



1 2



9 0

FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

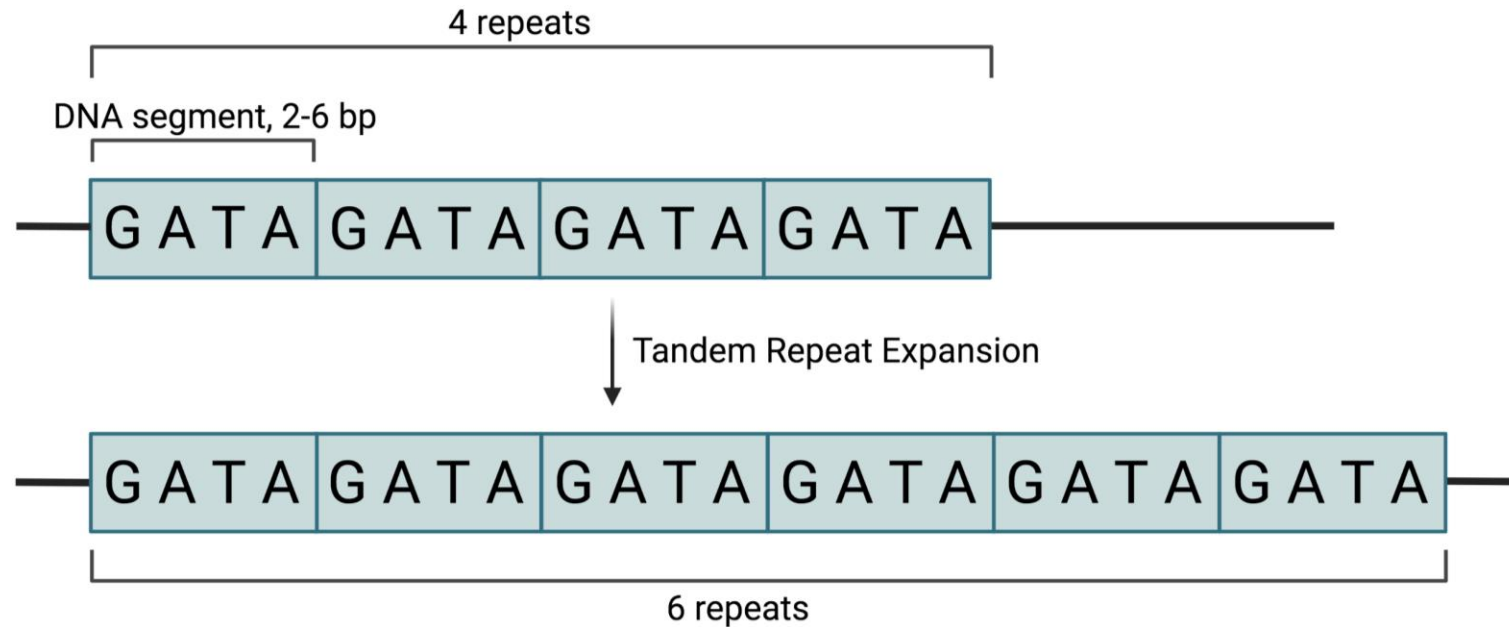
Introdução da Tecnologia NGS em Genética Forense

Novos marcadores genéticos do tipo Microhaplotipos

Rui Nascimento

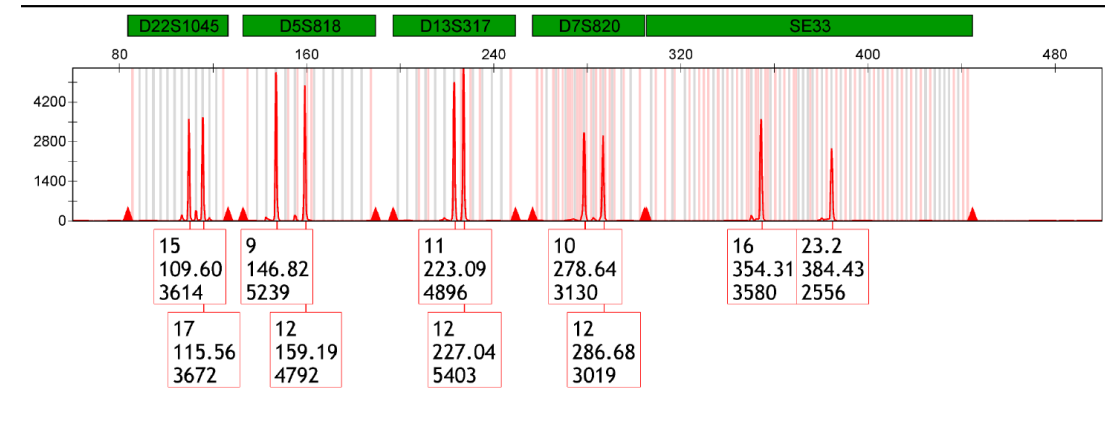
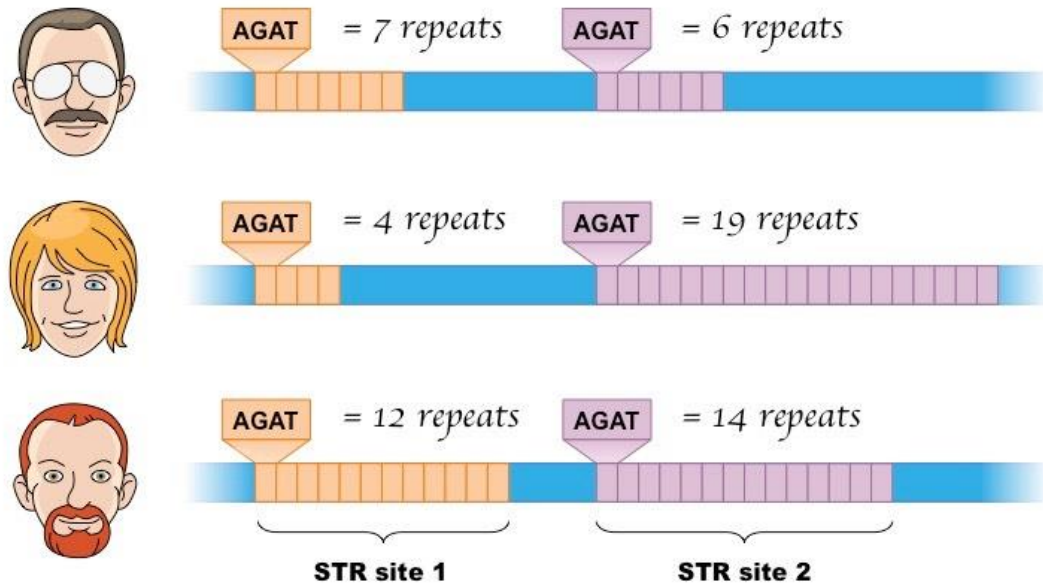
Métodos de análise de DNA convencionais

Microssatélites (STR)



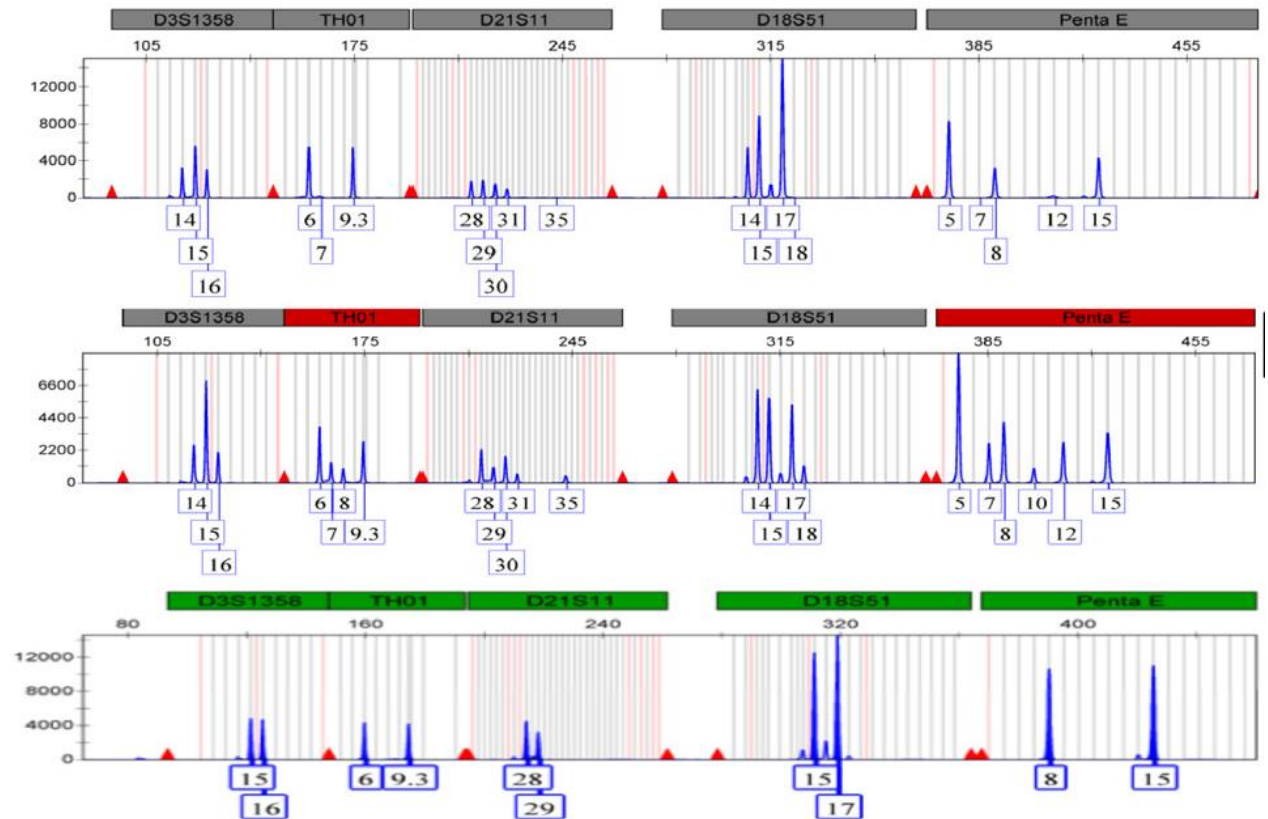
Adaptado de: DOI: 10.1186/s13059-021-02447-3

Análise de marcadores STR



Limitações dos marcadores STRs somente enquanto fragmentos

- Sensível à degradação
- Não é capaz de distinguir alelos isométricos
- Artefactos de PCR:
 - Fragmentos “Stutter”
 - Amplificação preferencial de alelos menores
- Interpretação de misturas complexas



Análise de STR por eletroforese capilar
Adaptado de DOI: 10.4238/gmr.15037547

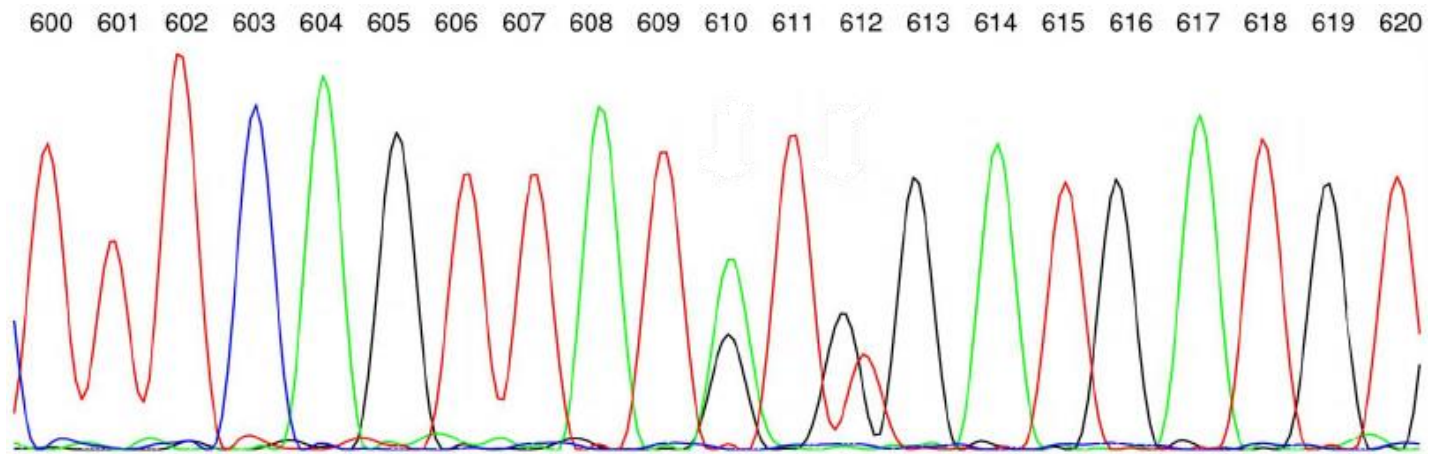
Sequenciação de Sanger

Vantagens

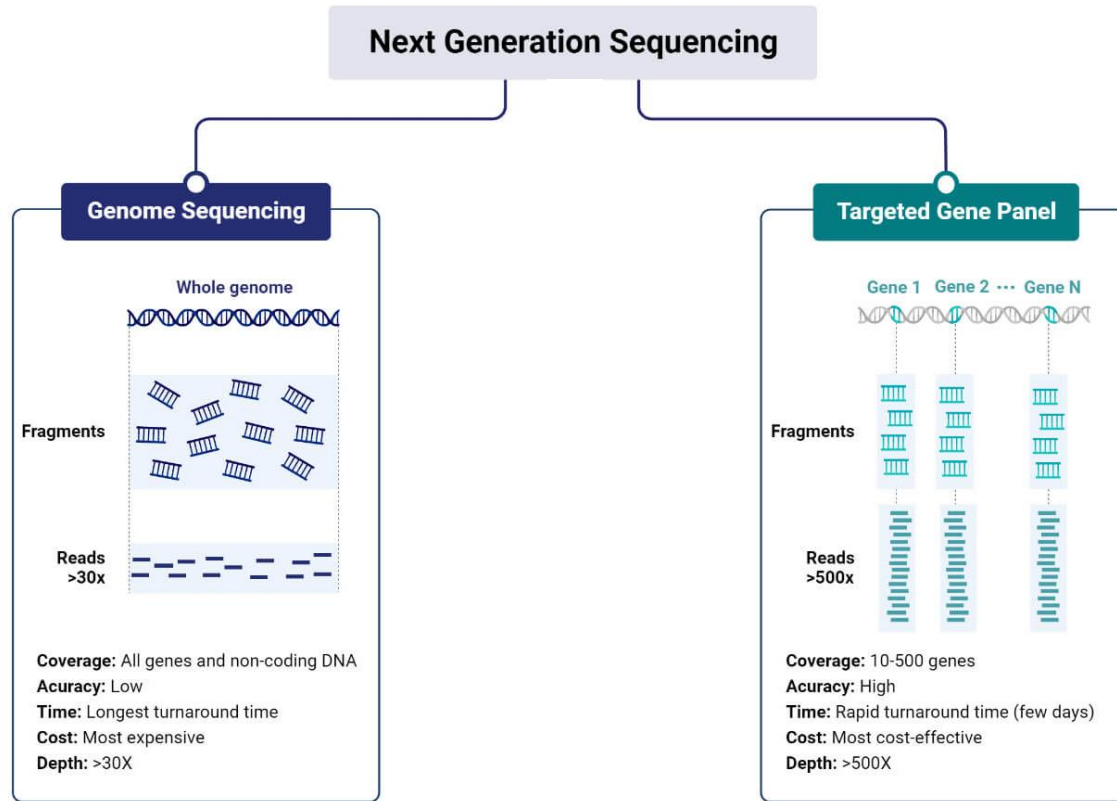
- Método de referência
- Altamente preciso
- Estabelecido em todo o mundo

Limitações

- Ineficiente para sequenciar muitos fragmentos



Em que consiste as tecnologias de NGS



Sequenciação Massiva Paralela (MPS)

- Capaz de analisar múltiplas regiões genéticas
- Múltiplas amostras em simultâneo
- Sensibilidade e precisão elevadas
- Maior robustez em amostras degradadas
- Distinção entre alelos isométricos
- Análise de todos tipos de marcadores

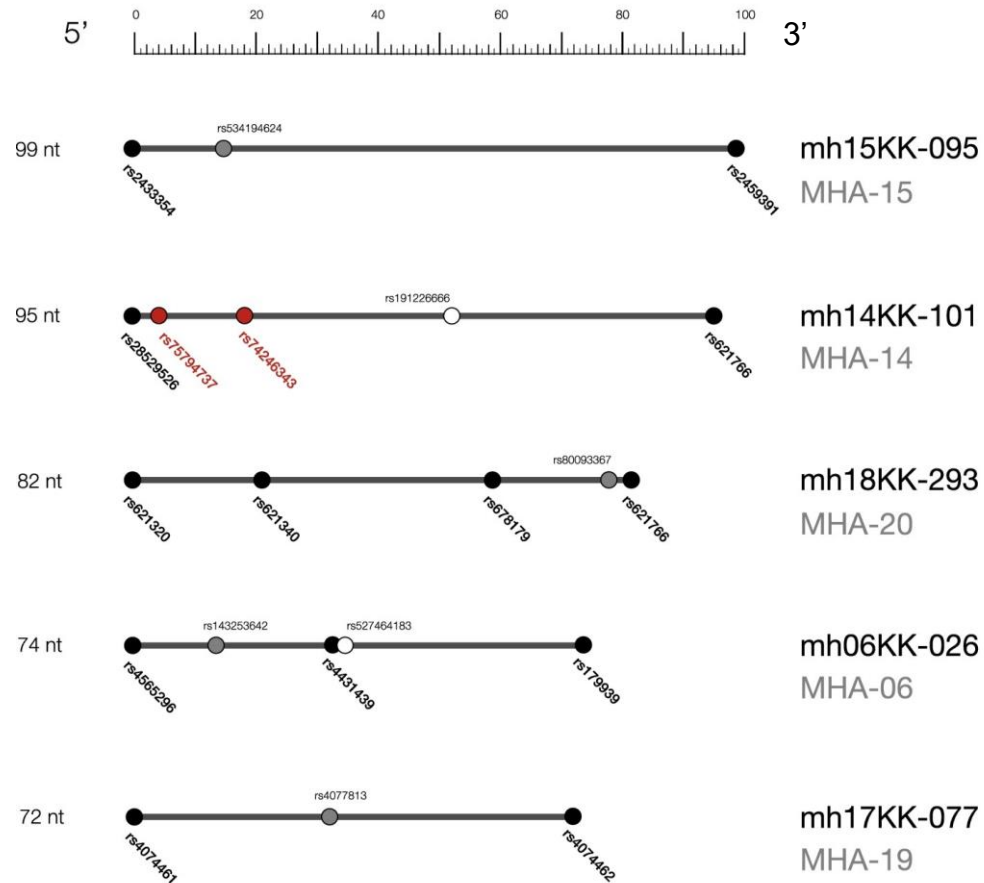
Em que consiste as tecnologias de NGS

Tipo de Marcador	Método		
	Eletroforese Capilar	Chip typing	NGS (MPS)
STR	Sim	Não	Sim
Indel	Sim	Limitada	Sim
SNP	Limitado	Sim	Sim
Microhaplótipos	Não	Não	Sim

Sequenciação Massiva Paralela (MPS)

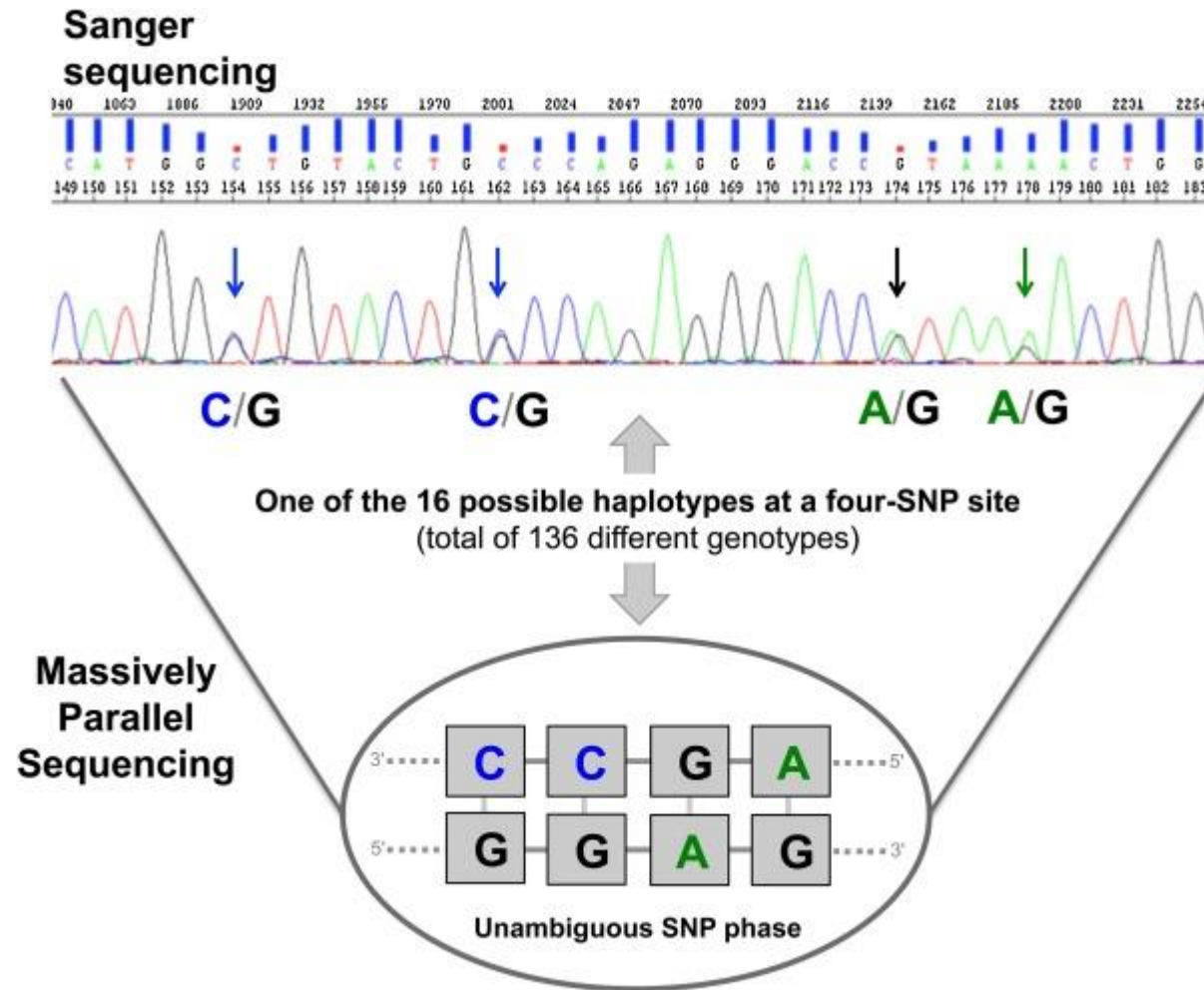
- Capaz de analisar múltiplas regiões genéticas
- Múltiplas amostras em simultâneo
- Sensibilidade e precisão elevadas
- Maior robustez em amostras degradadas
- Distinção entre alelos isométricos
- Análise de todos tipos de marcadores

O que são Microhaplotipos

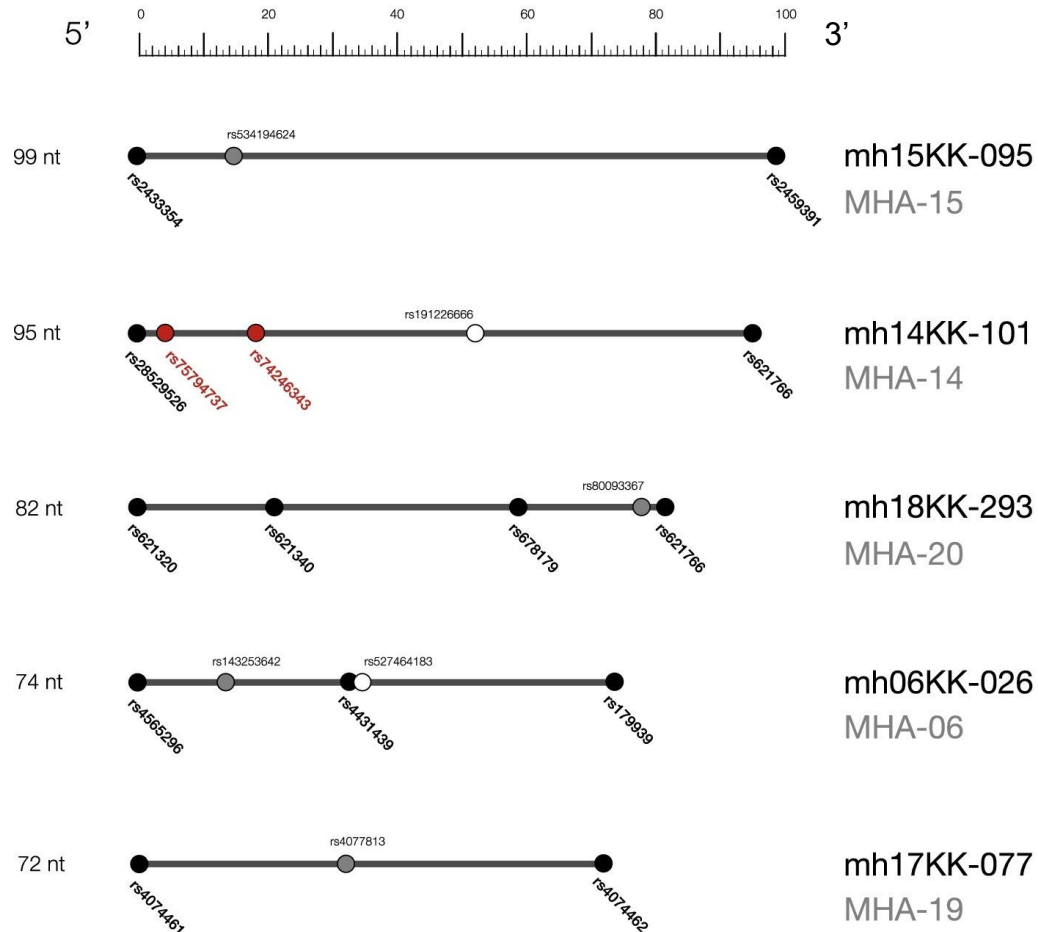


- 2 ou mais SNPs
- Pequenas sequências (<200bp)
- Baixa taxa de recombinação (haplótipo)

Introdução aos Microhaplotipos



Microhaplotipos vs STRs



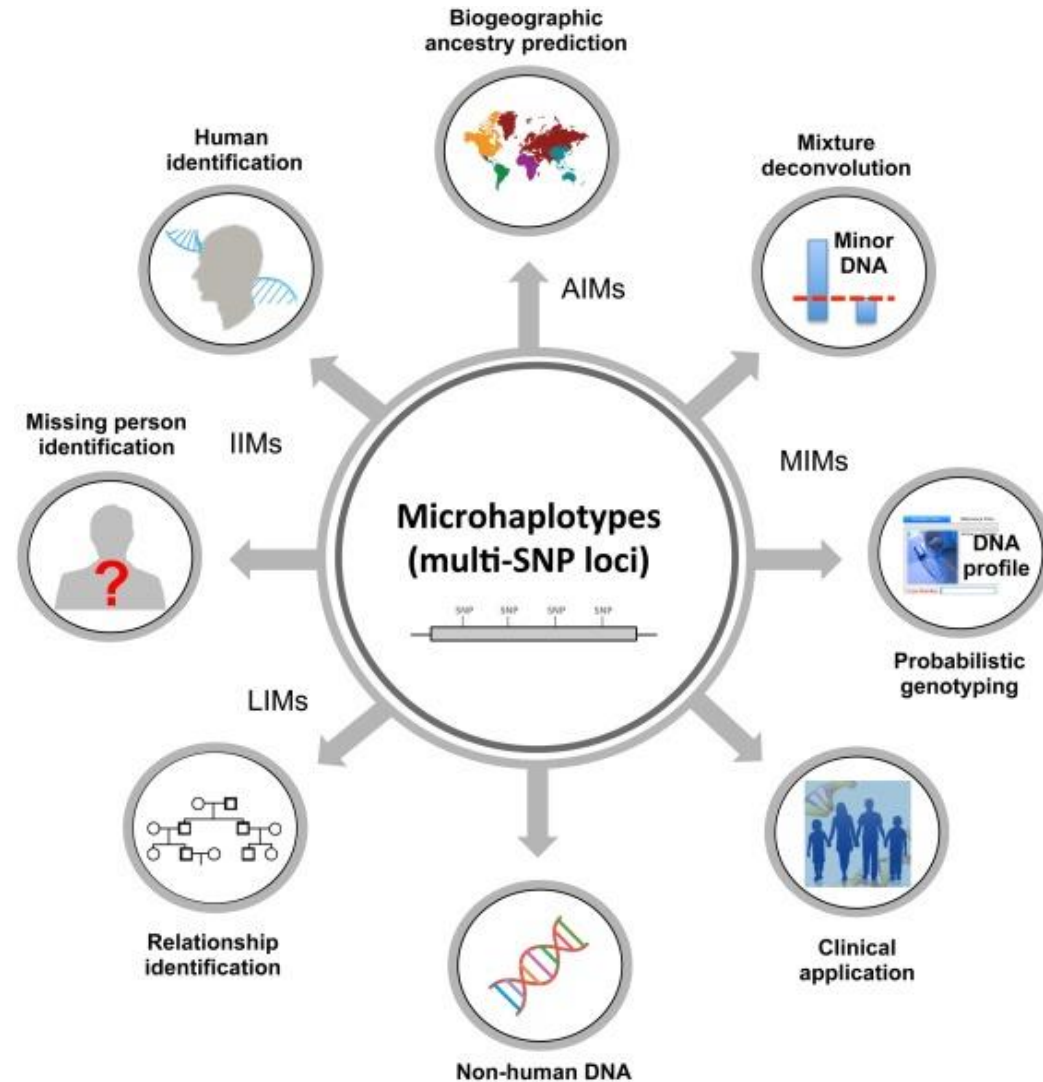
Vantagens relativamente aos STRs:

- Não apresentam amplificação preferencial
- Sem fragmentos “stutter”
- Menor taxa de mutação
- Informação de ancestralidade

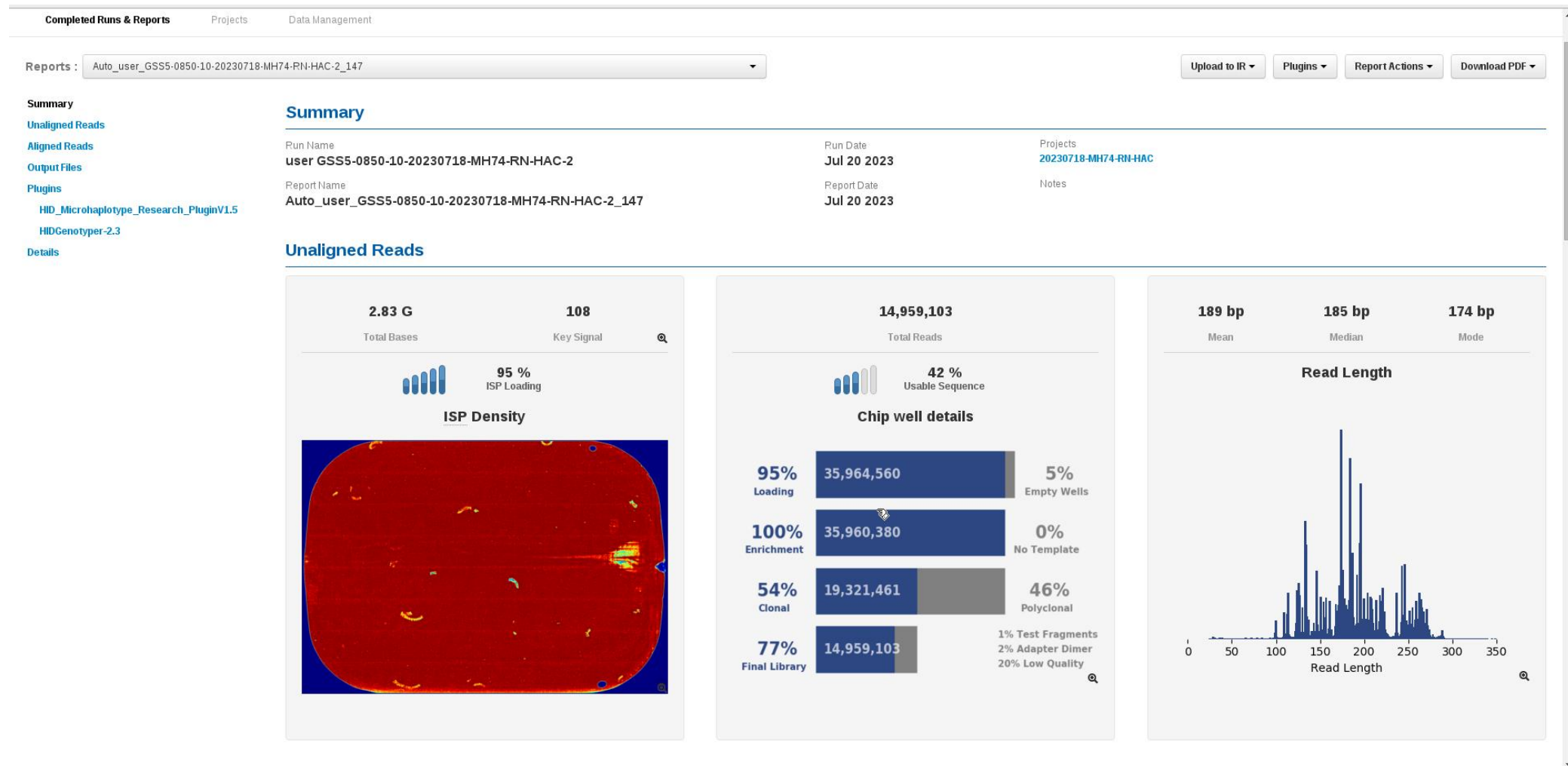
Desvantagens relativamente aos STRs:

- Menos alelos
- Painéis com mais marcadores

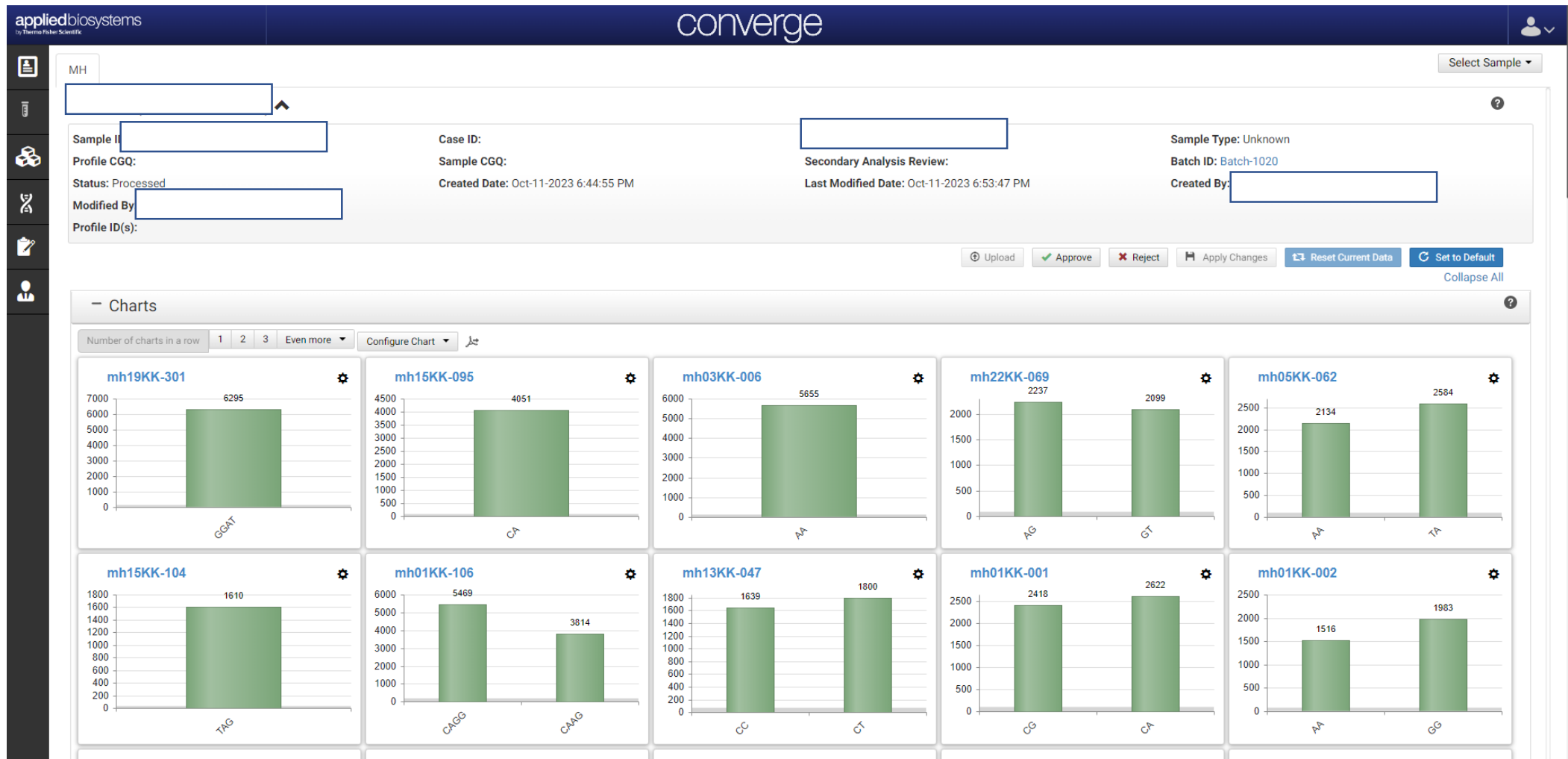
Aplicações dos Microhaplotipos em Genética Forense



Estudo de Microhaplotipos no SGBF-S



Estudo de Microhaplotipos no SGBF-S



SNPs de identidade

Locus	Position	Genotype	Coverage	Allele Freq A T G C	Coverage%	QC	Exclude Locus	IGV	Analysis
rs2046361	chr4:10969059	AA	7265				☐		
rs10776839	chr9:137417308	GG	5867				☐		
rs354439	chr13:106938411	AT	13562				☐		
rs717302	chr5:2879395	AG	10829				☐		
rs993934	chr2:124109213	AG	4510				☐		
rs901398	chr11:11096221	CT	13027				☐		
rs4364205	chr3:32417644	GG	12814				☐		
rs6955448	chr7:4310365	CC	8785				☐		
rs560681	chr1:160786670	AA	14617				☐		
rs1490413	chr1:4367323	AG	12170				☐		
rs2076848	chr11:134667546	TT	7708				☐		
rs159606	chr5:17374898	AG	10577				☐		
rs10488710	chr11:115207176	CG	3179				☐		
rs9951171	chr18:9749879	AA	9522				☐		
rs729172	chr16:5606197	GT	7235				☐		
rs10773760	chr12:130761696	AA	15270				☐		
rs1335873	chr13:20901724	AT	14297				☐		
rs6444724	chr3:193207380	TT	5828				☐		
rs214955	chr6:152697706	CC	7779				☐		
rs914165	chr21:42415929	AG	12799				☐		
rs2016276	chr15:24571796	TT	10944				☐		
rs740910	chr17:5706623	AA	7873				☐		
rs1736442	chr18:55225777	TT	13101				☐		
rs1357617	chr3:961782	TT	10620				☐		
rs7520386	chr1:14155402	AG	6548				☐		
rs1523537	chr20:51296162	TT	11231				☐		
rs964681	chr10:132698419	CT	6452				☐		
rs10495407	chr1:238439308	AG	14810				☐		
rs9905977	chr17:2919393	AG	14515				☐		
rs876724	chr2:114974	CT	8547				☐		

SNPs do cromossoma Y

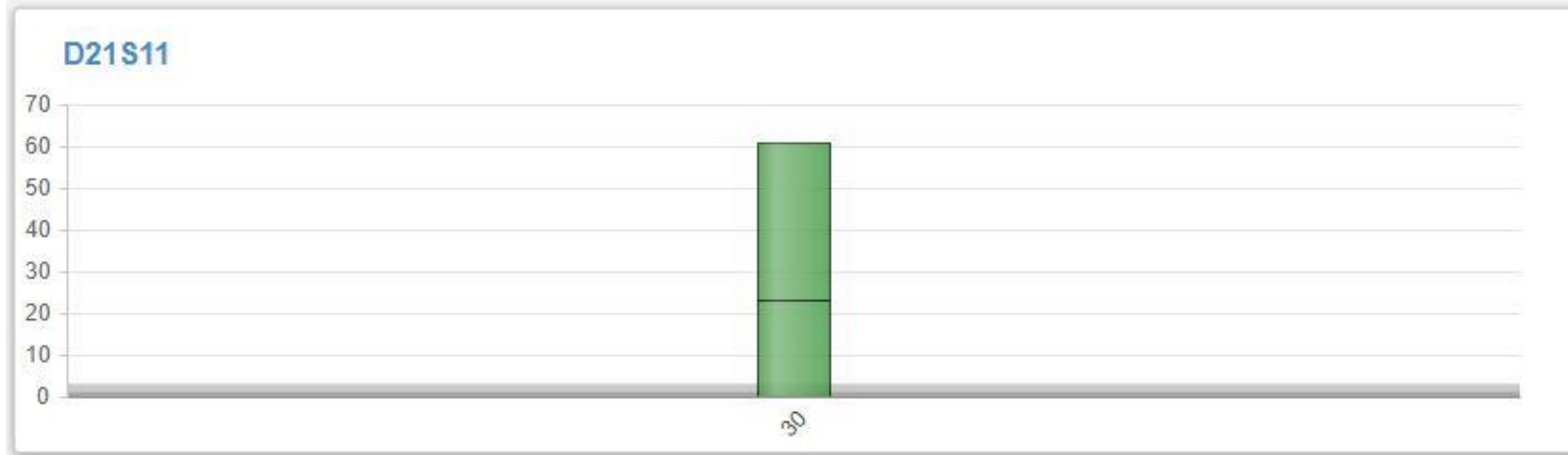
Locus	Position	Genotype	Coverage	Allele Freq A T G C	Coverage% + -	QC	Exclude Locus	IGV	Analysis
rs20320	chrY:14898163	G	5678						
L298	chrY:8467290	T	4906						
rs17269816	chrY:17053771	C	8379						
P202	chrY:14001024	T	3745						
rs2032602	chrY:14954280	T	4659						
rs17222573	chrY:17891241	A	6845						
rs16981290	chrY:7568568	C	4973						
rs2534636	chrY:2657176	C	4108						
rs3911	chrY:21733454	A	4376						
rs9341278	chrY:15469724	G	3106						
rs35284970	chrY:2734854	C	4130						
rs2032673	chrY:21894058	T	5130						
rs2032636	chrY:15027529	G	6311						
rs17250845	chrY:8418927	G	5779						
rs17842518	chrY:23443971	G	6055						
rs2032652	chrY:21917313	T	8829						
rs3848982	chrY:21717208	C	6135						
P256	chrY:8685230	G	5388						
rs9786139	chrY:6753519	G	10006						
M479	chrY:20834667	C	2844						
rs2032595	chrY:14813991	T	3880						
rs2319818	chrY:16354708	G	7218						
rs16980426	chrY:22214221	T	10768						
rs3900	chrY:21730257	G	8349						
rs2032658	chrY:15581983	G	3268						
rs2033003	chrY:23550924	C	8491						
rs2032631	chrY:21867787	A	3819						
rs13447443	chrY:22739301	A	4514						
rs2032624	chrY:15026424	C	4512						
rs9786184	chrY:2887824	A	6750						
rs4141886	chrY:14197867	A	1963						

Painel de STRs por NGS



Distinção de um alelo isométrico

Allele	Status	Coverage	Sequence
30	ABOVE_ST	23	[TCTA]4 [TCTG]6 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]12
30	ABOVE_ST	38	[TCTA]6 [TCTG]5 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]11



Combinação de Marcadores

Allele	Status	Coverage	Sequence	Long Sequence	Ref/Alt	RS Id's	SNP/Indel Location
12 ▾	ABOVE_ST	5739	[TCTA]1 [TCTG]1	vWA[CE12]-chr12-hg19 6093143-6093210 [TCTA]1 [TCTG]1 [TCTA]1 [TCTG]4 [TCTA]1 [TCTG]4			
12		5665	[TCTA]1 [TCTG]1 [TCTA]1 [TCTG]4 [TCTA]3 TCCA[TCTA]1	vWA[CE12]-chr12-hg19 6093143-6093210 [TCTA]1 [TCTG]1 [TCTA]1 [TCTG]4 [TCTA]3 TCCA[TCTA]1 6093136-G	A/G	rs75219269	
15 ▾	ABOVE_ST	6153	[TCTA]1 [TCTG]1	vWA[CE15]-chr12-hg19 6093143-6093210 [TCTA]1 [TCTG]1 [TCTA]1 [TCTG]4 [TCTA]1 [TCTG]4			
15		6101	[TCTA]1 [TCTG]1 [TCTA]1 [TCTG]4 [TCTA]3 TCCA[TCTA]3 TCCA	vWA[CE15]-chr12-hg19 6093143-6093210 [TCTA]1 [TCTG]1 [TCTA]1 [TCTG]4 [TCTA]3 TCCA[TCTA]3 TCCA 6093136-G	A/G	rs75219269	



AN:

Expected Allele Number : 1-2

OL :

Expected Allele(s) : [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 15.2, 18.2]

Deviant(s) :

Below PHR

Threshold (Coverage) : 1845

Allele(s) :

Analysis Settings

Global Parameters

Left Anchor Length : 15
Left Anchor Tolerance : 2
Right Anchor Length : 15
Right Anchor Tolerance : 2
Use Forward Reads : True
Use Reverse Reads : True

STR Threshold

Perspetivas futuras

Desafios na implementação da sequenciação NGS no laboratório

- Otimização de protocolos
- Validação dos métodos
- Cálculo de frequências alélicas na população
- Criação e/ou adaptação de ferramentas de análise bioinformáticas adequadas a dados de NGS
- Armazenamento a longo prazo de dados de NGS



1 2



9 0

FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Obrigado pela atenção