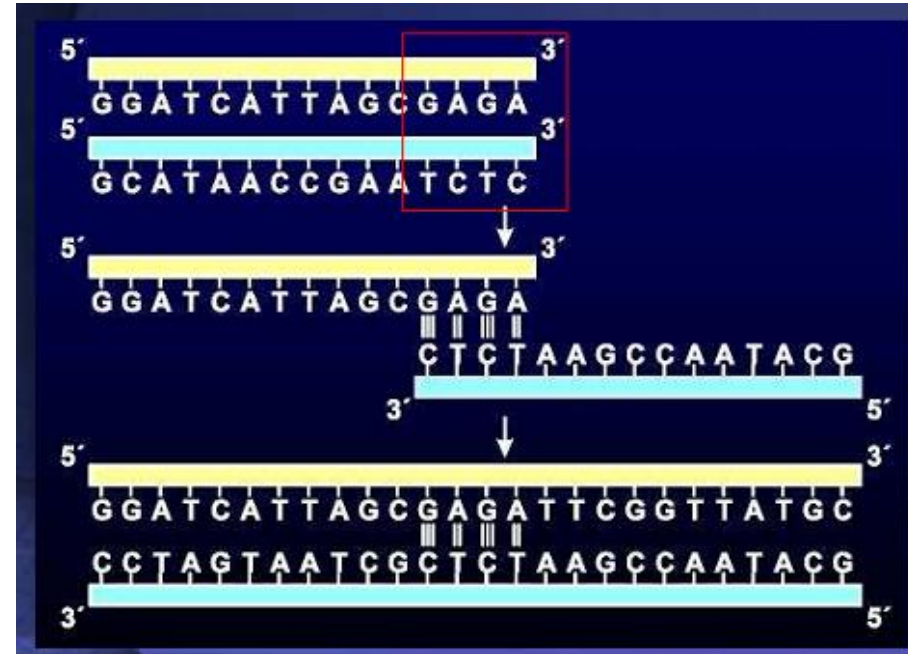
- Tamanho: 15 a 20 bases; Sequência: 40-50% de G+C distribuídos aleatoriamente; Checar formação de estruturas secundárias internas;



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

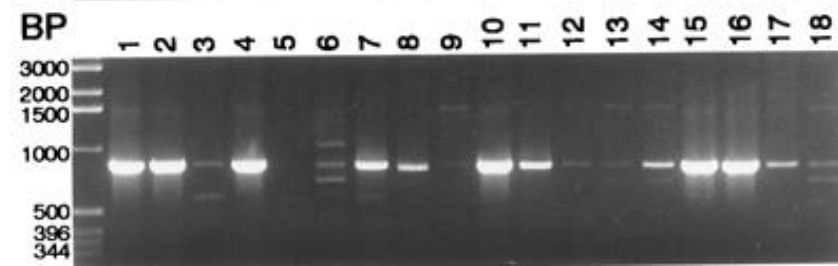
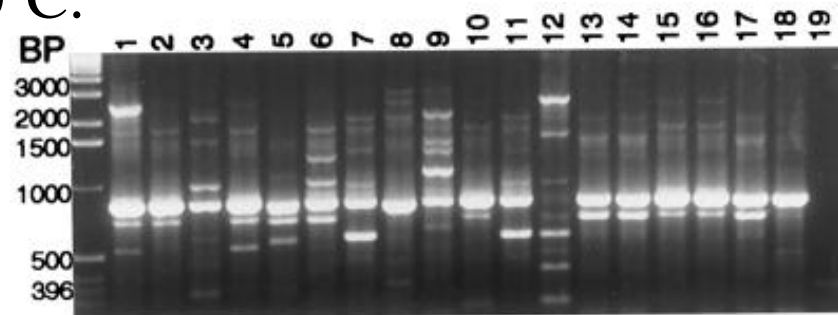


- Evitar complementariedade entre os pares de primers, principalmente na posição 3' (dímeros de primers);
- Checar se o par de primers tem T_{anel} próximas (no máximo, de 2 a 3°C de diferença)



- ***PCR Gradiente*** – permite ajuste preciso da T_{anel} :
Ex: Correr uma série de reações com diferentes T_{anel} considerando-se a T_{anel} média e a faixa de variação $\pm 10^\circ\text{C}$.

- ***Touch down PCR*** – melhora rendimento da PCR:
Ex: variar T_{anel} entre 65°C e 55°C, reduzindo em 1°C a cada 2 ciclos (20 ciclos). Fazer mais 10 ciclos a 55°C.



Condições de ciclagem

- A duração da etapa de extensão (72°C) deve ser calculada em função do tamanho do produto que se deseja amplificar;
- Em geral utiliza-se **1 min/kb de produto** – mais do que suficiente pois a extensão terá início durante a etapa de pareamento e durante a elevação da temperatura até 72°C.

PCR convencional – ciclos com três passos

1- *Denaturação* (95°C)

2 - *Pareamento* (50°C)

3 - *Extensão* (72°C)

PCR condição de ciclagem - ciclos com dois passos

(alta especificidade, < tempo de ciclagem; Primer $T_m > 65^\circ\text{C}$)

1- *Denaturação* (95°C)

2 - *Pareamento e Extensão simultâneos* (68°C)



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Influência de reagentes na PCR



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Concentração dos reagentes e composição do tampão

MgCl₂

Testar de 0,5 a 5 mM em *steps* de 0,5 ou 1 mM

-Se a concentração de Mg²⁺ é muito baixa, temos pouco ou nenhum produto.

- Se a concentração de Mg²⁺ é muito elevada, a PCR tem baixa especificidade. Observa-se muitas bandas.

A concentração de Mg²⁺ deve superar em 1,2 a concentração total de dNTPs, porque esta é a concentração de Mg²⁺ livre necessária para atividade ótima da enzima.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



dNTPs

Usar dNTPs preparados para PCR, pois são fornecidos com pH adequado (8.1) .

Usar entre 20 e 200 mM, procurando a concentração que forneça o máximo de produto com o máximo de especificidade.

- Menor concentração de dNTPs: maior especificidade, com pouco produto final.
- Maior concentração de dNTPs: há aumento da quantidade de produto com perda de especificidade.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

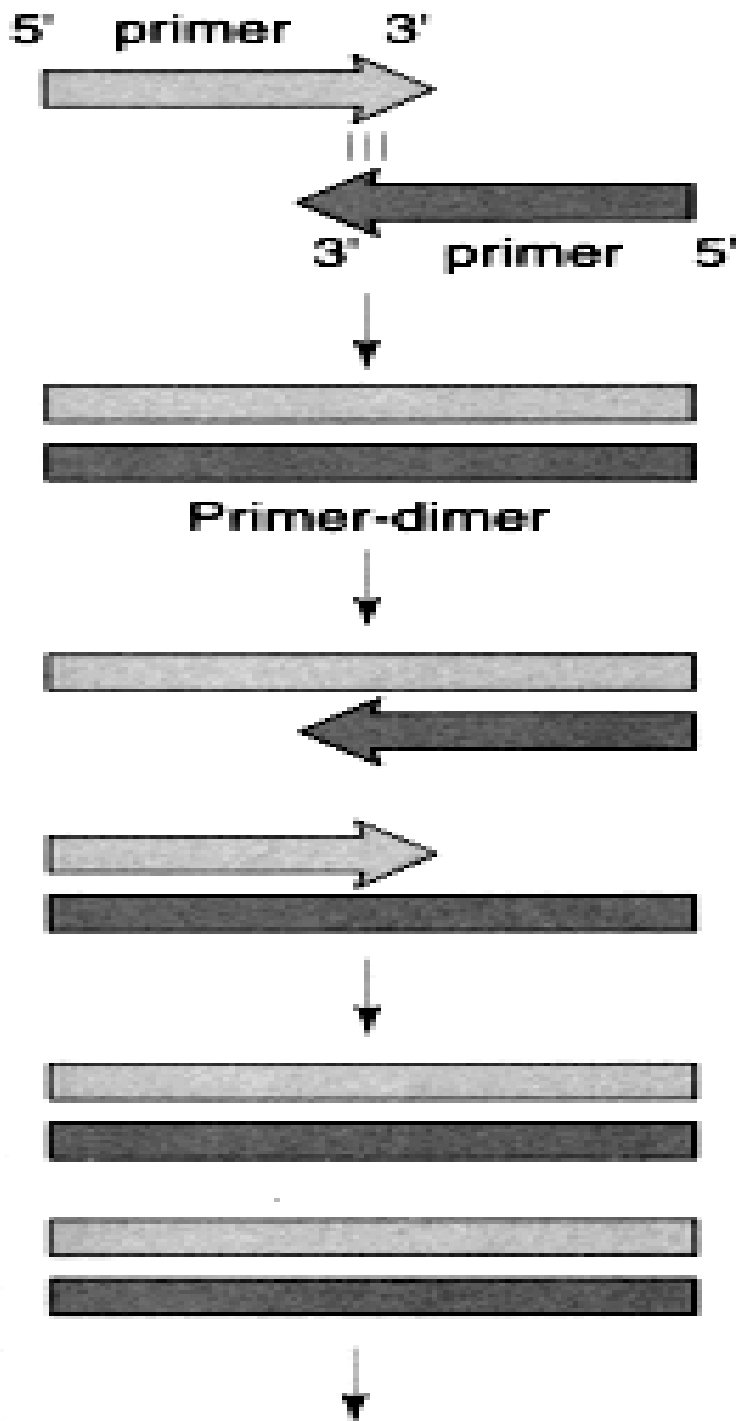


Primers

A concentração ótima de “primer” é entre 0,1 e 0,5 μM .

Ambos os membros do par devem ser usados na mesma concentração.

Excesso de “primers” induz aparecimento de produtos inespecíficos.



Tampão

Usualmente, o tampão 10 X concentrado fornecido com enzima tem 500 mM de KCl, sendo de 50 mM a concentração na reação.

Para amplificação de fragmentos pequenos, 70 a 100 mM de KCl pode ser mais eficaz (*Maniatis*). No entanto, $[KCl] > 50$ mM pode inibir parcialmente a atividade da enzima.

KCl em concentração superior a 200 mM tem um efeito tal que o DNA pode não se desnaturar a 94°C.



Nunca negligencie os controles !!!!

Controles:

- 1 tubo sem template
- 1 tubo apenas com o primer 1
- 1 tubo apenas com o primer 2
- Controle positivo, para testar os reagentes

Boas práticas indispensáveis:

- Descongele os tampões e os dNTPs completamente no gelo
- Misture no vortex ou batendo nos tubos
- centrifugue por 1 segundo antes de pipetar
- Verifique sempre a calibração dos pipetadores



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Para evitar a contaminação da PCR

- Separação física das reações de ampliações pré- e pós-PCR
- Usar pipetas com filtro de barreira
- Aliquotar reagentes
- Seleção do número e tipos de controles
 - Número de controle positivo
 - Número de controle com reagentes
 - Número de controles negativos
- amostras em replicas
- Tratamento com UV



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Termociclador:

Problema no equipamento, caso uma reação deixou de funcionar. Verifique a (T) do bloco em várias poças e a veloc. ΔT . Teste outro termociclador.



Micropipetas:

Verifique a calibração dos pipetadores semanalmente!
Use pipetadores apropriados para o volume a ser pipetado.



Reagentes:

- Use apenas fornecedores confiáveis que controlam a qualidade de todos os lotes de seus produtos.
- Evite repetidos congelamentos/descongelamentos (primers e dNTPs).
- Primers quebrados: não se “anelar” ou se “anelar” nespecificamente.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Produtos inespecíficos na PCR



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Hot Start PCR

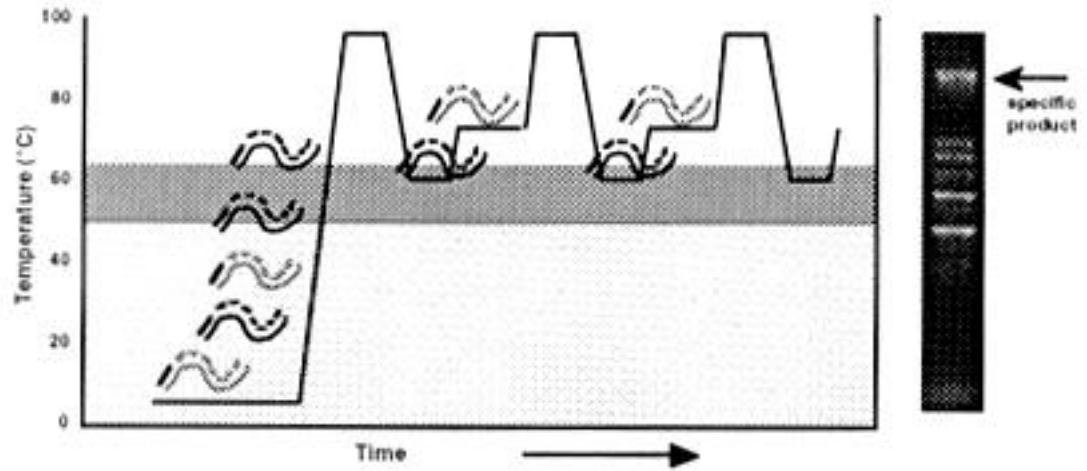
(Faloona et al. 1990)

A reação de amplificação é iniciada em temperatura elevada

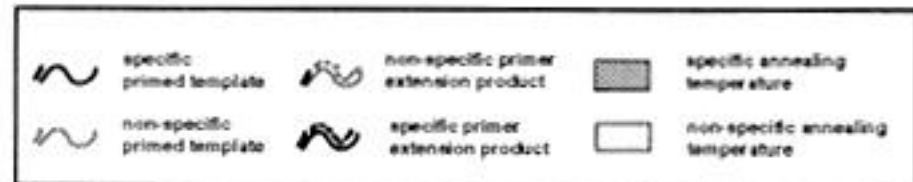
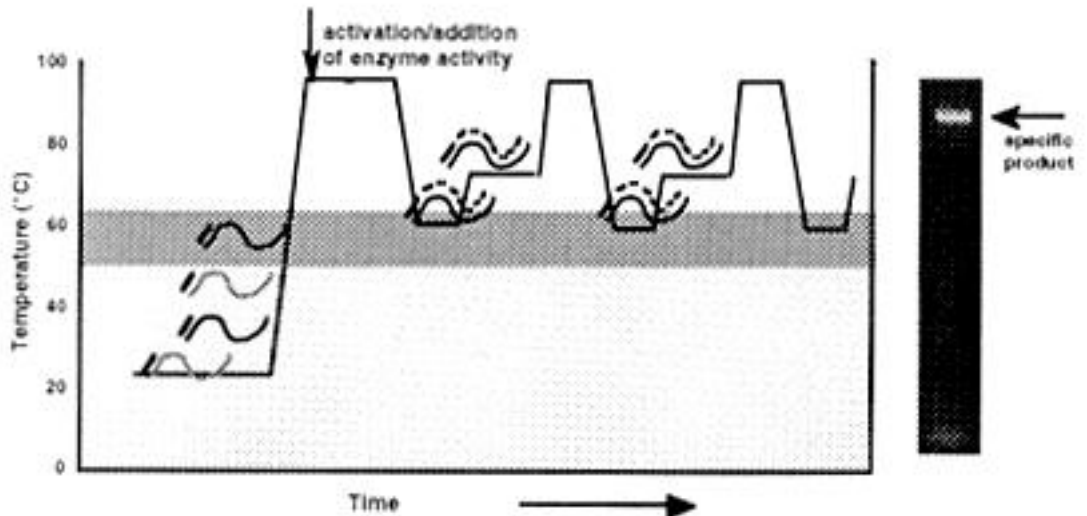
Vantagem:

se não há amplificação de produtos inespecíficos, há aumento da especificidade e do rendimento da reação de amplificação.

Conventional PCR



Hot Start PCR



Alguns “aditivos” podem aumentar a especificidade e o rendimento da PCR

- Glycerol (5 - 20%)
- Detergentes
- Formamida (1,25 - 10%)
- Albumina sérica bovina (10 - 100 $\mu\text{g/ml}$)
- Betaína
- Tetrametilamônio (TMAC)



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Quantidade de enzima:

- Se é observado pouco produto de PCR ou nenhum produto, o problema pode ser a quantidade de enzima.
- Quando se usa enzima com atividade corretiva, deve-se usar uma quantidade maior, porque a processividade destas enzimas é menor.
- Se possível, reduza a temperatura e o tempo de desnaturação.

Caso não consiga amplificação com uma dada enzima, teste outras enzimas.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Qualidade do “template”:

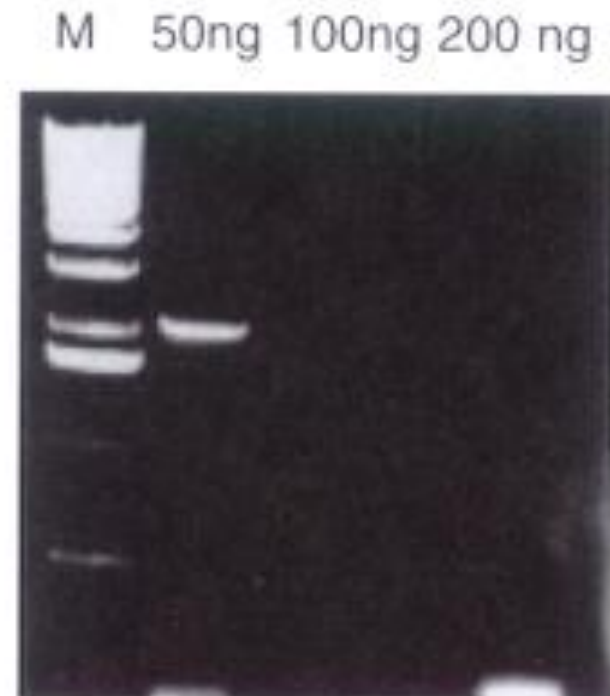
Contaminantes da amostra de DNA podem inibir fortemente a reação de PCR.

Amostras de DNA com cor estranha podem não ser amplificadas.

Inibem a enzima:

- Fenol
- Proteinase K
- Agentes quelantes em excesso (EDTA)
- Elevadas concentrações de sal
- Hemoglobina e outras proteínas das hemácias
- SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

Efeito da diluição de contaminantes



Embrapa

Sugestões de solução para “smears”:

- Reduza a quantidade de DNA
- Aumente a temperatura de “annealing” – em passos de 2°C
- Reduza a concentração de enzima – em passos de 0,5 U
- Reduza a concentração de Mg^{2+} - em passos de 0,1 mM
- Aumente o tempo de desnaturação – em passos de 5 s
- Aumente a temperatura de desnaturação – em passos de 1°C
- Reduza o número de ciclos – em 5 a 10 ciclos
- Faça *hot start*
- Faça *touch down*
- Reduza o tempo de extensão
- Reveja o desenho dos “primers”



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

Atentar

- Taxa de incorporação de bases erradas durante a PCR, que pode variar entre 10^{-3} a 10^{-6} , dependendo especialmente das concentrações de Mg^{2+} e dNTPs;

- a incorporação de base errada (*mismatch*) reduz a estabilidade da interação da enzima com o DNA que está sendo copiado, favorecendo a interrupção da polimerização.

- Temperatura de extensão e elevada concentração de dNTPs, visto favorecer a extensão de “primers” com pareamento imperfeito e a extensão após *mismatch*.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



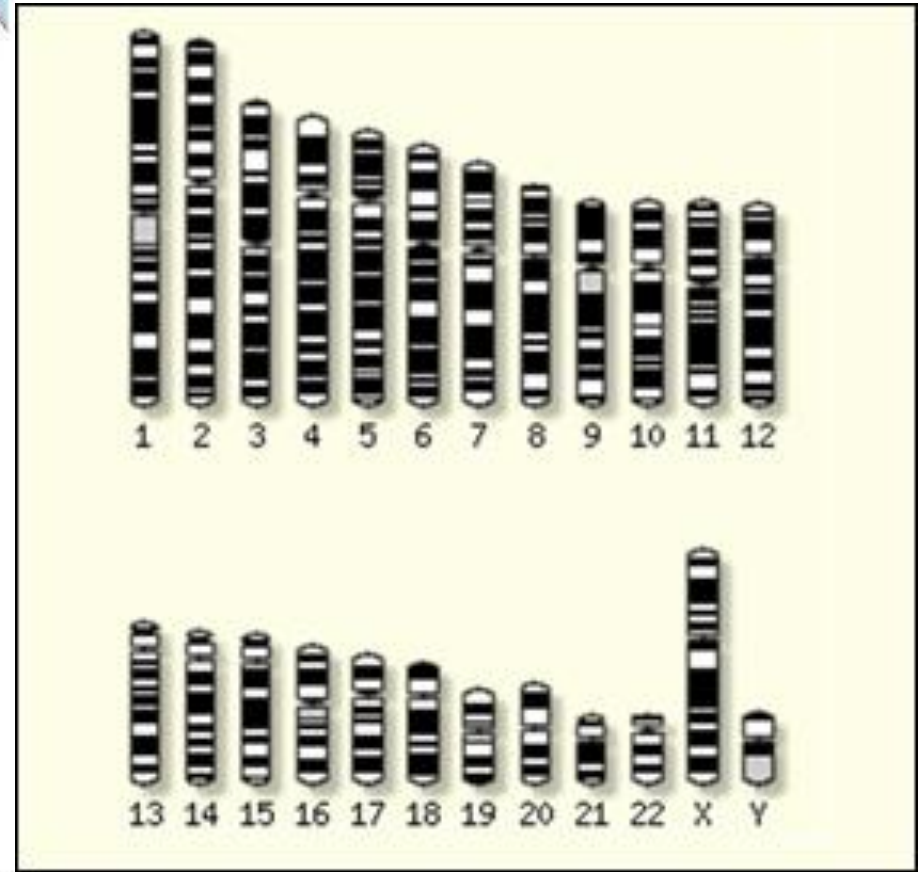
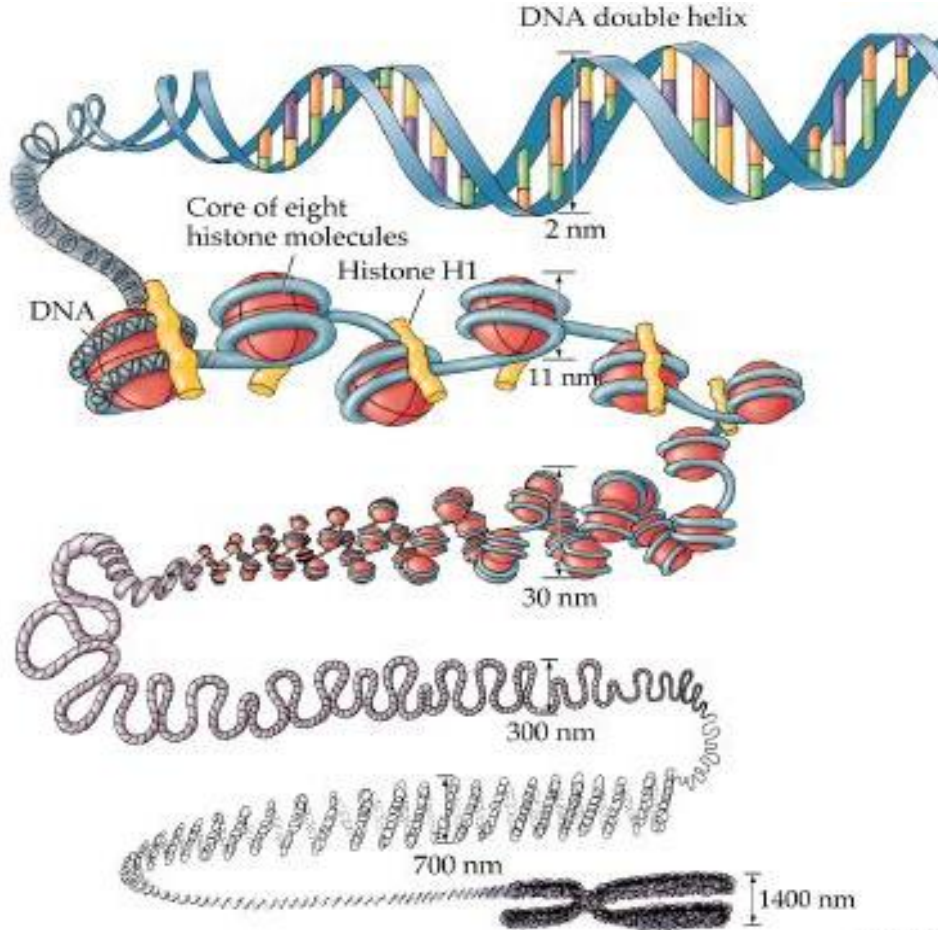
Teste de paternidade e maternidade em DNA



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



•O DNA pode ser detectado no núcleo de qualquer célula de um organismo, dentro dos cromossomos. - **Exceção das células hemácias , pois não possuem núcleo.**



Empacotamento do DNA

Padrões de bandas cromossômicas



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



- O DNA de cada indivíduo é formado no momento da concepção e jamais mudará, mesmo depois da morte.
- Todas as pessoas apresentam um padrão único em seu DNA, menos os gêmeos univitelinos.
- O DNA é exatamente igual em todas as células do corpo.

DNA da raiz do cabelo = DNA das células da pele

- No exame em DNA para determinação da paternidade o material coletado é preferencialmente o **sangue venoso do braço**.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



O QUE É O TESTE EM DNA?

- É o meio mais preciso disponível atualmente para determinação de paternidades ou maternidades duvidosas.
- Supera em muito os outros sistemas utilizados anteriormente
Ex: ABO, Rh, HLA, etc.
- O DNA é o único tipo de perícia sangüínea que resolve todas estas dúvidas deixadas pelos outros exames.

•COLETA DO MATERIAL → SANGUE VENOSO → MAIOR QUANTIDADE DE CÉLULAS BRANCAS



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



É POSSÍVEL DETERMINAÇÃO DE PATERNIDADE ATRAVÉS DO FIO DE CABELO?

- Pode ser feito preferencialmente através da raiz – **maior quantidade de DNA.**

OBS: O teste deve ser feito com o consentimento das partes envolvidas, salvo em casos criminais.

Quando normalmente não se utiliza células brancas do sangue coletado?

- Quando há fortes suspeitas de transfusão de sangue ou transplante de medula feito em até 90 dias antes do exame ou em casos criminais.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



EXATIDÃO DO TESTE

- A probabilidade de detectar o pai biológico varia de 99,99% a 99,9999% → **considerado absolutamente preciso**
- Um resultado de **exclusão** significa com **100% de certeza** que o suposto pai não é o pai biológico.

A MELHOR METODOLOGIA PARA EXAME EM DNA É A QUE UTILIZA SONDAS MULTI-LOCAIS OU AS UNI-LOCAIS?

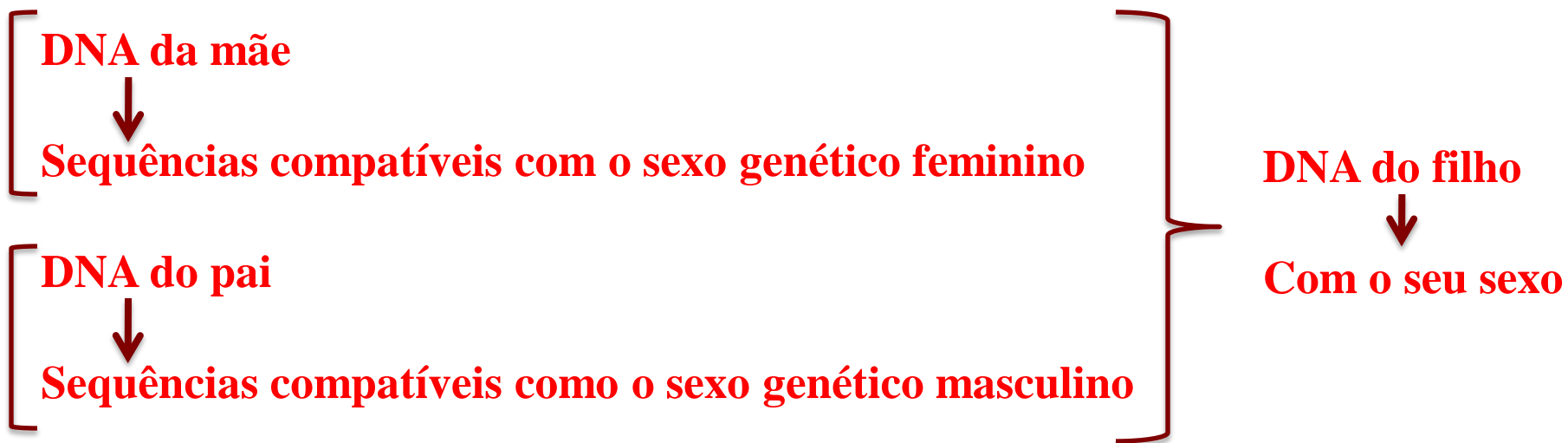
- Não existe metodologia melhor ou pior → **depende unicamente da experiência de cada laboratório**



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



O DNA de cada indivíduo será testado para seqüências DNA específico de indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino



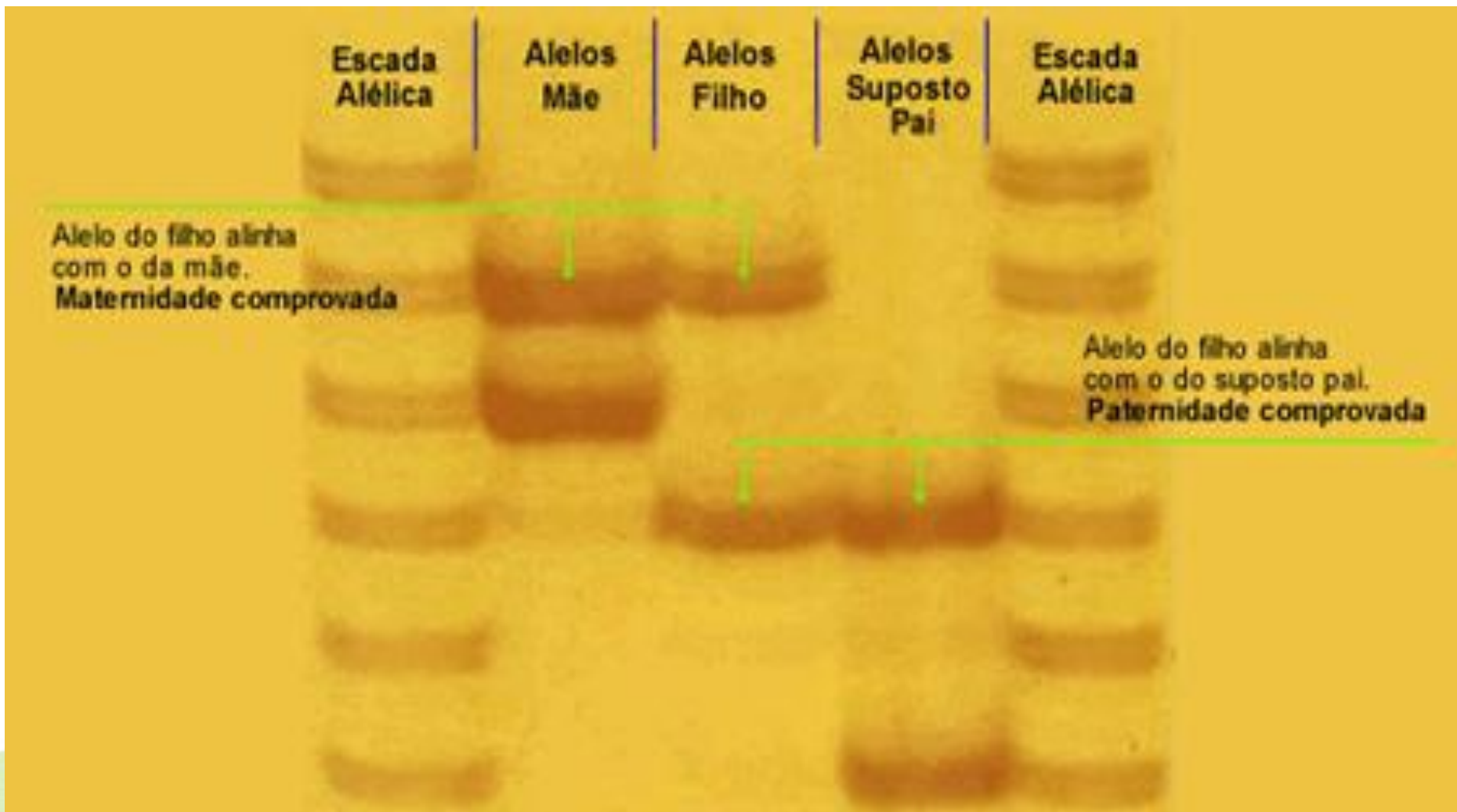
•Este procedimento é realizado como mais um controle para evitar trocas de amostras.

•Após análises, ao constatar o pai biológico, o exame deverá ser repetido.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento





Exemplo de resultado do teste de paternidade

- As análises devem ser feitas por profissionais que recebam treinamento especial para adotar os rígidos controles de qualidade essenciais a este tipo de exame.

Quanto as pessoas submetidas ao teste

- Podem fazer o teste mesmo sob o uso de medicamentos
- **O uso de bebidas alcoólicas e de drogas também não afetam o exame.**
- Não há necessidade de jejum ou de mudanças na rotina
- Não há limite de idade
- Quantidades mínimas de DNA podem ser utilizadas → Pode ser feita a multiplicação por PCR



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



- Pode ser feito antes do nascimento através do DNA contido nas células do líquido amniótico ou das vilosidades coriônicas → Pode ser feita a multiplicação por PCR

- **O teste pode ser feito na ausência dos indivíduos (mortos ou não disponíveis) utilizando os seguintes materiais:**

- 1- Sangue coletado previamente e depositado em Banco de DNA ad perpetuum.

- 2- Material de exumação (ossos, dentes).

- **O material genético de um indivíduo pode ser guardado para uso futuro em teste de paternidade → Banco de DNA**



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Obrigada!



Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL