

# Validade da Técnica de PCR-STR na Determinação de Paternidade em DNA

\*SALMO RASKIN

## RESUMO

Até o advento do Teste em DNA, não era possível garantir se um indivíduo era ou não o filho biológico de determinado casal. Com o advento dos testes que analisam o DNA, este problema ficou definitivamente resolvido, já que agora é possível não só apenas excluir os indivíduos falsamente acusados, porém também obter probabilidades de inclusão extremamente próximas de 100%, ou seja, é possível através de Teste em DNA afirmar que um indivíduo é com certeza o genitor de determinada pessoa. A técnica de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) vem sendo utilizada há mais de 4 anos nesta área com enorme sucesso e precisão <sup>(7)</sup>. Neste artigo descrevemos porque a PCR deveria, ao nosso ver, ser amplamente aceita na realização dos Testes de Paternidade em DNA.

Palavras-Chave: Paternidade, PCR, DNA.

## SUMMARY

There is a discussion if Polymerase Chain Reaction (PCR) should or should not be used as a method to solve Paternity disputes. In this manuscript we show our opinion of why these technique has advantages over the other commonly used approaches (single locus and multilocus probes). We discuss why we have elected PCR as our method of choice in the last four years, for Paternity DNA tests.

Key Words: Paternity, PCR, DNA.

## INTRODUÇÃO

### POR QUÊ DNA?

Nos últimos cinco anos os métodos tradicionais de Investigação de Paternidade (Marcadores Sangüíneos, Séricos, Enzimáticos e Leucocitários HLA) vem sendo substituídos, nos melhores Laboratórios de Determinação de Paternidade, pelas modernas técnicas de identificação deste vínculo em DNA. Diversos estudos demonstram que cerca de 1/4 dos Testes de Determinação de Paternidade têm como resultado a exclusão de um indivíduo acusado de ser o pai biológico. Fazendo-se uso de todos os marcadores tradicionais em conjunto, a probabilidade de exclusão de um homem falsamente acusado de paternidade atinge nos melhores laboratórios uma taxa de

cerca de 95%, ou seja, em cada 100 testes realizados pelos métodos tradicionais que deveriam apontar uma exclusão, existe uma chance de que em 5 exames não se consiga provar que um indivíduo está sendo falsamente acusado, com conseqüências óbvias. Estas falhas dos exames que utilizam os marcadores tradicionais são devidas a presença muito freqüente de um mesmo marcador tradicional em diversas pessoas da população, ou seja, há uma variabilidade pequena entre indivíduos em seus marcadores tradicionais. Por exemplo, se a mãe tem um tipo sangüíneo A e o filho também possui o tipo sangüíneo A, qualquer que seja o tipo sangüíneo do suposto pai (O, A, B, AB), não será possível excluir (através da tipagem ABO) a possibilidade dele ser o pai biológico. Com

o advento das técnicas de análise em DNA para Determinação de Paternidade, todas essas falhas foram resolvidas, já que a extrema variabilidade das seqüências genéticas que constituem o DNA, faz com que a freqüência de cada marcador seja extremamente baixa na população, ou seja, uma característica (alelo) no DNA presente em um determinado indivíduo muito dificilmente estará presente em outro indivíduo da população que não seja o seu pai e/ou sua mãe biológica. Além disto o Teste em DNA é o único teste de Determinação de Paternidade capaz de confirmar o vínculo com certeza, ou seja, de afirmar que o suposto pai é o pai biológico e/ou que a mãe é realmente a mãe biológica. Em um teste em DNA feito com qualidade, todos aqueles indivíduos que não puderem ser excluídos,

\*Médico Pediatra, Especialista em Genética Clínica e Molecular pela Universidade de Vanderbilt (EUA), Membro Titular da Sociedade Brasileira de Genética Clínica, Diretor do Laboratório GENETIKA - Curitiba (PR).



## VALIDADE...

assumem automaticamente uma probabilidade de paternidade extremamente próxima de 100%. Pelos motivos técnicos acima citados, a American Association of Blood Banks (AABB), órgão máximo de supervisão, controle e regulamentação de Laboratórios que realizam exames de Determinação de Paternidade nos Estados Unidos, admite que baseado na extrema eficiência atingida atualmente pelos testes em DNA, não há mais necessidade de se realizar testes utilizando os marcadores tradicionais, a não ser em regiões onde as modernas técnicas em DNA não estejam disponíveis à população.

### REALIZAR O TESTE EM SUAS PRÓPRIAS INSTALAÇÕES OU TERCEIRIZAR?

É importante que o laboratório que se propõe a oferecer o Teste de Paternidade em DNA, seja qual for a técnica escolhida, seja especializado e esteja preparado, não só em termos de equipamentos, mas principalmente com recursos humanos capacitados para efetuar todas as etapas da técnica escolhida, dentro de suas dependências (desde a coleta de material até a entrega do laudo), reduzindo muito a possibilidade de haver alguma quebra na cadeia de custódia do material, aumentando portanto a segurança e a privacidade do exame e do resultado. Caso um laboratório opte por terceirizar este teste, é importante que receba um treinamento especializado, pois a coleta e mesmo o envio deste exame segue normas muito diferentes de outros exames de Patologia Clínica. A preferência neste caso deve ser dada para um laboratório nacional. Terceirizar um exame de Determinação de Paternidade para um laboratório do exterior não é o mesmo que terceirizar um exame da rotina de Patologia Clínica para o exterior. Assim como os povos diferem entre si, também o DNA difere não só de indivíduo para indivíduo, mas também de população para população. Os resultados dos cálculos de probabilidade de paternidade gerados tomados por base dados da população nor-

te-americana, por exemplo, podem ser substancialmente diferentes dos resultados destes mesmos cálculos quando usarmos dados genéticos da população brasileira. Para que o exame de determinação de paternidade em DNA confira resultados particularizados para as características étnicas peculiares da população brasileira, é imprescindível que se disponha de um estudo prévio das peculiaridades genéticas da nossa população. Este banco de dados não deve ser montado "a medida em que os casos vão aparecendo", sob pena de comprometer os resultados dos primeiros exames, e como consequência abalar a confiabilidade no laboratório. Outro pré-requisito para absoluta segurança dos resultados é que todas as etapas do exame sejam supervisionadas por um profissional qualificado.

### MULTI-LOCOS, LOCOS ÚNICO OU PCR?

Muito se tem discutido a respeito de qual técnica seria a melhor, se é que existe técnica melhor. Cada uma tem suas vantagens e desvantagens. No quadro 1 citamos os motivos e as vantagens pelas quais escolhemos e realizamos há mais de 4 anos nossos testes pela PCR analisando Short Tandem Repeats (STRs).

### A PCR-STR É UM BOM MÉTODO PARA TESTES DE PATERNIDADE EM DNA?

A PCR tem sofrido críticas quando utilizada como método de escolha nos Testes de Determinação de Paternidade. Muitas das críticas citadas há anos atrás eram construtivas, e tiveram como consequência o aprimoramento do teste em DNA por PCR, a ponto de hoje ter sido atingido um padrão excelente. Nos Estados Unidos a PCR é amplamente aceita em Testes de Paternidade há muitos anos <sup>(7)</sup>. O Laboratório que mais realiza testes de Paternidade em DNA no mundo todo, LabCorp, é um Laboratório norte-americano, que segue as rigorosas leis de controle de qualidade deste país, e realiza todas as suas análises pela técnica

Quadro 1- VANTAGENS DE PCR-STR.

- MENOR TAXA DE MUTAÇÃO
- FACILIDADE DE DISCRIMINAR ALELOS DIFERENTES
- FACILIDADE DE MONTAR BANCOS DE DADOS DA POPULAÇÃO LOCAL
- PROCEDIMENTO COMPLETO SEM USO DE RADIOATIVIDADE
- ANÁLISE POSSÍVEL COM POUCO OU MUITO DNA, DEGRADADO OU INTACTO
- FACILIDADE DE EXAME PRÉ-NATAL, EM RECÉM-NATOS E EM VESTÍGIOS DE CRIMES
- POR NECESSITAR DE POUCO SANGUE NÃO EXIGE FLEBOTOMIA (DNA DA MUCOSA ORAL É SUFICIENTE)
- PERMITE A CONSTRUÇÃO DE ESCADAS ALÉLICAS COM TODOS OS ALELOS POSSÍVEIS
- NÃO NECESSITA DEFINIR "BINS" ARBITRÁRIOS COM OS RFLPs
- FÁCIL INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS POR NÃO-GENETICISTAS
- PROCEDIMENTO ANALÍTICO TECNICAMENTE SIMPLES
- RAPIDEZ NO RESULTADO
- FÁCIL PADRONIZAÇÃO INTRA e INTERLABORATORIAL
- CONTROLE DE QUALIDADE MUITO MAIS EFICIENTE
- POSSÍVEL DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DO SEXO DOS INDIVÍDUOS TESTADOS, IMPORTANTE PARA EVITAR TROCA DE TUBOS
- TAMANHOS PEQUENOS E DEFINIDOS DOS FRAGMENTOS PERMITEM MÚLTIPLAS AMPLIFICAÇÕES SIMULTÂNEAS (MULTIPLEX)
- POSSIBILIDADE DE AUTOMATIZAÇÃO
- CUSTO DO PROCEDIMENTO REDUZIDO EM RELAÇÃO ÀS OUTRAS TÉCNICAS.

de PCR. Este Laboratório já realizou mais de 200.000 (duzentos mil) casos de paternidade usando apenas a PCR, e atualmente tem o incrível volume de 7.000 (sete mil) casos por mês utilizando apenas a PCR <sup>(1)</sup>. Sem termos de comparação, a experiência do Genetika no Brasil não é de toda desprezível; Nos últimos três anos realizamos a análise de 4.500 indivíduos envolvidos em Testes de



## VALIDADE...

Figura 1 - Exemplo de Automatização Multiplex PCR-STR com 8 STRs (Cortesia Promega).

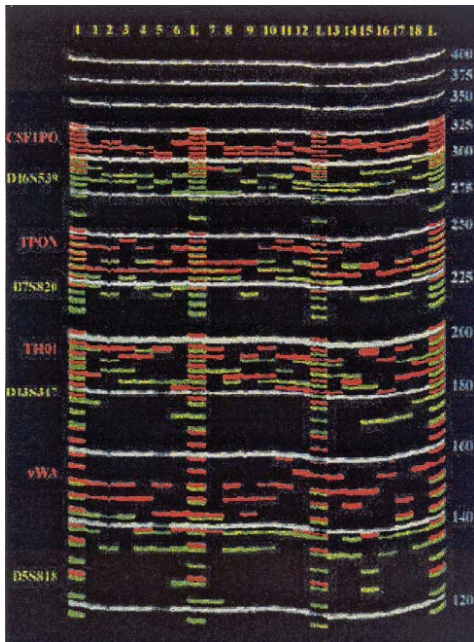
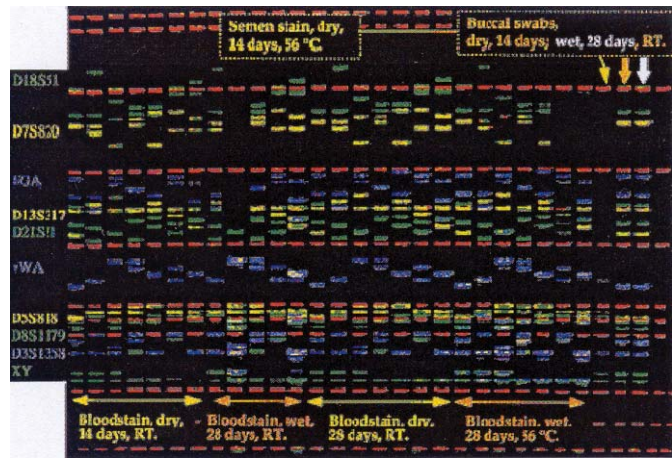


Figura 2 - Exemplo de Multiplex PCR-STR com 9 STRs utilizados em criminalística (Cortesia Dr. Ron Fournery).



Paternidade, utilizando apenas a técnica de PCR-STR, e temos hoje um volume de 70 casos/mês, que vem crescendo em média 15% a cada mês.

### POR QUE E COMO DEFENDER O USO DA PCR-STR COMO MÉTODO PARA TESTES DE PATERNIDADE EM DNA?

Seguem alguns questionamentos e nossos comentários a respeito do uso da PCR nos Testes de Paternidade em DNA.

**Crítica - "A VARIABILIDADE DA MAIORIA DOS STRs TESTADOS POR PCR É TÃO LIMITADA QUE UM NÚMERO ENORME DE LOCOS PRECISARIAM SER ANALISADOS"**

**Comentário:** O fato dos locos analisados por PCR terem variabilidade menor do que os comumente analisados por sonda multi ou unilocais, realmente exige que a maioria dos casos sejam analisados por um número maior de STRs. Porém isto de modo algum é contratempo, pelo contrário. Ninguém duvida que é tecnicamente mais fácil testar 12 STRs do que analisar duas sondas unilocais ou quatro multilocais. A abundância de STRs no genoma humano é uma fonte inesgotável de variabilidade, já que existem hoje centenas

de STRs aptos a serem utilizados e automatizados em sistemas Multiplex. Por outro lado, a alta variabilidade das sondas unilocais e multilocais carregam ao mesmo tempo o fardo das altas taxas de mutação encontradas nestes locos, que tornam complicada a análise de muitos casos quando utilizamos sondas multilocais ou unilocais. Será uma mutação única ou será uma exclusão de paternidade? Esta dúvida, tão freqüente nos laboratórios que optam pela utilização de sondas multilocais (e algumas unilocais como D1S7) não fazem parte da rotina dos Laboratórios que escolheram a PCR, devido as baixas taxas de mutação dos STRs (2).

**Crítica - "MESMO QUE SEJAM ANALISADOS POR PCR VÁRIOS LOCOS DIFERENTES, NUNCA SÃO ALCANÇADAS AS PROBABILIDADES DE PATERNIDADE E PODER DE EXCLUSÃO DAS SONDAS MULTILOCAIS OU UNILOCAIS"**

**Comentário:** As probabilidades de Paternidade dependem de cada caso. Se naquele caso específico os alelos paternos obrigatórios forem extremamente raros, pode-se atingir probabilidades de paternidades altíssimas usando um número muito pequeno de marcadores, sejam eles STRs ou pro-

venientes de sondas unilocais ou multilocais. Em outro caso, se os alelos paternos obrigatórios forem extremamente freqüentes na população, para se atingir as mesmas probabilidades de paternidade necessitaremos analisar um número maior de marcadores, sejam eles STRs ou sondas unilocais ou multilocais. É importante compreender que não é o número de marcadores que determina a qualidade final do exame (se assim fosse os próprios exames de PCR seriam superiores aos outros, pela abundância de STRs potencialmente testáveis), mas sim o poder de exclusão do Sistema e a Probabilidade de Paternidade mínima necessária para assinar um laudo (3). Se para se atingir estes requisitos mínimos forem necessários, **naquele caso específico**, analisar 6 STRs, serão analisados 6 STRs; Se para se atingir estes requisitos mínimos forem necessários, **naquele caso específico**, analisar 23 STRs, serão analisados 23 STRs. Fontes de erro existem em todos os laboratórios. No Canadá foi relatado um caso aonde 7 sondas unilocais não foram capazes de acusar uma exclusão, e o primeiro STR testado acusou a exclusão (4). Recentemente foi descrito no Brasil um caso semelhante aonde uma sonda multilocal não foi capaz de





## VALIDADE...

excluir um caso facilmente excluído por vários STRs <sup>(5)</sup>. Nossa opinião, é de que não existe o tão almejado “padrão ouro” e que todas as três técnicas são extremamente eficientes quando bem utilizadas.

**Crítica** - “A ESTRUTURA DAS POPULAÇÕES HUMANAS FAZ COM QUE A CONFIABILIDADE DOS TESTES DE PCR SEJA PEQUENA”

**Comentário:** Diversos artigos científicos já comprovaram exaustivamente que a subestrutura populacional, mesmo que presente, tem efeito mínimo no índice de Paternidade final, e efeito negligível na conclusão final (exclusão ou inclusão).

**Crítica** - “A PCR DEVE TER UM PAPEL EXCLUSIVAMENTE COMPLEMENTAR AS SONDAS MULTILOCAIS EM DETERMINAÇÃO DE PATERNIDADE”

**Comentário:** Nos Estados Unidos praticamente as sondas multilocais já não são mais utilizadas pelas altas taxas de mutação. Como a PCR poderia ser complementar a uma técnica que tem seus dias contados nos Laboratórios de Determinação de Paternidade?

**Crítica** - “SÓ DEVEMOS USAR PCR QUANDO AS AMOSTRAS SÃO PEQUENAS OU DEGRADADAS”

**Comentário:** Esta é uma das críticas mais ouvidas e de menor embasamento científico; Obviamente qualquer técnica que é eficiente para analisar pouca quantidade de DNA ou DNA degradado, serve também para quando o DNA estiver intacto ou em grande quantidade, como na maioria dos casos de Testes de Paternidade. O contrário sim seria verdadeiro, ou seja, em Testes de Paternidade nos quais contamos com pouco DNA ou degradado (exumação, recém-nascidos, exame pré-natal, área criminal) a PCR é a única técnica que deveria ser usada!

**Crítica** - “POR CAUSA DA POSSIBILIDADE DE MUTAÇÕES, EXCLUSÕES DE PATERNIDADE NUNCA PODEM SER BASEADAS EM UM ÚNICO SISTEMA, PORTANTO NÃO SE DEVE USAR SÓ PCR”

**Comentário:** Esta é uma regra da As-

sociação Americana de Bancos de sangue que deve ser obedecida, apesar de que, devido a baixa taxa de mutações dos STRs, uma única exclusão já poderia ser considerada como falsa paternidade, o mesmo não valendo para sondas unilocais e muito menos para multilocais <sup>(2)</sup>. Repare que a palavra “Sistema” tem sido utilizada de maneira dúbia, pois a AABB se refere a pelo menos dois LOCOS para conferir um laudo de exclusão, e análises em duplicata, porém jamais exigindo que um Laboratório realize o mesmo exame duas vezes utilizando Técnicas diferentes. O exemplo do LabCorp citado acima, é auto-explicativo novamente. O fato de que normalmente se analisam mais locos quando utiliza-se a técnica de PCR-STR, é um excelente controle de qualidade intra-analítico, ou seja, uma PCR controla a qualidade da outra, tornando extremamente improvável que se erre tecnicamente 2 vezes. Praticamente todos os Laboratórios que realizam exames de Paternidade em DNA tem sua técnica preferida, e realizam todas análises com a mesma técnica. Aliás, esta prática é rotineira em Medicina Laboratorial.

**Crítica** - “O ÍNDICE DE PATERNIDADE DE 99,99%, OU SEJA, 9.999 ACERTOS EM 10.000 INCLUSÕES, É INACEITÁVEL DO PONTO DE VISTA ÉTICO, MÉDICO E CIENTÍFICO”

**Comentário:** Tudo depende dos interesses de quem dita o que é aceitável e o que é inaceitável. Nos EUA e na Alemanha, países desenvolvidos que não tem por tradição poupar esforços na defesa do cidadão, as Probabilidades de Paternidade são caracterizadas da seguinte maneira;

90-95% - **PATERNIDADE PROVÁVEL**; 95-99% - **PATERNIDADE MUITO PROVÁVEL**; 99-99,73% - **PATERNIDADE EXTREMAMENTE PROVÁVEL**; e acima de 99,73% - **PATERNIDADE PRATICAMENTE PROVADA** <sup>(6)</sup>. As baterias de STRs utilizadas nos primórdios do uso desta tecnologia atingiam probabilidades de 99,9% <sup>(7)</sup>. Os críticos da PCR consideraram então estas probabilidades “inaceitáveis do ponto de vista

ético, médico e científico”. A pressão serviu como alavanca para que sistemas ainda mais robustos fossem criados. Atualmente, as Probabilidades de Paternidade média geradas pelos STRs são superiores a 99,99% <sup>(3)</sup>. O Poder de discriminação de uma bateria de doze STRs (número médio de indivíduos que teriam que ser analisados pelo sistema para encontrar duas pessoas com os mesmos alelos nos 12 marcadores) é de cerca de um em 178 bilhões a um em 3 trilhões, ou seja, muitas vezes a população do planeta <sup>(3)</sup>. Você considera este número aceitável para a qualidade do seu Laboratório?

Diante destas evidências, os críticos da PCR se encontram agora divididos; alguns decretaram que 99,99% (e não mais 99,9%) é uma probabilidade “inaceitável do ponto de vista ético, médico e científico”; outros estão começando a substituir suas metodologias pela PCR-STR, porém, estes últimos terão de suportar o ônus enorme de ter criticado a técnica de maneira tão contundente no passado, a ponto de que dificilmente suas próprias críticas deixarão de ser usadas contra si próprios se agora optarem pela PCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JAMES M. MASON - Associate Vice President da Laboratory Corporation of America Holdings — LabCorp - Comunicação pessoal (1997).
2. CHAKRABORTY R. and STIVERS D. - Paternity exclusion by DNA markers: effect of paternal mutations. J. Forensic Sci. Jul. 41: 4: 671-7 (1996).
3. SCHUMM J. W. et al. - Automated Detection of STR Multiplex - Proceedings from the First European Symposium on Human Identification, 1996: 90-104 (1997).
4. RONALD FOURNEY, Royal Canadian Mounted Police, Central Forensic Lab, Canada. - Comunicação pessoal (1997).
5. Whittle M., Fontes de erro nos Testes de Paternidade. Newslab 16: 106-108 (1996).
6. Inclusion Probabilities in Parentage Testing. AABB, capítulo 18, pág. 238 (1983).
7. ALFORD R. L. et al. Rapid and Efficient Resolution of Parentage By Amplification of Short Tandem Repeats. Am. J. Hum. Genet. 55: 190-195 (1994).

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:  
DR. SALMO RASKIN  
CENTRO DE ACONSELHAMENTO E LABORATÓRIO  
GENÉTICA  
ALAMEDA AUGUSTO STELLFELD, 1516  
CEP 80730-150 CURITIBA/PR  
FONE: (041) 232-6838  
FAX: (041) 232-5206  
Email: genetica@avalon.sul.com.br