

ADN Mitochondrial: Estudo de Validação Interna de Metodologia de Sequenciação

22^o CONGRESSO NACIONAL
DE MEDICINA LEGAL E CIÊNCIAS FORENSES



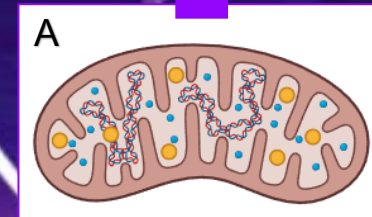
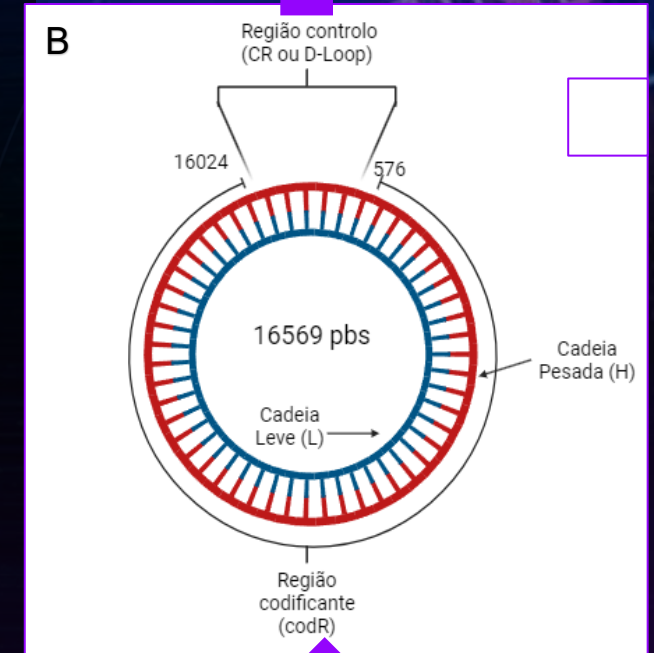
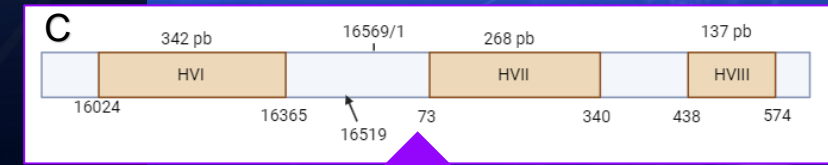
Maria Margarida Domingos

Introdução

- Mitocôndria – organelo celular, encontrado em células eucariotas.
- Possui o seu próprio genoma – ADN mitocondrial.

❖ Região Controle (CR ou D-Loop):

❖ Região Codificante (codR):



(A) Mitocôndria. (B) Estrutura do ADN mitocondrial. (C) Região Controle, com regiões hipervariáveis (HVI, HVII e HVIII). Criado em BioRender

Genoma Mitocondrial

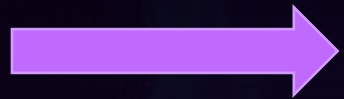


Ausência de
Recombinação

Elevado nº
de cópias

Transmissão
Materna

Elevada Taxa
de Mutação



VANTAGEM: Quantidade de ADNmt > Quantidade de ADNn
DESVANTAGEM: Elemento não individualizante

Introdução

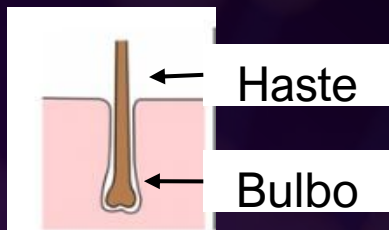
Objetivos

Metodologia

Resultados e
Discussão

Conclusão

Aplicações do ADNmt



GENÉTICA FORENSE

- Identificação ou vinculação de indivíduos a cenas de crimes (cabelos)



Cadáveres sem ADN nuclear



ADN Mitocondrial é o único meio de prova genético.

Sequencição Massiva em Paralelo

(MPS) – sequencição de segunda geração



- ❖ Sequencição do Genoma Mitochondrial completo

- ❖ Análise de múltiplas amostras biológicas em simultâneo



SEQUENCIÇÃO DE SANGER (SS) – sequencição de primeira geração

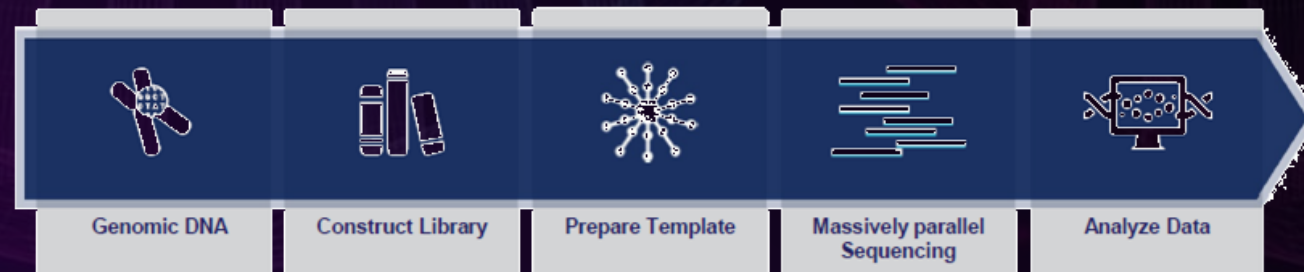
Objetivos

IMPLEMENTAÇÃO DA SEQUENCIÇÃO MASSIVA EM PARALELO (MPS)

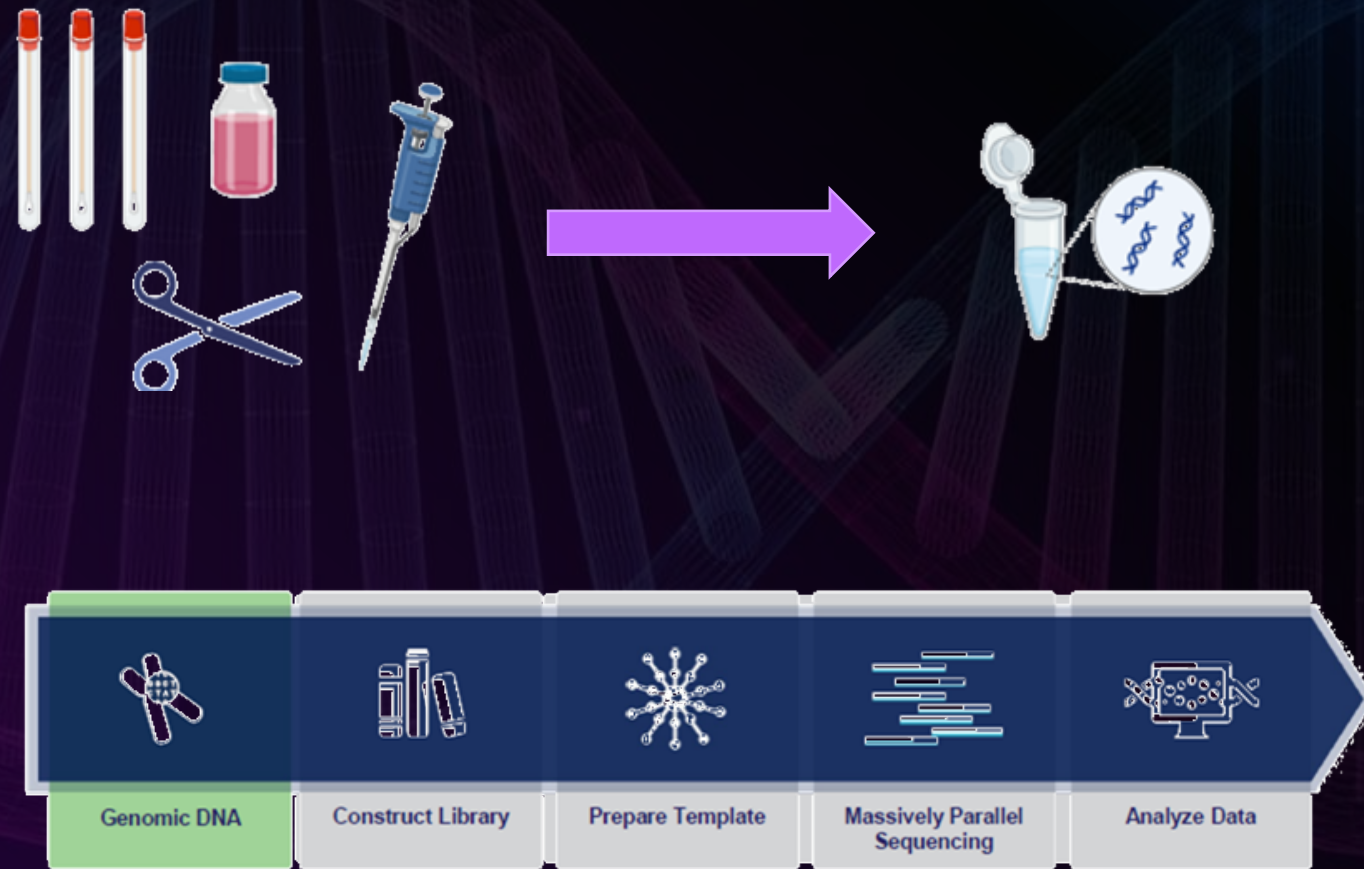
- Validação da MPS
- Região Controlo: Sanger VS MPS

A sequenciação total do mitogenoma, com MPS, vai permitir resultados de haplótipos mais completos e definição de haplogrupos mais precisos.

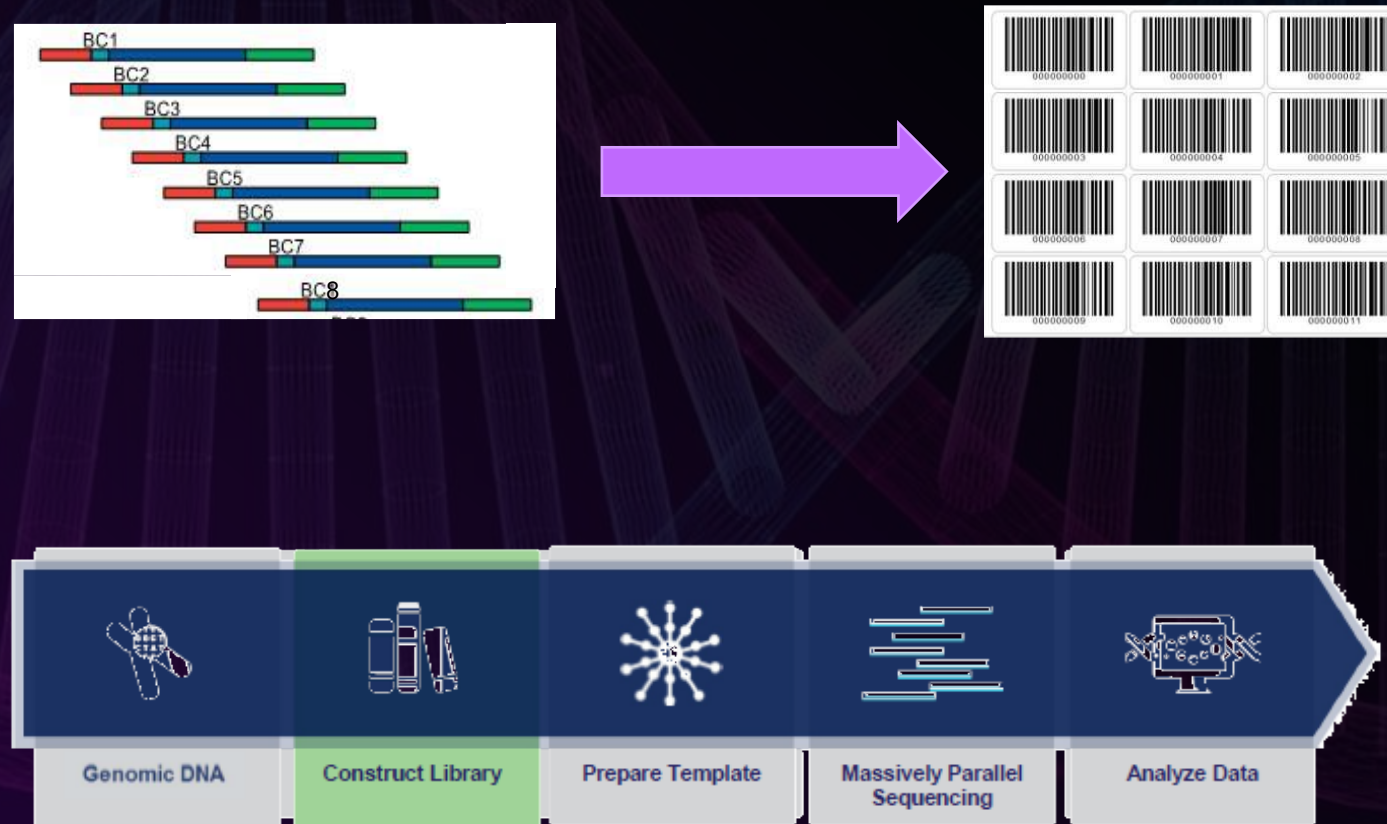
Metodologia



Metodologia



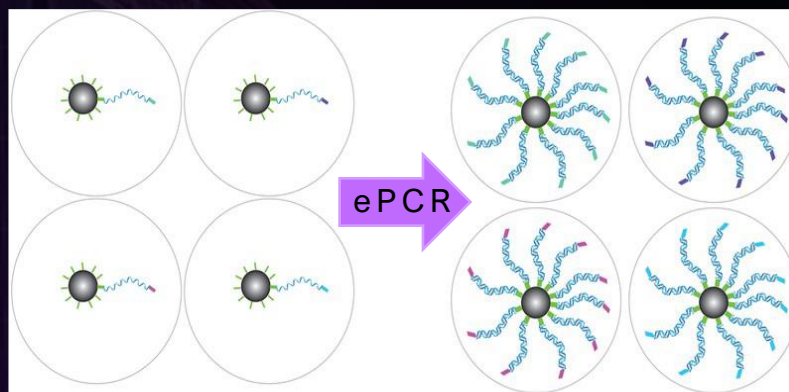
Metodologia



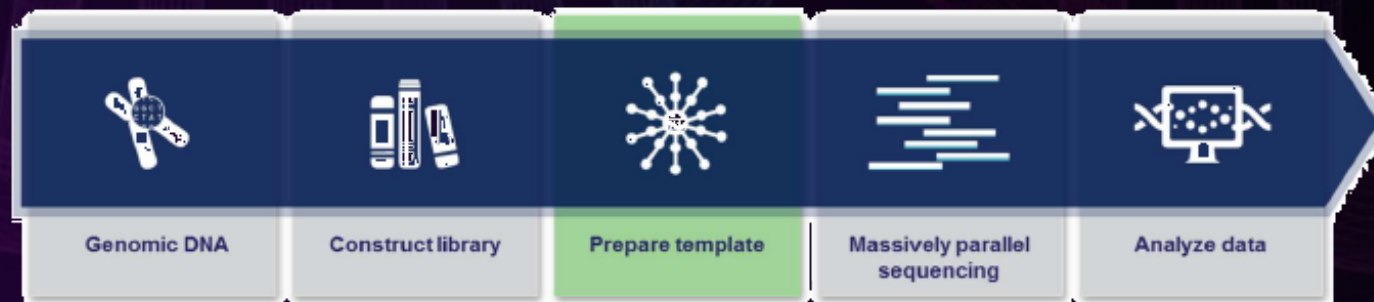
Metodologia



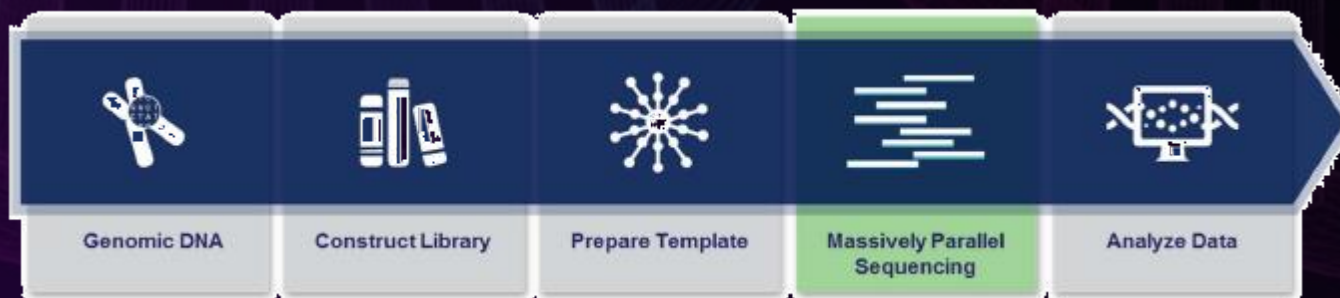
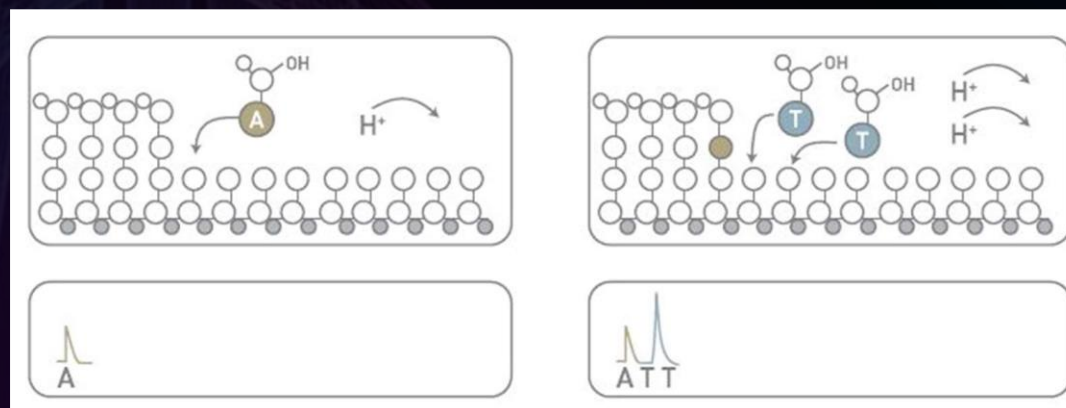
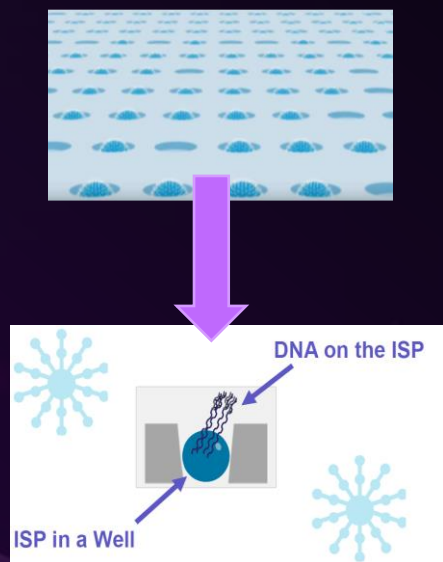
Chip



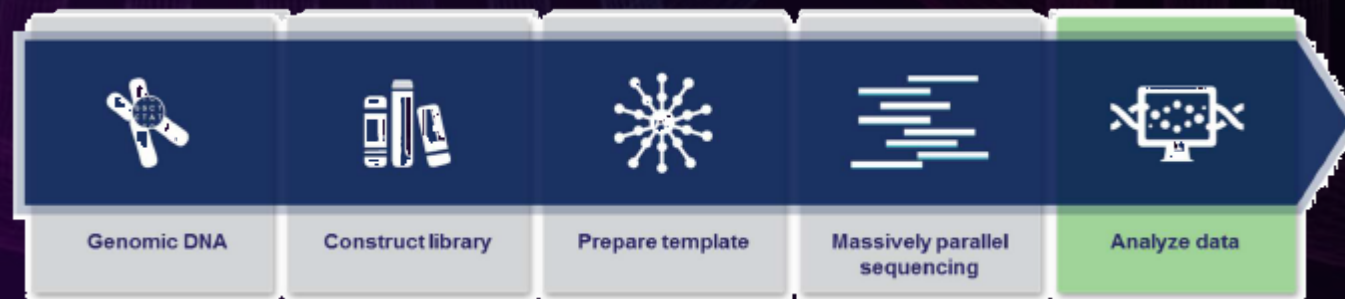
Ion Sphere Particule (ISP)



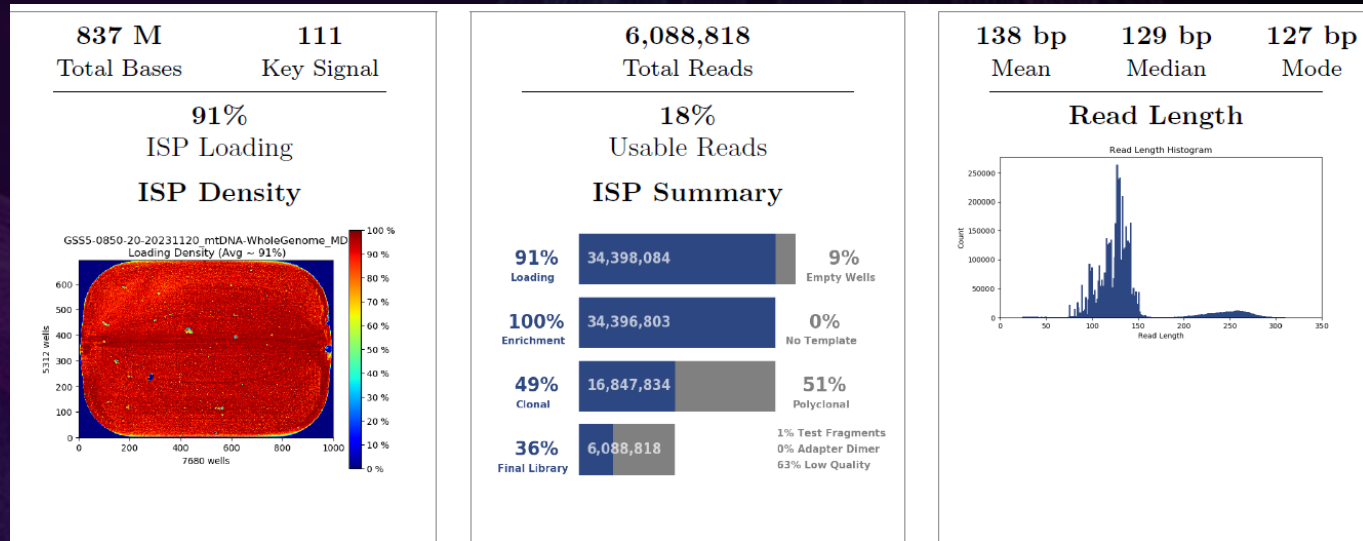
Metodologia



Metodologia



Resultados e Discussão

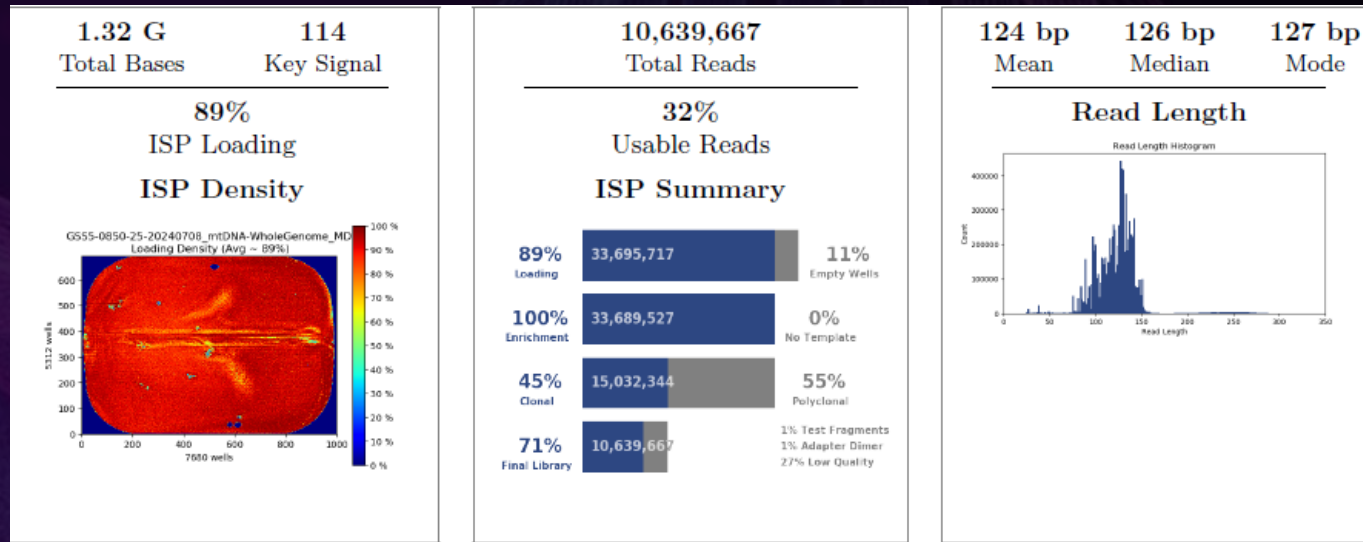


- ❖ Carregamento do chip = 91%
- ❖ Sequências utilizáveis = 18%
- ❖ Grande variação entre o número de leituras de cada amostra.

- Amostras, $C_f = 0.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- Bibliotecas, $C_f = 30 \rho\text{M}$ $V_f = 25 \mu\text{L}$

➤ Excesso de ADN mitocondrial

Resultados e Discussão



❖ Carregamento do chip = 89%

❖ Sequências utilizáveis = 32%

■ Amostras, $C_f = 0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$

■ Bibliotecas, $C_f = 20 \rho\text{M}$ $V_f = 50 \mu\text{L}$

➤ Aumento de sequências utilizáveis

➤ Equilíbrio no comprimento de leituras

Resultados e Discussão

BIBLIOTECA	AMOSTRA	MÉTODO	HAPLOGRUPO	HAPLÓTIPO																
Biblioteca Barcode 1-8	GENPOP8939	Sanger	HV14	16519C	263G	309.1C	315.1C	480C												
		MPS	H	16519C	263G	309.1C	315.1C	480C												
	GENPOP8941	Sanger	R0	16519C	263G	315.1C														
		MPS	H	16519C	263G	315.1C														
	GENPOP8942	Sanger	L3f1b1a1	16129A	16209C	16223T	16292T	16295T	16311C	16519C	73G	189G	200G	263G	272G	309.1C	315.1C			
		MPS	L3f1b1a1	16129A	16209C	16223T	16292T	16295T	16311C	16519C	73G	189G	200G	263G	272G	309.1C	315.1C			
	GENPOP8943	Sanger	U4c1	16179T	16356C	16519C	73G	150T	195C	263G	315.1C	499A	524.1A	524.2C						
		MPS	U4c1	16179T	16356C	16519C	73G	150T	195C	263G	315.1C	499A	524.AC							
	GENPOP8944	Sanger	R0	16519C	263G	315.1C														
		MPS	H	16519C	263G	315.1C														
	GENPOP8945	Sanger	R0a+60.1T	16126C	16362C	60.1T	64T	263G	315.1C	451G										
		MPS	R0a	16126C	16362C	60.1T	64T	263G	309c	315.1C	451G									
	GENPOP8946	Sanger	T2b	16126C	16294T	16296T	16304C	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C								
		MPS	T2b	16126C	16294T	16296T	16304C	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C								
	GENPOP8947	Sanger	HV0	16093C	16298C	72C	263G	309.1C	315.1C											
		MPS	V14	16093C	16298C	72C	263G	309.1C	315.1C											

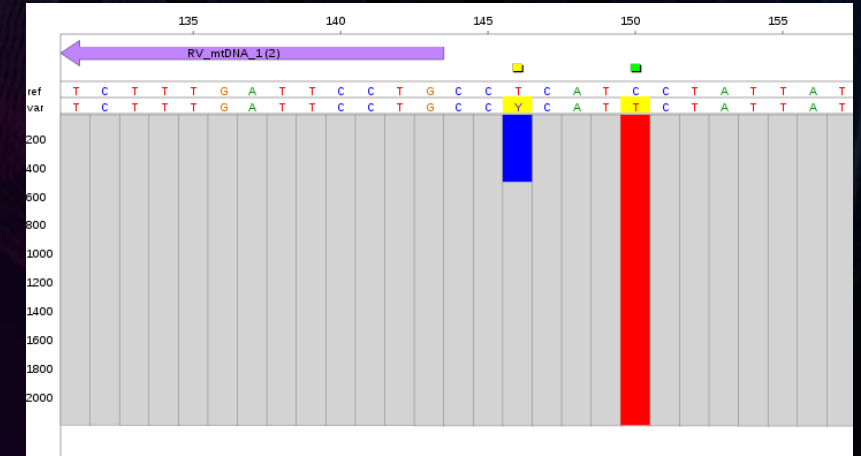
❖ Resultados da Região Controlo no MPS é compatível com a sequenciação de Sanger.

Resultados e Discussão

AMOSTRA	MÉTODO	HAPLOGRUPO	HAPLÓTIPO					
GENPOP8919	Sanger	HV	16311C	16519C		150T	263G	315.1C
	MPS	H1e1a1	16311C	16519C	146Y	150T	263G	315.1C

- ❖ Sanger – não deteta nada na posição 146
- ❖ MPS – substituição na posição 146Y
 - Nesta posição pode ter um nucleótido T ou C.

Variant	Frequency ⓘ
146Y	21.56





Conclusão

Com este estudo:

- ❖ MPS foi validada – casos forenses
- ❖ Haplótipos determinados foram coincidentes entre SS e MPS.
- ❖ MPS elimina a utilização de lasers, scanners, câmaras de deteção e nucleotídeos modificados.





Ciências
ULisboa

Faculdade
de Ciências
da Universidade
de Lisboa



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



OBRIGADA

Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
Maria Margarida Domingos