

Resolução de discrepâncias alélicas em marcadores STR através de tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS)

Rui Nascimento ^(1, 2), Heloísa Afonso Costa ^(1, 3), António Amorim ^(1, 4, 5 e 6)

¹Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Sul, Serviço de Genética e Biologia Forenses; ²Escola de Ciências da Vida e Ambiente da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal; ³Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal; ⁴Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal; ⁵Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Portugal; ⁶REQUIMTE, Laboratório Associado FCT, Portugal

Introdução

A tipagem de microssatélites (STRs, Short Tandem Repeats) constitui um pilar da genética forense, baseando-se na inferência dos alelos através do tamanho dos fragmentos de DNA obtido por eletroforese capilar. No entanto, a obtenção de perfis genéticos discrepantes, para um mesmo marcador STR, entre diferentes kits comerciais, levanta dúvidas quanto à veracidade dos resultados. Neste trabalho, apresentamos o caso de estudo de uma amostra forense que, quando determinado o perfil genético STR por eletroforese capilar (CE), exibiu resultados discrepantes para o *locus* D2S1338. Com o Kit de amplificação GlobalFiler™ PCR Amplification foi obtido o perfil genético 18, 23 (Figura 1A), enquanto que com o kit de amplificação PowerPlex® Fusion 6C System foi determinado o perfil genético 18, 23 (Figura 1B). Tendo em conta a ausência de evidência de *drop in* alélico, e após reanálise dos resultados, tornou se imprescindível recorrer a uma abordagem que permitisse a leitura direta da sequência, e não apenas a inferência pelo tamanho. Para tal, recorreu-se à sequenciação da amostra por tecnologias de NGS (Next Generation Sequencing), onde é possível efetuar uma sequenciação efetiva dos fragmentos, por oposição à CE, onde é analisado apenas o tamanho do fragmento (Figura 2).

Metodologia

Para o procedimento de NGS, procedeu se à extração de DNA segundo protocolos validados, seguida da construção de bibliotecas com o painel Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2. A preparação das bibliotecas e carregamento do chip foi feita de forma automática na plataforma Ion Chef™, e a sequenciação foi feita com recurso à plataforma Ion GeneStudio™ S5 System. A análise primária foi realizada no Torrent Suite™, com alinhamento das sequências ao genoma de referência (hg19). A análise secundária foi feita com recurso ao software Converge™ (Figura 3).

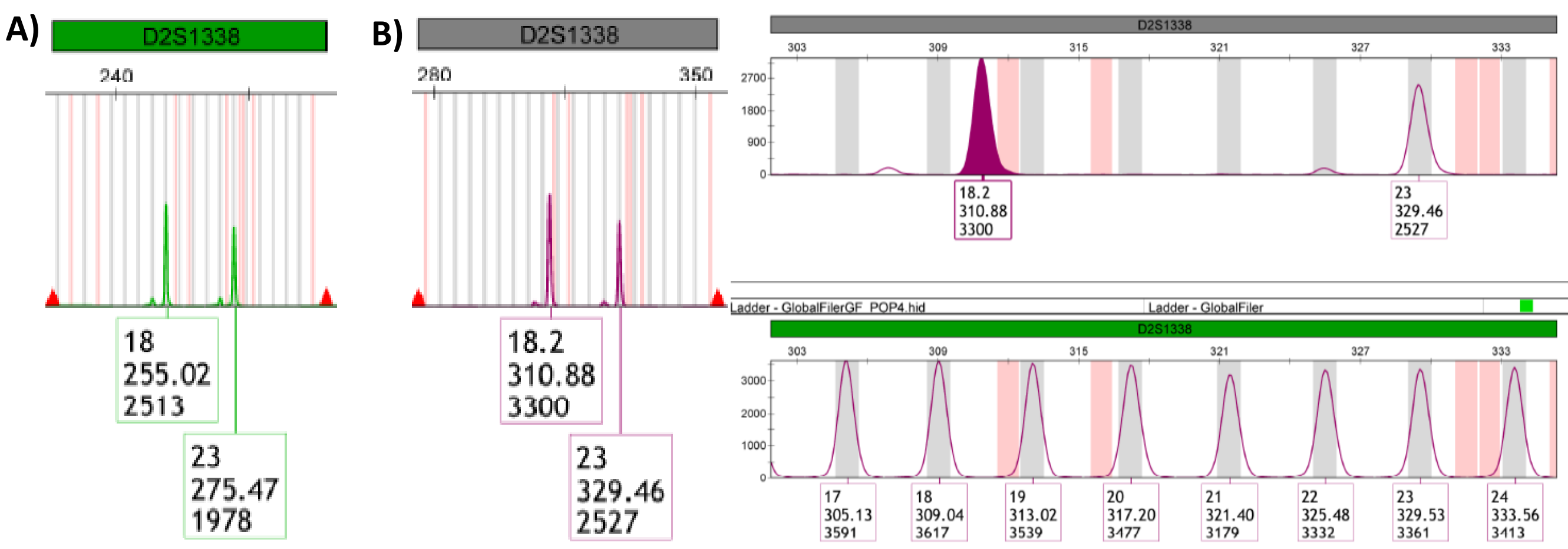


Figura 1 - Perfil genético obtido, por electroforese capilar, no marcador D2S1338 com: A) PowerPlex® Fusion 6C System; B) GlobalFiler™ PCR Amplification; e comparação do fragmento com o “allelic ladder”

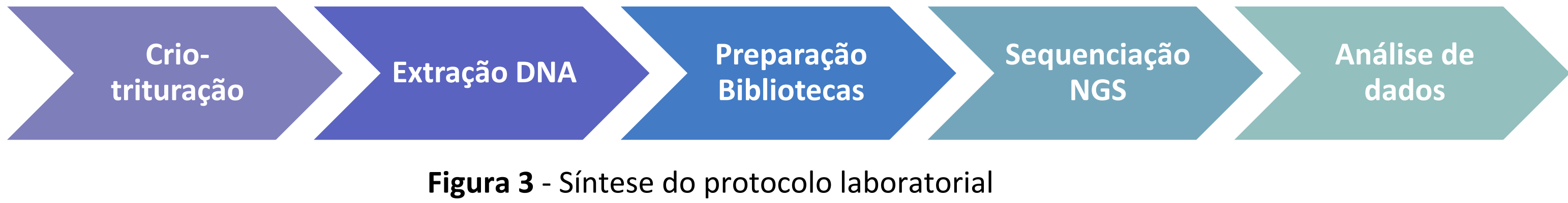


Figura 3 - Síntese do protocolo laboratorial

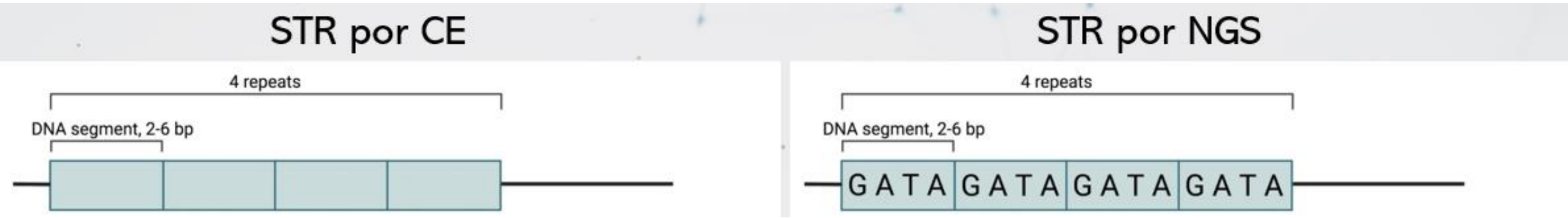


Figura 2 – Diferença entre análise de fragmentos por tamanho (CE - Eletroforese Capilar) e por sequência (sequenciação NGS)

Resultados

Os resultados de NGS confirmaram a presença efetiva dos alelos 18 e 23 no *locus* D2S1338 (Figura 4), explicando a discrepância observada entre os dois kits comerciais e validando o verdadeiro resultado para este marcador (Figura 1). A discrepância entre os resultados obtidos pelos kits utilizados na CE deveu-se provavelmente a uma mutação InDel, na zona intercalar entre a zona de ligação dos primers e o marcador STR. Uma mutação deste tipo altera o tamanho final do amplicão que irá ser observado por CE, obtendo-se assim um perfil genético incorreto para este marcador.

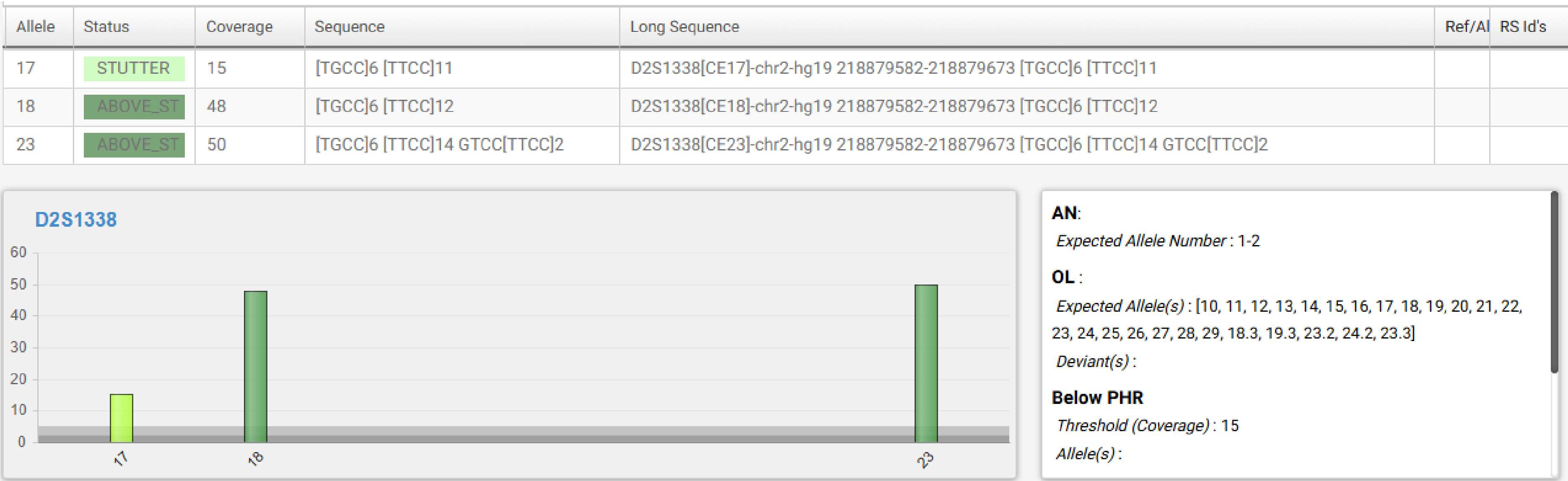


Figura 4 – Perfil genético obtido no marcador D2S1338, obtido por sequenciação NGS com o kit Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 no Ion GeneStudio™ S5 System

Conclusão

Este caso de estudo sublinha a importância da integração da tecnologia NGS como ferramenta complementar na prática forense, especialmente em situações de perfis genéticos discrepantes, mutações pontuais ou amostras degradadas. A sequenciação direta dos STRs torna a tipagem genética mais robusta e reduz ambiguidades. Esta abordagem reforça a fiabilidade dos resultados, tanto em investigações criminais como na validação de perfis em bases de dados forenses.

Referencias

1. Thermo Fisher Scientific. (2023). Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 with the HID Ion S5™/HID Ion GeneStudio™ S5 System Application Guide (Pub. No. MAN0016129).
2. Thermo Fisher Scientific. (2018). Converge™ Software v2.2 - Setup and Reference Guide (Pub. No. 100039539).
3. Thermo Fisher Scientific. (2018). Ion Chef™ Instrument User Guide (Pub. No. MAN0018668).
4. Thermo Fisher Scientific. (2018). Ion GeneStudio™ S5 Instrument User Guide (Pub. No. MAN0017528).