



Universidade do Porto

Análise Genética de Impressões Digitais

– Amostras *Low Copy Number* –

Arlindo Marques Lagoa

2007



Universidade do Porto

Análise Genética de Impressões Digitais

– Amostras *Low Copy Number* –

Arlindo Marques Lagoa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Forenses

Orientador: Professora Doutora Maria de Fátima Pinheiro

Resumo

A possibilidade de analisar amostras com quantidades exíguas de material genético (amostras *Low Copy Number* ou LCN), em que estão presentes apenas algumas células, tem alterado a forma de encarar a cena do crime. Alguns vestígios que até agora não eram considerados como susceptíveis de proporcionarem resultados, podem actualmente ser analisados com sucesso. As impressões digitais são um bom exemplo. Estes vestígios apresentam um baixo número de células, permitindo apenas recuperar quantidades de DNA inferiores a 100 pg. Assim, para a análise do DNA nuclear, é necessário implementar sistemas muito sensíveis que consistem, habitualmente, no aumento do número de ciclos da PCR. Contudo, alguns artefactos são produzidos, tornando difícil a interpretação dos electroforectogramas.

Neste trabalho pretendeu-se comparar a aplicação do estudo de STR autossómicos, Y-STR e miniSTR na análise genética de impressões digitais, partindo do conceito do aumento do número de ciclos como estratégia para se obter maior sensibilidade. Procedeu-se também à amplificação total do genoma e *nested*-PCR, como métodos alternativos ao aumento do número de ciclos. Adicionalmente, neste estudo tentou-se perceber a influência dos principais métodos reveladores de impressões digitais (cianoacrilato, pó magnético e pó branco) na análise do DNA.

Os resultados mostram que o aumento do número de ciclos é a melhor opção como método para aumentar a sensibilidade. Constata-se também que o DNA extraído de impressões digitais encontra-se parcialmente degradado, obtendo-se diferenças significativas entre *loci* com fragmentos de amplificação menores e maiores do que 200 pb. Dos diferentes marcadores caracterizados verifica-se que, em termos de percentagem de alelos detectados, os miniSTR proporcionam os melhores resultados. Por outro lado, os Y-STR parecem altamente sensíveis à degradação ou presença de inibidores, pelo que são menos robustos para este tipo de análises. Verifica-se também que os perfis LCN são drasticamente afectados por artefactos, principalmente os derivados de variação estocástica, como o *allele dropout* e o desequilíbrio heterozigótico. A determinação de perfis de consenso permite reduzir alguns destes artefactos. Dos métodos de revelação estudados, o cianoacrilato é o que apresenta menor influência na análise e, pelo contrário, o pó branco provoca os resultados mais negativos.

Abstract

The possibility to perform low copy number DNA typing, when just a few cells are available, as changed the way how crime scene investigations is faced. Nowadays it is possible to successfully type some evidence that couldn't be considered until now. Fingerprints are a good example of those. Since that just a few cells are present in this evidence (enabling recovery of low quantities of DNA, fewer than 100pg) just very sensitive systems can detect nuclear DNA. The most used method is definitely increasing the number of PCR cycles. However, increased occurrence of stutters and artifacts that reduced the quality of the DNA profile is normally observed.

The present work aimed to compare the application of autosomic STR, Y-STR and miniSTR markers, based on the concept of increased number of PCR cycles as a strategy to achieve more sensitivity. Some other methods, such as whole genome amplification and nested-PCR, were also evaluated as an alternative way to reach the desired sensitivity. Another goal was to determine the influence of several reagents for developing latent fingerprints (cyanoacrylate fuming, magnetic powder and white powder) in DNA typing.

The results shows that increasing the number of PCR cycles still is the best way to attain the required sensitivity. Moreover we could realize that DNA was partially degraded, once there were observed significant differences between loci larger and smaller than 200bp. Among all markers miniSTR showed to perform the best results in terms of detected alleles percentage. On the other hand, Y-STR seemed to be highly affected in the presence of degraded DNA and PCR inhibitors, which makes them less robust for these analyses. LCN profiles are significantly affected by artifacts, like allele dropout and heterozygous imbalance, derived from stochastic fluctuation. Reporting consensus profiles reduces artifact inherent errors. Finally, cyanoacrylate proved to have a minimum negative effect on DNA profiling, while white powder was the worst reagent.

Palavras Chave / Keywords

Palavras Chave

Impressões Digitais

DNA

Low Copy Number

miniSTR

STR

Y-STR

Nested-PCR

WGA

Keywords

Fingerprints

DNA

Low Copy Number

miniSTR

STR

Y-STR

Nested-PCR

WGA

Agradecimentos

Esta tese não teria certamente sido possível, sem o apoio, motivação e encorajamento, que fui tendo ao longo da sua realização. Expresso aqui os meus agradecimentos a todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a sua execução.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria de Fátima Pinheiro, pela sua orientação, disponibilidade, exigência e acompanhamento constante. O meu profundo agradecimento por tudo o que com ela aprendi.

À Professora Doutora Teresa Magalhães, pela oportunidade de desenvolver a tese no INML e pela confiança que em mim depositou.

A todas as pessoas do laboratório, particularmente ao David, à Gabi, à Laura, à Dr^a Lurdes, à Maria João e à Paula, pela disponibilidade, comentários e pelo bom ambiente que me proporcionaram.

A todos os meus colegas de mestrado, principalmente ao Gilberto, à Xana, à Marcela, à Raquel e à Teresa, pelo companheirismo e amizade. Um agradecimento especial à Teresa e à Raquel, colegas de laboratório, pelos inúmeros comentários, críticas e sugestões, que tanto contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A todos do laboratório da Polícia Técnica da Directoria do Porto da Polícia Judiciária, por toda a ajuda no tratamento lofoscópico das impressões digitais e pela motivação para a conclusão deste trabalho. Um agradecimento especial ao Inspector Chefe José Cordeiro pela oportunidade de poder colaborar com a sua equipa.

À Dr^a Adriana Belo pela ajuda fundamental no tratamento estatístico dos resultados.

À Professora Doutora Marian Pancorbo pela cedência de primers de miniSTR.

Ao Doutor Paulo Pereira do Laboratório de Microbiologia e Ecotoxicologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Lisboa pela possibilidade de utilização do Microscópio Invertido de Contraste de Fase.

Por fim, um agradecimento sincero, aos meus pais, irmãos e à Mariana, pela sua ajuda incondicional, imensurável apoio e confiança que em mim depositaram. Dedico-lhes este trabalho.

Porto, 1 de Julho de 2007
Arlindo Marques Lagoa

Conteúdo

1	Introdução.....	1
1.1	Breve introdução à genética forense	2
1.1.1	Marcadores STR	3
1.1.2	Marcadores miniSTR	6
1.1.3	Marcadores SNP	8
1.1.4	O DNA mitocondrial	9
1.2	Impressões digitais como fonte de DNA.....	9
1.2.1	Impressões digitais – amostras low copy number	10
1.2.2	Os dedos como vectores por excelência	11
1.2.3	Factores de variação da deposição das células	11
1.3	Análise genética de amostras LCN.....	13
1.3.1	Análise LCN – STR.....	13
1.3.1.1	Amplificação por PCR.....	14
1.3.1.2	MiniSTR e impressões digitais	16
1.3.1.3	Artefactos da análise LCN.....	17
1.3.2	Recolha e extracção de DNA LCN.....	19
1.3.3	Reveladores de impressões digitais latentes	20
1.4	Transferência transversal de DNA	21
1.4.1	Transferência adventícia.....	22
1.4.2	Transferência secundária	23
1.4.3	Contaminação	24
1.4.3.1	Na cena do crime	25
1.4.3.2	No laboratório forense	26
1.4.4	Hierarquia das proposições e LCN	27
1.5	Validação estatística da análise LCN	29
1.6	Análise genética vs análise lofoscópica	30
2	Material e Métodos	33
2.1	Testes de sensibilidade	33
2.1.1	Identifiler™	33
2.1.2	Yfiler™	34
2.1.3	MiniSTR	34
2.1.3.1	Heptaplex e Triplex	34
2.1.3.2	Amplificação por PCR.....	36
2.1.3.3	Construção de ladders alélicos	37
2.1.4	WGA.....	37
2.1.5	Detecção e análise dos fragmentos de amplificação	37

2.2	Optimização do método de extracção.....	38
2.2.1	Amostra	38
2.2.2	Extracção	38
2.2.2.1	Método de extracção simples (Schiffner et al., 2005)	38
2.2.2.2	Resina Chelex® - Microcon	39
2.2.2.3	Método QIAamp/QIAshredder (Sinclair & McKechnie, 2000).....	39
2.2.2.4	Extracção orgânica (PC).....	40
2.2.3	Amplificação e análise dos fragmentos	41
2.2.4	Quantificação	41
2.2.5	Protocolo PC adaptado a amostras LCN	41
2.3	Análise genética de impressões digitais.....	42
2.3.1	Amostras	42
2.3.2	Revelação das impressões digitais.....	43
2.3.3	Extracção do DNA	44
2.3.4	Amplificação por PCR	44
2.3.4.1	Identifiler™	44
2.3.4.2	Yfiler™	44
2.3.4.3	MiniSTR.....	45
2.3.4.4	Nested-PCR.....	45
2.3.4.5	Amplificação total do genoma	45
2.3.5	Detecção e análise dos fragmentos de amplificação	45
2.3.6	Quantificação	45
2.3.7	Controlo de qualidade.....	46
2.3.8	Análise dos resultados.....	46
2.3.9	Microscopia.....	48
3	Resultados.....	49
3.1	Testes de sensibilidade	49
3.1.1	Identifiler™	49
3.1.2	Yfiler™	50
3.1.3	MiniSTR	51
3.1.4	WGA.....	54
3.2	Método de extracção.....	55
3.3	Análise de impressões digitais	57
3.3.1	Identifiler™	59
3.3.1.1	Número de ciclos.....	59
3.3.1.2	Métodos de revelação	61
3.3.1.3	Alelos contaminantes	63
3.3.1.4	Exposição ao ambiente	64
3.3.1.5	Loci menores e maiores que 200 pb.....	64
3.3.1.6	Hb, allele e locus dropout	66
3.3.1.7	Stutters.....	71
3.3.1.8	Consenso	72

3.3.2 Yfiler™	74
3.3.2.1 Número de ciclos	74
3.3.2.2 Loci maiores e menores que 200 pb.....	77
3.3.2.3 Métodos de revelação	79
3.3.2.4 Alelos contaminantes	80
3.3.3 MiniSTR	81
3.3.4 WGA.....	85
3.3.5 Nested-PCR	87
4 Discussão	89
4.1 Testes de sensibilidade	90
4.2 Extracção de DNA	92
4.3 Análise genética de impressões digitais.....	94
5 Conclusões.....	109

Lista de abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
A ₁	Altura (rfu) do alelo mais baixo do <i>locus</i>
A ₂	Altura (rfu) do alelo mais alto do <i>locus</i>
Ciano	Revelador cianoacrilato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Hb	Equilíbrio heterozigótico
ID	Impressão digital
Ident28	Amplificação com Identifiler™ a 28 ciclos
Ident34	Amplificação com Identifiler™ a 34 ciclos
Kv	Kilovolt
M	Molar
Mag	Revelador pó magnético
mg	Miligramas
min	Minutos
miniSTR32	Amplificação dos miniSTR a 32 ciclos
miniSTR36	Amplificação dos miniSTR a 36 ciclos
ml	Mililitro
mtDNA	DNA mitocondrial
ng	Nanogramas
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Picogramas
Pinc	Revelador pó branco
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
rfu	Unidades relativas de fluorescência
Sem	Sem revelação
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
WGA	Amplificação total do genoma
Yfiler30	Amplificação com Yfiler™ a 30 ciclos
Yfiler36	Amplificação com Yfiler™ a 36 ciclos
Y-STR	STR do cromossoma Y
μl	Microlitros
UV	Luz ultravioleta
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Electroforetograma com detecção de produtos stutter.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Electroforetograma com picos dobrados.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. Representação esquemática do efeito de uma mutação (*) na região de ligação do primer.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4. Electroforetograma da amplificação de uma amostra degradada (osso) com o kit Powerplex® 16 (Promega).</i>	<i>6</i>
<i>Figura 5. Esquema representativo do local de hibridação dos primers convencionais e dos primers miniSTR..</i>	<i>6</i>
<i>Figura 6. Diferença de tamanhos (pb) dos fragmentos de amplificação produzidos por A) primers do COfiler™ kit e B) primers para miniSTR desenvolvidos por Butler et al. (2003).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 7. Gráfico da variabilidade na deposição de células entre oito indivíduos.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 8. Teste de sensibilidade ao miniSTR D10S1248.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 9. Electroforetograma da análise genética, com Identifiler™ 34 ciclos, de uma ID..</i>	<i>18</i>
<i>Figura 10. Lâmpadas Crime-lite™.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 11. Esquema representativo do momento relativo da transferência transversal de DNA.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 12. Perfil obtido da análise de um objecto após transferência secundária.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 13. Esquema representativo da distribuição dos loci do heptaplex por tamanhos (pb) e cores (fluorocromo).</i>	<i>35</i>
<i>Figura 14. Modelo de caixa usada no transporte das ID.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Gráfico do teste de sensibilidade para o Identifiler™.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. Gráfico do teste de sensibilidade para o Yfiler™.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 17. Exemplo de uma amostra de saliva analisada com o heptaplex.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 18. Ladder alélico construído para o heptaplex.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 19. Ladder alélico construído para o triplex.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 20. Exemplo de uma amostra de saliva analisada com o triplex a 32 ciclos.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 21. Gráfico do teste de sensibilidade para o triplex.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 22. Gráfico do teste de sensibilidade para o heptaplex.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 23. Gráfico da percentagem de alelos do 9947A detectados com WGA, Ident28 e Ident34.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 24. Gráfico da quantidade total média (pg) de DNA extraído por cada método.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 25. Electroforetograma da amplificação de controlos negativos com Ident34.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 26. Fotografia de células da ID.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 27. Gráficos da comparação entre a concentração de DNA obtida e a percentagem de perfil detectado com Ident28.</i>	<i>59</i>

Figura 28. Gráficos dos resultados do sucesso para os vários dias e métodos reveladores para Ident28, e as duas réplicas de Ident34.	60
Figura 29. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso com Ident28 e as duas réplicas de Ident34.....	60
Figura 30. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso da análise com Ident34, das amostras reveladas e não reveladas.....	62
Figura 31. Histograma da frequência do número de alelos contaminantes por amostra (Ident34).....	63
Figura 32. Rectas de tendência e respectivo R^2 obtidos para os valores de sucesso da 1ª réplica com Ident34 para as amostras reveladas e não reveladas.	64
Figura 33. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com todos os loci, e apenas com os loci menores e maiores que 200 pb, com Ident28 e Ident34.	65
Figura 34. Caixa-com-bigodes dos valores da diferença entre a percentagem de perfil obtido nos loci menores e maiores de 200 pb.	66
Figura 35. Caixa-com-bigodes dos valores de Hb obtidos para cada loci.	67
Figura 36. Gráfico de dispersão de valores de Hb vs altura (rfu) do alelo mais alto (A_2).	67
Figura 37. Gráfico de dispersão dos valores médios de Hb obtidos com Ident34 vs percentagem de perfil obtido com Ident28.	68
Figura 38. Caixa-com-bigodes dos valores de Hb para os loci menores e maiores que 200 pb.	68
Figura 39. Caixa-com-bigodes dos valores médios de Hb para as amostras reveladas e não reveladas.	69
Figura 40. Caixa-com-bigodes dos valores de altura relativa dos produtos stutter (%) para os vários loci.	71
Figura 41. Gráficos dos resultados do sucesso de amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.	74
Figura 42. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso da amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.	75
Figura 43. Caixa-com-bigodes dos valores do sucesso obtidos todos os loci, e com os loci menores e maiores de 200 pb, das amplificações com Yfiler30 e Yfiler36.	77
Figura 44. Caixa-com-bigodes dos valores da diferença entre loci menores maiores de 200 pb, da amplificação com Yfiler36 das amostras reveladas e não reveladas.....	78
Figura 45. Caixa-com-bigodes dos valores da diferença entre os loci menores e maiores de 200 pb, de todas as amostras amplificadas com Ident34 e Yfiler36.....	79
Figura 46. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso da análise com Yfiler36, das amostras reveladas e não reveladas.....	79
Figura 47. Histograma da frequência do número de alelos contaminantes por amostra, da análise com Yfiler36.	81
Figura 48. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso com o heptaplex a 32 e 36 ciclos.	81
Figura 49. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso com o triplex a 32 e 36 ciclos.....	82
Figura 50. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso dos miniSTR36, Ident34 e loci menores que 200 pb de Ident34.....	83

<i>Figura 51. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com miniSTR36 nas amostras reveladas e não reveladas.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 52. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com WGA, Ident28 e Ident34. 86</i>	<i>86</i>
<i>Figura 53. Gráfico demonstrativo do sucesso de cada amostra com WGA, Ident28 e Ident34.. 86</i>	<i>86</i>
<i>Figura 54. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com nested-PCR e Ident34, para os loci comuns nos dois métodos.</i>	<i>87</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Compilação dos alelos contaminantes detectados em 30 replicados de controlos negativos.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 2. Primers usados para os miniSTR.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 3. Concentração otimizada dos primers para os miniSTR.</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4. Comparação do tamanho (pb) dos alelos analisados com Identifiler™ e heptaplex. 51</i>	
<i>Tabela 5. Compilação de alelos contaminantes detectados em 13 controlos negativos de extracção com PC (análise com Ident34).....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 6. Concentração de DNA (pg/µl) obtida para cada amostra.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 7. Resultado da estatística do teste de Wilcoxon da concentração obtida para os 4 métodos de revelação.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 8. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação da percentagem de perfil obtido com Ident28 e Ident34.</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 9. Teste de Friedman para a comparação do sucesso entre os diferentes métodos de revelação.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 10. Resultado da estatística do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os diferentes métodos de revelação.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 11. Resultado da estatística do teste dos Sinais para a comparação do sucesso entre os diferentes métodos de revelação.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 12. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para o sucesso com Ident34 entre os marcadores menores que 200 pb (<200) e maiores que 200 pb (>200).</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 13. Resultado da estatística do teste de Wilcoxon para o Hb entre os métodos de revelação.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 14. Número de sistemas em que foi verificada heterozigotia, allele dropout e locus dropout, para a análise de ID reveladas e não reveladas.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 15. Percentagem de sucesso, allele dropout e locus dropout para cada locus.</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 16. Resultados parciais obtidos nas três réplicas para as ID não reveladas e respectivo consenso.</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 17. Síntese dos resultados do consenso.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 18. Resultados da estatística do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre a amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 19. Resultados das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre a amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 20. Resultados das ordens do teste de Wilcoxon, para a comparação do sucesso entre os pares Ident28-Yfiler30 e Ident34-Yfiler36.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 21. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os loci maiores e menores que 200 pb, para a amplificação com Yfiler30 e Yfiler36.</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 22. Resultados da estatística do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os vários métodos de revelação.....</i>	<i>80</i>

<i>Tabela 23. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre Ident34 e Yfiler36.</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 24. Resultados das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os miniSTR (36 ciclos) e STR (Ident34).</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 25. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação entre o número de contaminantes detectados na amplificação a 32 e 36 ciclos com o T01 e heptaplex.</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 26. Teste-t para amostras emparelhadas, para os pares WGA-Ident28 e WGA-Iden34.</i>	<i>86</i>

Objectivos

1. Coligir bibliografia que permita implementar e otimizar a técnica de análise genética de impressões digitais, percebendo as vantagens, desvantagens e problemas da análise de amostras LCN.
2. Desenvolver um protocolo de análise de impressões digitais (recolha e extracção do DNA e análise de polimorfismos) ajustável às condições laboratoriais.
3. Aplicar o conceito do aumento do número de ciclos no estudo de vários marcadores genéticos, STR autossómicos (Identifiler™), Y-STR (Yfiler™) e miniSTR; e subsequente aplicação na análise genética de impressões digitais, percebendo empiricamente as principais vantagens e artefactos.
4. Testar a aplicação de diferentes protocolos de análise de STR, amplificação total do genoma (REPLI-g) e *nested*-PCR, como alternativas ao aumento do número de ciclos.
5. Testar a influência dos principais métodos lofoscópicos de revelação de impressões digitais, cianoacrilato, pó magnético e pó branco, na análise do DNA.
6. Verificar qual o efeito da exposição de impressões digitais ao meio ambiente em termos de degradação do material genético.

1

Introdução

As técnicas e conhecimentos científicos desempenharam desde sempre um papel importante na resolução de casos forenses. Estes permitem que vestígios físicos sejam recolhidos, analisados, comparados e associados ao crime, às vítimas e aos criminosos.

Uma ideia fundamental que, em geral, as ciências forenses partilham é o chamado Princípio de Locard. Este princípio enuncia que sempre que dois objectos entram em contacto ocorre troca de material (Saferstein, 2004). Edmond Locard acreditava convictamente que um criminoso pode ser sempre ligado ao crime que cometeu, mesmo através de pequenas partículas. Neste sentido, Locard, dizia (Saferstein, 2004):

"Wherever he steps, whatever he touches, whatever he leaves, even unconsciously, will serve as silent evidence against him. Not only his fingerprints or his footprints, but his hair, the fibers from his clothes, the glass he breaks, the tool mark he leaves, the paint he scratches, the blood or semen that he deposits or collects - all these and more bear mute witness against him. This is evidence that does not forget. It is not confused by the excitement of the moment. It is not absent because human witnesses are. It is factual evidence. Physical evidence cannot be wrong; it cannot perjure itself; it cannot be wholly absent. Only its interpretation can err. Only human failure to find it, study and understand it, can diminish its value."

A criminalística biológica é uma área fundamental das ciências forenses, pois os vestígios biológicos são os que mais contribuem para a identificação de criminosos ou vítimas. Por essa razão, a genética forense, como ciência que analisa os vestígios biológicos através do estudo da sua informação genética, desempenha um papel fundamental.

Podem ser analisados vários tipos de vestígios biológicos, com especial predominância de exsudados de diferentes origens e sangue. Outras amostras também frequentemente analisadas são a saliva, os pêlos, os vestígios subungueais e o material fetal. Estes vestígios

têm todos em comum a presença de células que contêm moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico), responsáveis pela informação genética. Como princípios genéticos gerais, pode-se dizer que: a) o DNA no seu conjunto é característico de cada indivíduo e, por consequência, cada célula é individualizante; b) o DNA é perene, não se alterando com a idade do indivíduo; c) todas as células do indivíduo contêm a mesma informação genética. Por estes motivos, o conjunto de características genéticas obtidas a partir da análise de uma qualquer amostra biológica pertencente a um indivíduo, constitui o seu perfil genético. Assim, analisar uma amostra biológica encontrada no local do crime permite determinar o perfil genético do indivíduo que a deixou.

Apesar dos vestígios acima referidos serem os mais comuns e também mais fáceis de analisar, nem sempre são encontrados no local do crime. Por vezes, os únicos vestígios que se conseguem retirar da cena do crime são os de contacto da pele com uma qualquer superfície (vestígios lofoscópicos), em particular as impressões digitais (ID). A análise destes vestígios anatómicos, tradicionalmente lofoscópica, hoje pode ter uma abordagem completamente distinta, através da determinação do seu perfil genético.

1.1 Breve introdução à genética forense

As primeiras técnicas de exclusão de suspeitos utilizadas nas ciências forenses usavam marcadores moleculares proteicos (serologia). A introdução de marcadores moleculares genéticos – para análise de DNA – revolucionou as ciências forenses na perspectiva da identificação individual. Além de permitir excluir suspeitos e de compreender uma análise mais fiável, necessita de uma menor quantidade de material biológico. Além disso, como o DNA é muito mais estável do que as proteínas, é também possível obter-se resultados a partir de amostras antigas, circunstância inviável usando os primeiros marcadores.

Em 1985, Alec Jeffreys (Jeffreys *et al.*, 1985) descobriu uma “região minissatélite” no gene da mioglobina humana. Aplicando sondas multilocus, obteve resultados que constituíam um conjunto de bandas, conhecidos por impressão digital genética (DNA *fingerprint*). Jeffreys analisou os VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), através de uma técnica designada por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), como método genético de identificação e, com estes marcadores, resolveu o famoso caso de homicídio de Colin Pitchfork¹. Os VNTR constituíram na altura uma grande vantagem quando comparados com os marcadores convencionais (serológicos), contudo, implicam que o DNA seja de elevado peso molecular (não degradado) e esteja presente em elevadas quantidades (idealmente 250 ng (nanogramas)), pelo que o seu estudo, no caso da criminalística biológica, só se podia efectuar nas situações em que estavam presentes quantidades consideráveis de material genético. A partir deste momento, as técnicas genéticas têm sofrido uma grande evolução, tornando-se cada vez mais fácil proceder-se a análises genéticas e, por outro lado, obter-se resultados fiáveis.

¹ Informação sobre este caso disponível em <http://www.forensic.gov.uk>

Os VNTR deram lugar aos STR (*Short tandem Repeats*), sendo na actualidade os marcadores genéticos de eleição. Os STR têm um maior poder de discriminação e, como se analisam fragmentos de DNA de menor tamanho, permitem obter resultados a partir de DNA de baixo peso molecular (degradado). Além disso, podem ser analisados através da PCR (*Polimerase Chain Reaction*), o que possibilita o estudo de amostras com quantidades muito baixas de DNA (Butler, 2005).

Além dos STR, são actualmente usados outros marcadores genéticos, como os SNP (*Simple Nucleotide Polymorphisms*), os miniSTR e o DNA mitocondrial. Em face da sua grande utilização na resolução de perícias forenses, proceder-se-á a uma breve exposição de cada um destes polimorfismos, dando maior ênfase aos STR e miniSTR, que constituem os marcadores usados no presente estudo.

1.1.1 Marcadores STR

O DNA nuclear do genoma humano está repleto de pequenas regiões com sequências repetidas de DNA. Quando a unidade de repetição do DNA é de 2-6 pb (pares de bases), estas regiões (*loci*) são conhecidas por microsátélites ou STR. Uma das características essenciais destes marcadores é serem muito polimórficos, existindo, por este facto, uma grande variabilidade entre indivíduos, que se traduz na variação do número de repetições da unidade de repetição.

É ainda de salientar que estes marcadores, por terem um tamanho relativamente pequeno (entre 100 e 350 pb nos *kits* comerciais mais comuns), são facilmente analisados por PCR, não havendo problemas ao nível da amplificação preferencial de determinados alelos, comuns em marcadores de maior tamanho (Butler, 2005). Estas características fazem com que estes polimorfismos sejam de eleição em procedimentos de identificação individual (Pinheiro, 2004).

A análise dos STR é feita, como já referido, recorrendo à reacção da PCR. Isto significa que uma molécula de DNA presente numa amostra é copiada ciclicamente, durante um período finito de ciclos, definido pelo operador. Esta reacção permite obter inúmeras cópias dessa molécula, que são posteriormente estudadas, em geral, por electroforese capilar. Assim, conseguem-se analisar *loci* STR dispondo apenas de pequenas quantidades de DNA, tendo geralmente como limite de detecção 250 pg (picogramas) (a quantidade ideal é de 1 ng) e usando 28-30 ciclos de amplificação por PCR (Gill, 2001).

A análise de STR pode ser feita combinando numa única reacção todos os *primers* dos vários *loci* STR que se pretendem estudar, amplificando-os simultaneamente – PCR multiplex. Este método permite obter informação de todos os STR numa só reacção, usando menor quantidade de amostra e menos tempo de análise. Existem vários *kits* comerciais para análise multiplex de STR. Os mais usados na actualidade permitem estudar os autossomas (cromossomas não sexuais), como o AmpF ℓ STR[®]Identifiler™ (Applied Biosystems) e o Powerplex[®]16 (Promega); mas, também, cromossomas sexuais, como o AmpF ℓ STR[®]Yfiler™

(Applied Biosystems) para o estudo do cromossoma Y e o Mentype® Argus X-8 (Biotype®) para o estudo do cromossoma X. Enquanto os primeiros três *kits* permitem estudar 16 *loci*, o último possibilita a análise de apenas 8 *loci*. O estudo do cromossoma Y pode ser útil em casos em que se suspeite de perpetradores masculinos, como violações (Butler, 2005), enquanto o estudo do cromossoma X pode ser útil em situações de investigação de relações de parentesco, principalmente em testes de paternidade em que o filho é do sexo feminino (Edelmann *et al.*, 2002; Szibor *et al.*, 2003; Wiegand *et al.*, 2003).

Como consequência da amplificação multiplex dos STR, podem aparecer alguns artefactos que poderão interferir com a interpretação correcta dos electroforetogramas.

Produtos *stutter* – Os produtos *stutter* são picos (no electroforetograma) resultantes do processo da PCR, quando o DNA é copiado pela DNA polimerase. Durante a PCR, a DNA polimerase sofre um deslizamento (*slippage*), levando à formação de moléculas de DNA que são uma unidade de repetição mais pequenas do que o alelo correspondente. No caso de STR tetranucleotídicos (em que a unidade de repetição tem 4 nucleótidos) equivale a moléculas que são 4 pb mais pequenas (Walsh *et al.*, 1996). Normalmente, os picos dos produtos *stutter* têm uma altura (RFU – unidades relativas de fluorescência) inferior a 15% do alelo correspondente (Figura 1) e a sua frequência depende do *locus*, do alelo, das condições de PCR e da DNA polimerase usada (Butler, 2005).

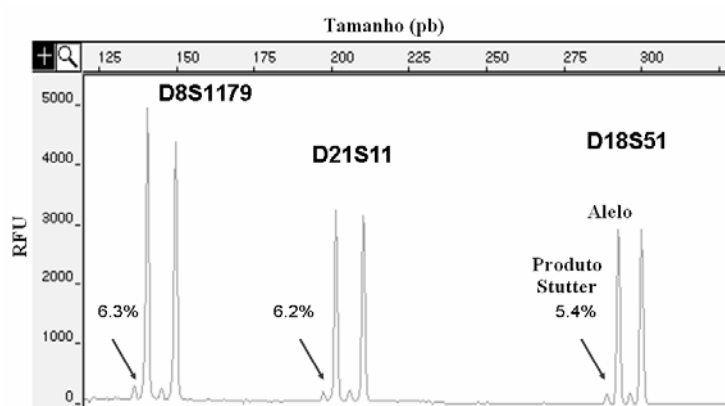


Figura 1. Electroforetograma com detecção de produtos *stutter*. Adaptado de Butler (2005).

Adição não específica de nucleótidos – Em particular a *Taq* DNA polimerase, largamente usada na PCR, adiciona um nucleótido na extremidade 3' dos produtos de amplificação. Como o nucleótido é normalmente a adenina, este fenómeno denomina-se de “adenilação” ou forma “+A” da amplificação. Nos electroforetogramas de sistemas em que ocorre este fenómeno observa-se um pico (correspondente ao alelo) bipartido, constituído pela forma -A e pela forma +A. Para evitar dificuldades interpretativas, é mais fácil promover a adenilação completa². Contudo, o sucesso não é de 100%, particularmente em situações específicas,

² A adenilação é promovida de várias formas, sendo que a mais frequente consiste na adição de uma guanina na extremidade 5' do primer reverso.

como na presença de excesso de DNA (Figura 2), em que a DNA polimerase não tem capacidade de adenilar todas as moléculas de DNA formadas.

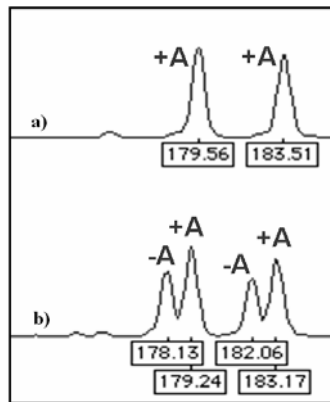


Figura 2. Electroforetograma com picos dobrados. a) Amostra com quantidade correcta de DNA; e b) amostra com excesso de DNA. Adaptado de Butler & McCord (2006).

Alelos nulos – Se ocorrer uma mutação pontual (alteração de uma base) na zona central da região de hibridação de um *primer*, esse alelo é dificilmente amplificado e ocorre desequilíbrio dos picos heterozigóticos (Figura 3, painel central); se essa mutação ocorrer na extremidade 3', o *primer* não se consegue ligar, não permitindo que a PCR se processe. Consequentemente, esse alelo não é detectado (apesar de existir) (Figura 3, painel do fundo). A análise desta amostra com outros *primers* pode permitir a detecção desse alelo.

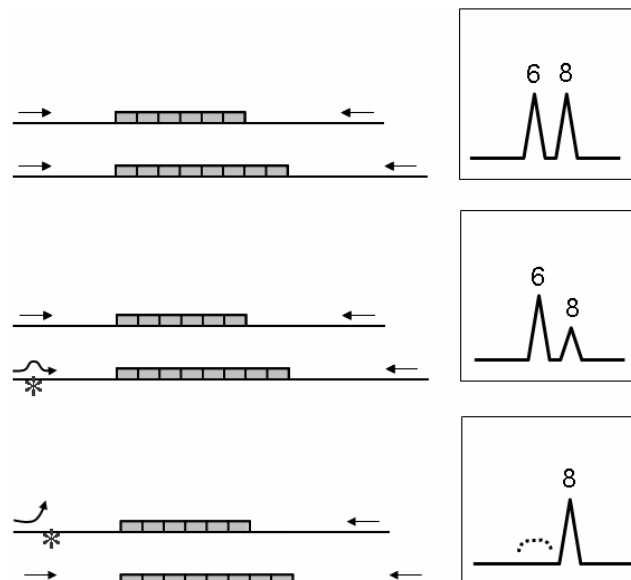


Figura 3. Representação esquemática do efeito de uma mutação (*) na região de ligação do *primer*. Adaptado de Butler & McCord (2006).

1.1.2 Marcadores miniSTR

Como foi referido, os STR são a principal ferramenta usada na resolução de perícias do âmbito da genética forense na actualidade, já que são marcadores altamente polimórficos e permitem genotipar amostras com muito pouco material genético.

Os *kits* comerciais actualmente disponíveis no mercado para a caracterização de *loci* STR geram produtos de amplificação que variam de 100 pb a 350 pb (Applied Biosystems, 2001a). Em situações em que há a necessidade de se proceder à análise de amostras altamente degradadas, como é o caso de algumas amostras relacionadas com crimes ou restos cadavéricos, em que, por vezes, o material genético é exposto ao fogo ou a outros elementos naturais, por largos períodos de tempo, pode ocorrer a sua degradação (Bar *et al.*, 1998). Nestes casos, os alelos de maior tamanho não são facilmente amplificados; pois, com esse tamanho, não existe um número suficiente de fragmentos de DNA íntegros, que possam servir de molde à amplificação por PCR (Butler *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004). Observa-se que os alelos de maior tamanho não são detectados (Figura 4).

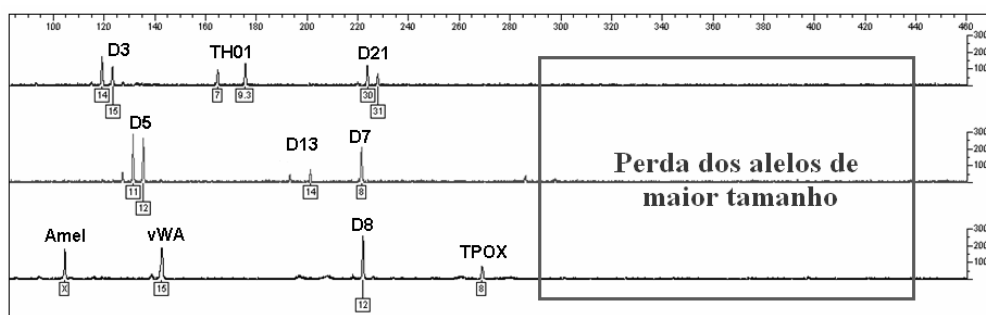


Figura 4. Electroforetograma da amplificação de uma amostra degradada (osso) com o *kit* Powerplex® 16 (Promega). Adaptado de Coble *et al.* (2006).

Wiegand & Kleiber (2001), no artigo “Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers”, assinalam que DNA altamente degradado e em quantidades vestigiais pode ser mais facilmente caracterizado usando *primers* que permitam a obtenção de produtos de amplificação de tamanhos mais reduzidos, em oposição aos *primers* dos STR de *kits* comerciais. Os polimorfismos resultantes são designados por miniSTR.

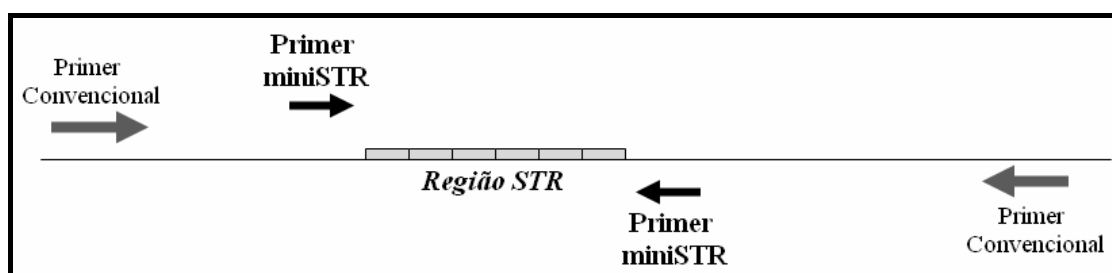


Figura 5. Esquema representativo do local de hibridação dos *primers* convencionais e dos *primers* miniSTR. Adaptado de Coble *et al.* (2006).

Num exercício coordenado pela EDNAP (European DNA Profiling Group), cujo objectivo era perceber que marcadores eram preferíveis para a análise de DNA degradado (Dixon *et al.*, 2005); os autores concluíram que os miniSTR são os mais eficientes, quando comparados com SNP e com STR. Este grupo recomenda que os *primers* para a caracterização dos STR actualmente usados sejam redesenhados, de forma a produzirem fragmentos de amplificação mais pequenos. Os novos *primers* são construídos de forma a hibridarem em zonas mais próximas das unidades de repetição (Figura 5) e, assim, produzirem fragmentos de amplificação mais pequenos, como o caso da Figura 6, em que se observa uma redução de aproximadamente 150 pb.

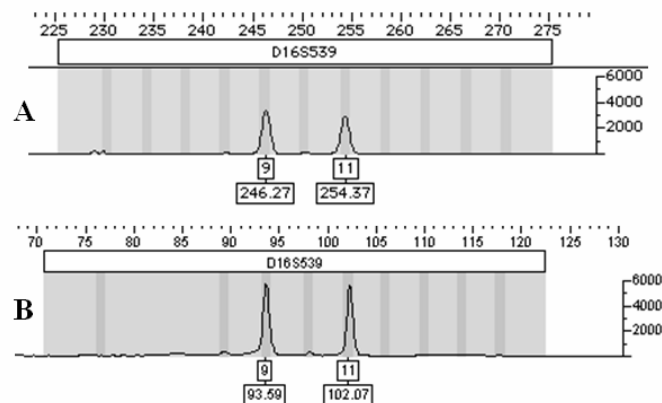


Figura 6. Diferença de tamanhos (pb) dos fragmentos de amplificação produzidos por A) *primers* do COfiler™ kit e B) *primers* para miniSTR desenvolvidos por Butler *et al.* (2003). Adaptado de Coble *et al.* (2006).

Vários autores já desenvolveram miniSTR para caracterizar os STR existentes nos *kits* comerciais (Hellmann *et al.*, 2001; Tsukada *et al.*, 2002; Butler *et al.*, 2003), incluindo também os STR do cromossoma Y (Asamura *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007). Contudo, também têm vindo a ser descritos novos polimorfismos miniSTR distintos dos existentes, tais como os *loci* D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 e D22S1045, que foram seleccionados entre miniSTR com elevada heterozigotia (Butler *et al.*, 2003; Coble & Butler, 2005). Inclusivamente, com o objectivo de padronizar metodologias na Europa e da criação de bases de dados genéticas, foi recomendada pelo ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) e pela EDNAP, a adopção dos miniSTR D10S1248, D22S1045 e D2S441, por apresentarem um elevado grau de polimorfismo (Gill *et al.*, 2006a; Gill *et al.*, 2006b).

Os miniSTR têm vindo a ser descritos como polimorfismos que apresentam as seguintes vantagens:

- São uma ferramenta valiosa na análise de DNA altamente degradado;
- São mais sensíveis por proporcionarem fragmentos de amplificação de menor tamanho (Butler & McCord, 2006);

- c) MiniSTR não relacionados com os STR estudados actualmente, quando analisados em conjunto com estes aumentam a robustez de uma análise forense, pelo aumento do poder de discriminação (Coble, 2005);
- d) Podem ser analisados recorrendo a equipamento e técnicas habitualmente usadas para a análise de STR (Budowle *et al.*, 2005);
- e) Tal como os STR, podem ser usados para a análise de amostras com quantidades exíguas de DNA (ver ponto 1.3.1.2 deste capítulo) (Bender & Schneider, 2005; Coble & Butler, 2005); e
- f) Os resultados obtidos podem ser comparados com os dos STR, o que pode ser útil, por exemplo, na pesquisa em bases de dados.

Todavia, também apresentam algumas desvantagens:

- a) Nem todos os *loci* STR podem ser transformados em miniSTR, porque as suas zonas flanqueadoras não têm características que permitam a ligação de *primers* (Coble & Butler, 2005);
- b) Apenas um número limitado de *loci* podem ser amplificados em simultâneo (multiplex), porque os fragmentos dos vários *loci* possuem tamanhos semelhantes entre si; e
- c) Em alguns casos, não existe relação entre o genótipo determinado com STR e o determinado com miniSTR, para o mesmo polimorfismo e com a mesma amostra, devido a mutações (alteração no número de bases) que ocorrem entre a zona de ligação dos *primers* para STR e para miniSTR, ou na própria zona de ligação (Drábek *et al.*, 2004).

Assim, os miniSTR começam a desempenhar um papel muito importante, principalmente na análise de DNA degradado, como no estudo de restos cadavéricos (por exemplo em grandes catástrofes) com o objectivo de possibilitar a recuperação de informação que não pode ser obtida através do estudo de STR.

1.1.3 Marcadores SNP

Os SNP são polimorfismos que consistem em mutações pontuais do tipo substituições nucleotídicas, inserções ou deleções, que ocorrem apenas numa determinada posição nucleotídica. São muito abundantes no genoma humano, tendo sido a sua frequência estimada em 1 em cada 1000 bases (Internacional SNP Working group, 2001).

Como a sua taxa de mutação é muito baixa, são considerados eventos evolutivos únicos, pelo que são registos simples do passado evolutivo das populações humanas actuais. São, por isso, marcadores muito usados em estudos evolutivos. Para além disso, destaca-se a sua utilidade na análise de amostras degradadas, quando não é viável o estudo de STR, porque são polimorfismos que produzem fragmentos de amplificação bastante reduzidos, por vezes inferiores a 100 pb (Butler, 2005).

Contudo, cada SNP só permite, no máximo, a obtenção de três genótipos. Este facto conduz à necessidade de se analisar um número elevado de SNP para se obter um poder de discriminação similar ao dos STR (Sobrino *et al.*, 2005), estimado em aproximadamente 50

SNP para equivaler a 16 STR (Amorim & Pereira, 2005). Além disso, a sua análise necessita de elevadas quantidades de amostra, facto que impossibilita a sua aplicação em amostras com quantidades exíguas de DNA.

1.1.4 O DNA mitocondrial

Em situações em que as amostras estão extremamente degradadas e/ou com quantidades reduzidas de material genético, também se pode recorrer à análise das regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial (mtDNA) (Balogh *et al.*, 2003).

O mtDNA, encontra-se nas mitocôndrias; é circular, de dupla cadeia e está presente em 1000 a 10 000 cópias por célula. Estas características conferem ao mtDNA vantagem na análise de amostras degradadas ou com baixa quantidade de material celular. No entanto, a sequenciação das regiões hipervariáveis HVI e HVII do genoma mitocondrial é uma metodologia laboriosa e demorada. Por outro lado, como está em haploidia, a hereditariedade não é mendeliana, não proporcionando um poder de identificação individual elevado, quando comparado com o dos STR autossómicos.

Assim, o estudo do mtDNA limita-se aos casos em que, através da análise do DNA nuclear, não se obtêm resultados ou naqueles em que se pretende informação adicional, uma vez que o estudo de STR proporciona um poder de discriminação muito superior e a metodologia de análise é menos complexa (Lima, 2004).

1.2 Impressões digitais como fonte de DNA

A pele é o maior órgão do corpo humano, chegando a pesar 15% do peso total do corpo (Raven & Johnson, 1986). Na superfície da pele humana existem células que podem ficar aderentes a uma qualquer superfície, com a qual ocorra um contacto. Estas células têm origem na descamação da pele (perdem-se cerca de 400 000 células por dia desta forma) e, também, provêm das secreções produzidas pelas glândulas sudoríparas e sebáceas que arrastam células das paredes dos ductos (canais que ligam as glândulas à superfície da pele ou ao pêlo, respectivamente), libertando-as através dos poros (Raven & Johnson, 1986). Quando existe um contacto da pele com um objecto, o suor e o óleo sebáceo ficam aderentes a esse objecto, podendo também ficar depositadas algumas dessas células. Estas, por serem nucleadas (cada célula contém sensivelmente 6 pg de DNA nuclear), poderão ser uma fonte viável de DNA nuclear (Darnell *et al.*, 1986).

Van Oorschot & Jones (1997) mostraram, pela primeira vez, que se podiam obter perfis genéticos a partir de objectos que tinham sido manipulados, mesmo que brevemente. Consequentemente, com o mesmo tipo de técnicas, vários autores obtiveram perfis genéticos a partir de resíduos de ID latentes, deixadas por simples contacto da pele com determinadas superfícies, como papel, facas, fita adesiva, cordas, fios e armas de fogo (Wiegand & Kleiber, 2000; Zamir *et al.*, 2000; Balogh *et al.*, 2003; Petricevic *et al.*, 2006; Jasuja *et al.*, 2006). Se

estes suportes estiverem envolvidos em crimes, a recolha e interpretação dos resultados do estudo do DNA das células aí depositadas, pode ser um meio de identificação forense valioso.

1.2.1 Impressões digitais – amostras low copy number

Têm sido atribuídas várias definições de amostras *Low Copy Number* (LCN), quer como sendo amostras com quantidade de DNA genómico inferior a 100 pg (o equivalente a aproximadamente 15 a 17 células diplóides) (Gill *et al.*, 2000); ou amostras com quantidade de DNA que torne a amplificação por PCR não fiável (determinado por cada laboratório, mas normalmente entre 150 pg e 250 pg); e, ainda, quando é necessário aumentar o número de ciclos de PCR para se obter uma maior sensibilidade.

Pode-se dizer, e independentemente da definição mais correcta, que amostras LCN são as que possuem uma quantidade de material genético suficientemente baixo para que não seja viável a sua análise pelos métodos genéticos rotineiramente usados nos laboratórios forenses. Além disso, a designação de amostra LCN é apenas dependente da quantidade de DNA que nela se encontra e não do número de ciclos de PCR usados para a sua análise.

Ao longo deste trabalho, considera-se uma amostra LCN como sendo a que tem uma quantidade de DNA genómico inferior a 100 pg. É também importante referir que, para efeitos práticos deste trabalho, o termo LCN significará a técnica usada para a análise deste tipo de amostras e que se irá expor mais adiante.

Em relação a vestígios de contacto da pele, como as ID, pode-se imaginar que a quantidade de células que se consegue recolher de um desses vestígios é normalmente muito baixa. Os vários estudos que têm sido efectuados através da análise genética de ID referem que, a maioria das vezes, a quantidade de DNA nuclear que é possível extrair é inferior a 100 pg (Alessandrini *et al.* 2003; Lowe *et al.*, 2002). Desta forma, sempre que existe a possibilidade de analisar ID geneticamente deve-se considerar a possibilidade de ser uma amostra LCN. Por este motivo, as metodologias de análise genética nuclear destes vestígios não estão ao alcance de qualquer laboratório forense, pois, como se irá constatar (no ponto 1.3 deste capítulo), é necessário implementar alterações logísticas e metodológicas, tanto no laboratório como nos procedimentos de análise da cena do crime.

Para além da exiguidade de material genético existente em ID, importa referir que existem evidências que mostram que uma fracção desse DNA se encontra degradado. Esta circunstância deve-se ao facto destas células desenvolverem um fenómeno celular, designado por apoptose, que tem como consequência a degradação do DNA nuclear em fragmentos de aproximadamente 200 pb. A enzima responsável por esta reacção catabólica é uma endonuclease dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Teraki & Shiohara, 1999).

1.2.2 Os dedos como vectores por excelência

Quando um crime é cometido, e particularmente aqueles que não são cuidadosamente planeados, como os crimes de oportunidade, existe sempre a possibilidade do criminoso deixar vestígios dermopapilares (lofoscópicos). Numa perspectiva lofoscópica, estes vestígios terão um maior interesse para a resolução do crime se tivessem sido produzidos pelas extremidades dos dedos (dactiloscópicos), pela palma das mãos (quiroscópicos) ou pela planta dos pés (pelmatoscópicos). Isto porque, é nestas zonas que melhor se identificam padrões dermopapilares; e, também, porque estas zonas, conhecidas como “friction skin”, estão mais vezes em contacto com objectos.

Numa perspectiva genética, qualquer que seja o vestígio produzido pela pele é uma fonte potencial de DNA. No entanto, os dedos assumem um papel relevante no transporte de células para os objectos, pois além das células que já possuem, transportam células de outras zonas do corpo, como boca, nariz, olhos, entre outras. Ao serem praticados actos inconscientes, como esfregar os olhos, a cara, o nariz e a boca, ou mesmo roer as unhas, pode-se arrastar uma grande quantidade de células nucleadas para os dedos. Além disso, os dedos estão justamente incluídos no grupo da “friction skin”, pois são das zonas do corpo que mais contactam com o mundo físico. Estas duas características aumentam a possibilidade de passagem de células do corpo para objectos.

Assim, ao longo deste trabalho, refere-se de uma forma geral, a ID, mas o mesmo tipo de questões teórico-práticas aplica-se a qualquer vestígio produzido pelo contacto da pele.

1.2.3 Factores de variação da deposição das células

A partir do momento em que foram encetadas as primeiras experiências em análise genética de ID, os autores perceberam que a quantidade de células depositadas dependia de vários factores (Kisilevsky & Wickenheiser, 1999).

Alguns desses factores estão identificados, mas certamente que outros poderão também contribuir. A variabilidade individual, a área de contacto com o objecto, o tipo de superfície (suporte), as condições ambientais (como a humidade e calor), a transpiração (exercício físico antes do toque), a força exercida durante o contacto e a história de contactos anteriores, são alguns dos exemplos mais conhecidos (Ladd *et al.*, 1999; Lowe *et al.*, 2002; Wickenheiser, 2002; Phipps & Petricevic, 2007).

Kisilevsky & Wickenheiser (1999) efectuaram o estudo da relação de alguns destes factores com o material genético recuperado, tendo verificado que a quantidade de DNA transferido para o substrato é independente do tempo de manuseamento, pois parece que a transferência das células é instantânea. Daí que a história de contactos anteriores seja um importante factor a ter em consideração, pois se um individuo tocar duas vezes seguidas num objecto, da segunda vez deixará menos células, porquanto uma grande parte ficou

retida no primeiro toque. No entanto, se o tempo entre um toque e o seguinte for elevado, este factor deixará de ser tão relevante.

Estes autores demonstraram também que existe uma grande variação entre indivíduos, no que respeita à quantidade de células que ficam depositadas numa ID. Em concordância com estes resultados, outros estudos (Lowe *et al.*, 2002) mostraram que alguns indivíduos têm uma maior predisposição natural para depositarem mais células – designados bons dadores (*good shedder*) – do que outros – designados maus dadores (*poor shedder*). Lowe *et al.* (2002) concluíram que os bons dadores, mesmo depois de lavar as mãos, depositam uma quantidade suficiente de células que permite estabelecer o seu perfil genético completo. Pelo contrário, dos maus dadores apenas se consegue recuperar um perfil genético parcial, mesmo duas horas após terem lavado as mãos (Figura 7). Esta variação deixa de ser significativa a partir de 2 a 6 horas. Estes resultados confirmam os também obtidos por van Oorschot & Jones (1997) e Ladd *et al.* (1999).

As razões que explicam esta variação permanecem mal conhecidas, pelo que mais investigações são necessárias. Parece, no entanto, não existirem diferenças significativas quanto à deposição de células entre a mão esquerda e a mão direita de um mesmo indivíduo (van Oorschot *et al.*, 2003).

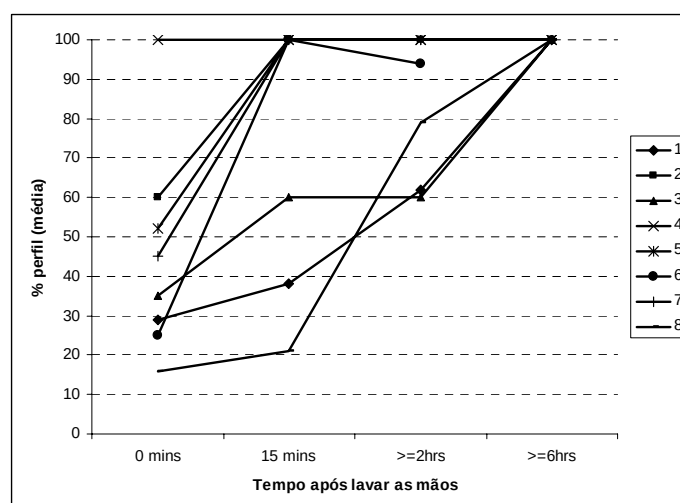


Figura 7. Gráfico da variabilidade na deposição de células entre oito indivíduos. Adaptado de Lowe *et al.* (2002).

O tipo de suporte sobre o qual a ID está depositada é, também, muito importante. É interessante perceber que as superfícies habitualmente consideradas ideais para a visualização e transplante de ID (lisas e não porosas, como vidro e metal) são pouco adequadas para a recuperação de DNA. Pelo contrário, superfícies habitualmente inadequadas para fins lofoscópicos (superfícies rugosas), são bons suportes para a recolha de DNA vestigial (Wickenheiser, 2002). Esta constatação está principalmente relacionada com o facto de superfícies rugosas funcionarem um pouco como lixa, conseguindo remover

algumas células da pele, particularmente se o contacto não for um mero toque, mas sim um toque seguido de arrastamento.

1.3 Análise genética de amostras LCN

Normalmente, para a análise de amostras com pouco DNA, os laboratórios forenses efectuem o estudo do mtDNA mas, como referido, este é pouco informativo e a sua análise é muito laboriosa. É, portanto, vantajoso obter-se informação do DNA nuclear, pois é muito mais informativo e individualizante. Por conseguinte, é da análise deste tipo de DNA que se trata quando se fala em análise genética de ID.

1.3.1 Análise LCN – STR

Vários autores têm desenvolvido métodos e estratégias que permitem aumentar a sensibilidade dos métodos comuns, possibilitando, desta forma, a detecção de um número muito pequeno de moléculas de DNA.

O *nested*-PCR tem sido sugerido como um método possível para aumentar a sensibilidade (Strom & Rechitky, 1998). Este método utiliza dois conjuntos de *primers* em duas reacções separadas de PCR. Na primeira, é amplificada a zona de repetição STR e uma região adjacente, onde se ligam os *primers*. Na segunda reacção, são usados *primers* desenhados para que se obtenha um produto de amplificação mais pequeno, utilizando como amostra uma alíquota do produto da primeira reacção. Esta técnica reduz a quantidade de produtos não específicos e permite analisar quantidades ínfimas de DNA (Snabes *et al.*, 1994); contudo, há a necessidade de transferência de produtos de PCR para outros tubos, incrementando a possibilidade de ocorrência de contaminações.

Existem outros estudos que procuram demonstrar que a amplificação total do genoma (WGA), com Repli-g 625S (Molecular Staging), GenomiPhi (Amersham Biosciences) ou outros produtos, antes da amplificação específica para os *loci* que se pretendem analisar, poderá ser um método eficaz para aumentar a quantidade de DNA inicial de amostras LCN (Schneider *et al.*, 2004; Hanson & Ballantyne, 2005; Ballantyne *et al.*, 2007). Estes autores referem que amostras com quantidades exíguas de DNA são analisadas com maior sucesso efectuando a WGA numa fase prévia à amplificação específica dos *loci*. Ballantyne *et al.* (2007) mostraram inclusivamente que, aplicando esta técnica a ID, se obtinham melhores resultados do que com a análise normal. No entanto, além de terem apenas analisado uma amostra (não demonstrando, por isso, a reprodutibilidade dos resultados) não compararam os resultados desta metodologia com os que possivelmente obteriam com o aumento do número de ciclos.

Recorrendo a simulações do processo de análise genética de amostras LCN, parece que a WGA não traz vantagens sobre o actual método de análise LCN (Gill *et al.*, 2005), pois este método não será capaz de ultrapassar os artefactos provocados pela variação estocástica,

característicos deste tipo de amostras. Parece, pois, que mais experiências devem ser realizadas.

Findley *et al.* (1997) demonstraram que uma única célula (bucal) podia ser analisada quando se aumentava para 34 o número de ciclos da PCR, ao contrário dos normais 28 ciclos. Estas condições foram usadas com sistemas multiplex de segunda geração (SGM). Esta alteração no protocolo permite a produção de um maior número de cópias das moléculas de DNA iniciais, possibilitando a sua detecção. No entanto, a interpretação dos resultados parece não ter sido fácil, principalmente devido à formação de alguns artefactos.

Porém, alguns autores advertem que aumentar o número de ciclos da PCR não é a melhor opção, pois alegam que ao incrementar a sensibilidade desta forma são produzidos artefactos que inviabilizam a interpretação dos resultados. Budowle *et al.* (2001) referem um conjunto de alternativas de forma a aumentar o sinal de um perfil de STR, sem incrementar o número de ciclos e o concomitante aparecimento de artefactos:

- a) Reduzir o volume da PCR para obter produtos de amplificação mais concentrados;
- b) Filtrar os produtos de PCR, para remover iões que competem com os produtos de amplificação, quando estes são injectados nos capilares;
- c) Usar formamida de baixa condutividade;
- d) Adicionar mais produto amplificado para a análise no sequenciador; e
- e) Aumentar o tempo de injeção no capilar.

Contudo, para a grande maioria das situações LCN, aplicar apenas estas condições não é suficiente, sendo também necessário aumentar a sensibilidade da PCR através do aumento do número de ciclos. Por este motivo, e apesar dos artefactos produzidos, a comunidade científica, de uma forma geral, refere sempre o aumento do número de ciclos como a melhor solução para a análise de amostras LCN.

A aplicação de análises LCN na casuística dos laboratórios forenses foi feita pela primeira vez em 1999 no Forensic Science Service (www.forensic.gov.uk), no Reino Unido, como alternativa ao mtDNA. A partir deste momento, alguns outros laboratórios por todo o mundo começaram também a adoptar essa metodologia. Em Portugal, tanto quanto se sabe, não se tem usado esta estratégia; todavia, uma vez as condições perfeitamente estabelecidas para efectuar este tipo de análise, será uma boa opção implementá-la; concomitantemente dever-se-á proporcionar formação aos profissionais ligados à investigação criminal, designadamente aos que efectuam o exame à cena do crime, no sentido de procederem contextualizando amostras LCN.

1.3.1.1 Amplificação por PCR

O aumento do número de ciclos na identificação genética tem sido rotineiramente usado por antropólogos e peritos forenses para a análise de DNA de ossos antigos (Capelli *et al.*, 2003). Schmerer *et al.* (1999) e Burger *et al.* (1999) analisaram STR em ossos com milhares de anos usando, respectivamente, 60 e 50 ciclos de PCR; Gill *et al.* (1994), recorrendo a 38-43 ciclos,

analisaram ossos com cerca de 70 anos da família Romanov. Outros autores têm aplicado esta estratégia na resolução de casos criminais (Wiegand *et al.*, 2000).

Esta metodologia foi adoptada para a análise de amostras LCN. Gill *et al.* (2000), na tentativa de definir o número ideal de ciclos que permitisse a análise destas amostras, em que se verificasse um bom compromisso entre a qualidade dos resultados³ e a sensibilidade, efectuaram experiências nas quais compararam os resultados obtidos com amplificações realizadas de 28 a 56 ciclos. Os autores concluíram que 34 ciclos ofereciam melhores resultados, não havendo aumento do sucesso usando um número de ciclos para além deste valor. Resultados idênticos foram obtidos por Van Hoosfstat *et al.* (1998), que verificaram que a utilização de 34 ciclos constitui um bom compromisso entre a sensibilidade da PCR e a qualidade da amplificação. Esta inovação no protocolo habitual permite, assim, que as moléculas de DNA vestigial sejam amplificadas muitas vezes até atingir um número que permita a sua detecção, possibilitando a análise de amostras com apenas algumas células.

Existem ainda autores que também optam por aumentar a quantidade de DNA polimerase, pois alegam que desta forma também conseguem maior sensibilidade da reacção (Coble & Butler, 2005).

Deve-se ter em atenção que, dependendo do *kit* de amplificação que se utiliza, o número de ciclos para se obter a mesma sensibilidade, pode variar. Por exemplo, comparando os *kits* AmpF[®]STR[®]Identifiler[™] (Applied Biosystems) e o Powerplex[®]16 (Promega), verifica-se que o último, em condições normais, requer um maior número de ciclos (isto tem a ver com a menor concentração de *primers* deste *kit* aliado à menor concentração de Taq DNA Polimerase usada). Deste modo, em condições LCN, o último necessita de mais ciclos para proporcionar a mesma sensibilidade.

Leclair *et al.* (2003) referem que a redução do volume da PCR pode aumentar a sensibilidade da reacção e levar à detecção de mais alelos. Estes autores verificaram que reduzindo o volume de reacção para 5 µl detectavam alelos que, com volumes maiores de reacção, não conseguiam identificar. A redução do volume de PCR é vantajosa na medida em que se usam menores quantidades de amostra, permitindo conservar amostra de vestígios irrecuperáveis que pode ser usada, por exemplo, para fazer contraprovas. No entanto, se existirem inibidores, há menor oportunidade de estes se diluírem e, por isso, é maior a probabilidade de ocorrer inibição da reacção de PCR. Além disso, usando menores quantidades de DNA, numa perspectiva LCN, há maior probabilidade de ocorrer *allele dropout* (ver ponto 1.3.1.3 deste capítulo).

³ Como se vai ver mais à frente neste trabalho, aumentar o número de ciclos leva ao aparecimento de alguns artefactos que é necessário ter em consideração, aquando da interpretação dos resultados.

1.3.1.2 MiniSTR e impressões digitais

Como se verificou no ponto 1.1.2, é difícil obter resultados a partir dos alelos de maior tamanho em amostras altamente degradadas, amplificadas para tipagem de STR. Este facto é também observado quando se analisam amostras de DNA de ID. Os resultados têm demonstrado que os alelos maiores, como os dos sistemas D7S820 e D18S51, a que correspondem fragmentos de 250 a 341 pb, não são facilmente amplificados, havendo uma redução de 20% da amplificação, quando comparada com a dos *loci* com fragmentos de menor tamanho (Balogh *et al.*, 2003). O uso de miniSTR poderá permitir a obtenção dessa informação, uma vez que esses polimorfismos podem ser analisados sob a forma de miniSTR. A aplicação de miniSTR no estudo genético de ID pode, por isso, ser vantajosa, uma vez que poderá obter-se informação que, sistemas STR com fragmentos de amplificação maiores, não permitem.

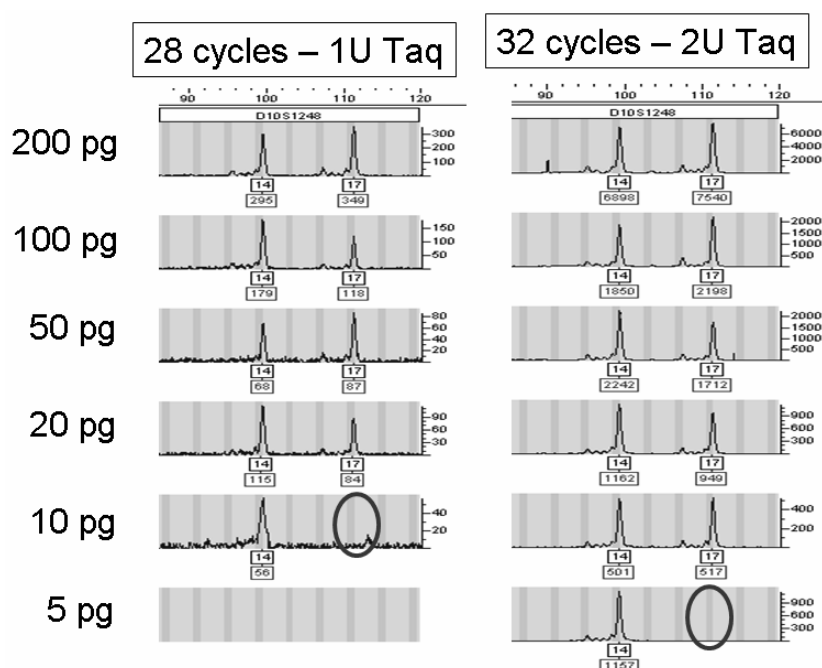


Figura 8. Teste de sensibilidade ao miniSTR D10S1248. Adaptado de Coble *et al.* (2006)

Os miniSTR não são mais do que STR com fragmentos de amplificação de pequeno tamanho, podendo-se mesmo afirmar que alguns STR de *kits* comerciais, como o D3S1358 e o D19S433 do *kit* Identifiler™, podem ser considerados miniSTR, pois o seu tamanho é comparável a miniSTR descritos na literatura (Grubwieser *et al.*, 2006; Coble & Butler, 2005; Butler *et al.*, 2003).

Neste sentido é fácil verificar que, tal como os STR, também os miniSTR podem ser usados em condições LCN; ou seja, aumentando o número de ciclos da PCR. Bender & Schneider (2005) construíram um multiplex para a caracterização de miniSTR e aplicaram-no com sucesso em amostras LCN, particularmente a hastas de cabelo telogénico. Coble & Butler

(2005) também testaram a sensibilidade dos miniSTR, descritos no seu trabalho, a quantidades de DNA extremamente baixas (mínimo de 5 pg) e com vários ciclos de PCR, demonstrando que estes se comportam da mesma forma que os STR (Figura 8).

Assim, aliando a capacidade de analisar material degradado à possibilidade de aplicar condições LCN, os miniSTR podem desempenhar um papel importante na análise de amostras LCN degradadas, como é o caso de ID. No entanto, não se encontraram referências bibliográficas que refiram essa aplicação.

1.3.1.3 Artefactos da análise LCN

Além das questões práticas que se podem colocar, tanto ao nível da análise da cena do crime, como ao nível de processos de extracção, a grande dificuldade da análise de amostras LCN, ao aumentar a sensibilidade do método, é a interpretação dos resultados. Como refere John Butler, *“trying to generate a reliable STR profile with only a few cells from a biological sample is similar to looking for an object in the mud or trying to decipher the image in a fuzzy photograph”* (Butler, 2005).

Podem, portanto, aparecer alguns artefactos (Gill *et al.*, 2000; Whitaker *et al.*, 2001) que, para poderem ser contornados, é necessário conhecer.

Aumento do tamanho dos produtos *stutter*. Como já foi referido, os produtos *stutter* são picos que resultam de cópias incompletas de alelos e que, em sistemas tetraméricos, têm menos 4 pb que o alelo correspondente (Figura 9, a)). Em LCN podem deixar de ter os típicos 5-15% do tamanho do alelo correspondente, passando a assumir tamanhos superiores. Neste contexto, os produtos *stutter* podem também ser designados por falsos alelos, pois existem situações em que não se consegue distinguir um *stutter* de um verdadeiro alelo.

Desequilíbrio heterozigótico. Walsh *et al.* (1992) propuseram ajustar o número de ciclos da PCR, de maneira a que o limite de sensibilidade do método fosse de aproximadamente 20 células (≈ 125 pg de DNA). Aumentando os ciclos da PCR este limite deixa de existir. Esta preocupação faz sentido tendo em consideração o fenómeno da flutuação ou variação estocástica, que parece ocorrer durante os primeiros ciclos da PCR em amostras vestigiais. Se um alelo com baixo número de cópias for amplificado, por acaso, nos primeiros ciclos da PCR, será amplificado preferencialmente nos ciclos seguintes (não é um fenómeno dependente do tamanho dos alelos). Como consequência, esse alelo terá uma dimensão muito maior do que a do outro alelo do mesmo *locus* (Figura 9, b)). A formação deste desequilíbrio nos genótipos heterozigóticos e o aumento da dimensão dos *stutters* vai inviabilizar a interpretação de misturas recorrendo às áreas dos picos (Gill *et al.*, 1998).

Allele dropout. Caracteriza-se pelo desaparecimento de um dos alelos de um *locus* (Figura 9, c)). É também provocado pela flutuação estocástica, podendo ser considerado o resultado de um desequilíbrio heterozigótico muito acentuado. Pode levar a que se considere a amostra como homozigótica para aquele *locus*, quando na verdade é heterozigótica.

Locus dropout. Este fenómeno ocorre quando nenhum dos alelos do *locus* é detectado. A sua ocorrência também é devida a variações estocásticas ou à degradação do material genético (normalmente para *loci* com fragmentos de amplificação elevados).

Allele dropin. Aparecimento de alelos extra (Figura 9, d)). É consequência de contaminações esporádicas, que são detectadas pelo facto do método ser muito sensível. O *allele dropin* é um fenómeno que, em geral, não é reprodutível e que pode ser detectado analisando uma mesma amostra várias vezes. Taberlet *et al.* (1996) calcularam a probabilidade de se obter um alelo extra em 5%. Por isso, a probabilidade de se detectar este mesmo alelo em duas análises independentes é inferior a 1%.

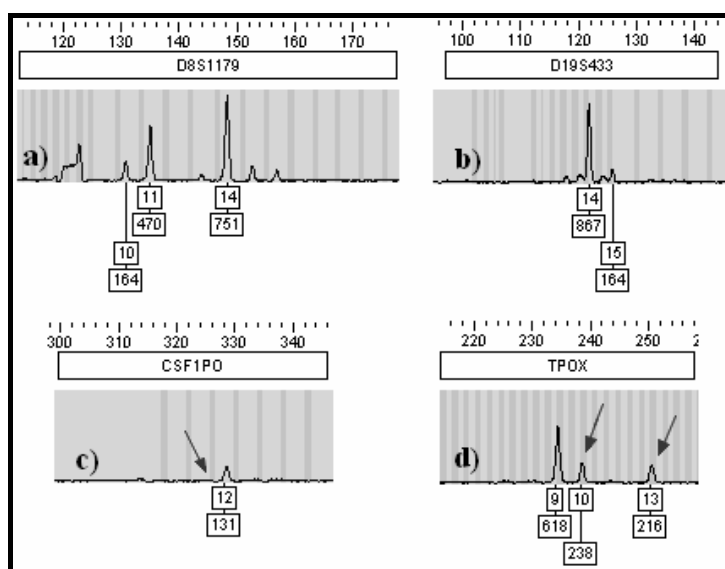


Figura 9. Electroforetograma da análise genética, com Identifiler™ 34 ciclos, de uma ID. a) o alelo 10 é um produto *stutter* do alelo 11 e tem aproximadamente 35% do seu tamanho (altura); b) caso de desequilíbrio heterozigótico entre o alelo 14 e o 15; c) situação de *allele dropout*, o alelo 11 não foi detectado, levando a que se considere uma situação de homozigotia, quando na verdade é heterozigotia; e d) os alelos 10 e 13 são contaminantes (*allele dropin*), não fazendo parte do perfil genético do indivíduo em questão, neste caso também ocorreu *allele dropout*, pois o genótipo do indivíduo para este sistema é 9,11.

Tendo em vista obviar os artefactos mencionados, foi proposto por Gill *et al.* (2000) e Whitaker *et al.*, (2001) um conjunto de regras, as quais permitem mais facilmente interpretar perfis LCN:

a) Efectuar amplificações múltiplas da mesma amostra e apenas considerar como verdadeiros (pertencentes à amostra) os alelos presentes em, pelo menos, duas dessas amplificações – método do “consenso”. Este método já tinha sido sugerido por Taberlet *et al.* (1996), a que chamaram a “regra da duplicação”. Gill *et al.* (2000) adoptaram-na e demonstraram que ela é conservativa tendo em consideração um novo método de *likelihood ratio* (LR), que tem em consideração contaminações esporádicas, formação de *stutters* e *allele dropout*;

- b) Se os controlos negativos, relacionados com um conjunto de amostras, revelarem os mesmos alelos em, pelo menos, dois desses controlos, esses alelos não devem ser considerados em nenhuma amostra e, se possível, estas devem ser reanalisadas; e
- c) Se for detectado algum alelo numa amostra que não pertença ao perfil do suspeito, devem ser consideradas outras metodologias de identificação.

1.3.2 Recolha e extracção de DNA LCN

Os processos de recolha e extracção do DNA de amostras LCN são de extrema importância para o sucesso da análise, pois é com estes passos que o processo se inicia; se estes forem mal efectuados, a amostra pode-se tornar inviável em termos de resultados de análise.

Tem-se verificado que a quantidade de DNA que se extrai é consideravelmente menor que o esperado, tendo em consideração o número de células que existem na ID; esta circunstância sugere que muito do DNA é perdido durante o processo de recolha das células e da extracção do material genético (van Oorschot *et al.*, 2003). Quando se analisam amostras com quantidades vestigiais de DNA, é extremamente importante dispor de um eficiente protocolo de recolha e extracção, pois a perda de alguns picogramas de DNA pode significar a eliminação de uma considerável porção da amostra.

A quantidade de DNA recuperado de ID é normalmente muito baixa, ou seja, perto dos limites de sensibilidade da detecção. O sucesso da análise genética de ID depende muito da forma como o DNA é recolhido no local do crime. Normalmente, recorre-se a uma zaragatoa humedecida em água estéril para limpar as superfícies. Este parece ser o método mais fácil e eficaz; no entanto, tem sido demonstrado que uma só zaragatoa não consegue colher a totalidade de amostra existente. Pang & Cheung (2007) demonstraram que uma segunda zaragatoa seca, depois de limpa a superfície com uma húmida, permite a recolha de quantidades elevadas de DNA, conseguindo-se, por vezes, através da sua análise, a detecção do perfil completo. A zaragatoa seca permite recuperar por capilaridade as células já hidratadas pela zaragatoa húmida. Desta forma, é recomendado, no mínimo, o uso de uma zaragatoa húmida seguida de uma seca ou a utilização de várias zaragatoas no mesmo local (van Oorschot *et al.*, 2003).

Em relação aos métodos de extracção de DNA, têm vindo a ser descritos vários, alguns dos quais complexos, envolvendo múltiplos passos de lavagem e purificação, que permitem recuperar o material genético com elevada qualidade. Sabe-se, no entanto, que em cada passo do processo de extracção (como mudança de tubos), algum DNA é perdido (Schiffner *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstram que 20% a 76% do DNA que é recolhido com uma zaragatoa é perdido durante a fase de extracção (van Oorschot *et al.*, 2003).

Schiffner *et al.* (2005) estudaram vários protocolos de extracção, comparando a quantidade de DNA que conseguiam recuperar, tendo constatado que, para amostras LCN, protocolos mais complexos, que implicam grande manipulação das amostras, proporcionavam piores resultados do que os protocolos mais simples, em que a extracção se processa

maioritariamente no mesmo tubo. A utilização de protocolos mais complexos, leva muitas vezes a que grande parte do DNA da amostra fique retido nas paredes dos tubos ou nas colunas usadas para a sua purificação e concentração; pelo que, sempre que se faz uma transferência de amostra de um tubo para outro, há perda de alguns picogramas. Assim, parece que o uso de protocolos que envolvam um número reduzido de passos, permite não só recuperar grandes quantidades de DNA como, também, reduzir as contaminações inerentes ao material utilizado.

Outra tecnologia que poderá permitir uma mais eficaz análise de poucas células é a captura de células por microdissecção. Este método consiste em isolar células de um vestígio, de maneira a que apenas estas sejam analisadas, eliminando todo o *background* que, normalmente, não interessa. Elliot *et al.* (2003) fizeram um estudo da sua aplicação no isolamento de espermatozoides de lâminas resultantes de esfregaços vaginais pós-coito, e verificaram que, desta forma, se eliminava com sucesso a maioria do DNA feminino. O isolamento de algumas células de ID e a sua imediata amplificação por PCR, sem extracção do material genético (sabe-se que é possível, ver Findley *et al.*, 1997), poderá permitir a diminuição de contaminação introduzida pelos métodos de extracção, para além de possibilitar a análise de várias células do mesmo vestígio e a comparação dos perfis obtidos. Desta forma, consegue-se perceber e interpretar, de uma forma concreta, a presença de misturas, frequentemente verificadas quando se efectua a análise genética de ID. Esta técnica, apesar de ainda não ter sido aplicada a estes vestígios, certamente poderá dar um excelente contributo, podendo constituir um bom tema de investigação futuro.

1.3.3 Reveladores de impressões digitais latentes

Na prática, a ID mais frequente é invisível (latente), sendo, por isso, difícil de localizar. Durante a análise da cena do crime, o investigador pode-se deparar, por exemplo, com uma parede onde provavelmente o criminoso tocou. Nesta situação tem duas opções, ou tenta recolher DNA de uma zona da parede, convicto de que foi naquela região que o criminoso tocou, ou então tenta revelar os vestígios dermopapilares latentes, que poderão estar na parede, com agentes químicos ou físicos reveladores. Estes agentes reveladores permitem que o vestígio latente se torne visível.

O efeito destes agentes reveladores na recuperação de DNA também tem sido investigado. Balogh *et al.* (2003) verificaram que, depois da aplicação dos reveladores, apenas se obtinha uma média de 47% de perfis genéticos. Resultados obtidos por Lowe *et al.* (2003) para revelações com cianoacrilato, pó de alumínio, ninidrina, deposição metálica e revelação física, mostram que se conseguem obter perfis genéticos depois da revelação com todos estes agentes. Todavia, a percentagem de perfis obtidos é baixa (mínimo de 33%), parecendo haver uma acção inibitória da PCR por parte destes reveladores. Outra hipótese poderá ser que, no caso de reveladores sob a forma de pó, por terem uma aplicação mecânica (normalmente com um pincel), possa ocorrer a remoção de algumas células. Por este motivo, alguns autores recomendam o uso de cianoacrilato e deposição metálica como métodos

preferenciais, pois como não pressupõem uma aplicação mecânica, são métodos menos destrutivos do conteúdo genético das ID. Além disso, tem sido especulado que o facto de se colocar uma camada fina de acrilato, a cobrir as ID, preserva as células até que sejam colhidas (Wickenheiser, 2002).



Figura 10. Lâmpadas Crime-lite™. Disponível em www.fosterfreeman.com.

Em algumas situações, o uso de lâmpadas de determinado comprimento de onda (lâmpadas *Crime-lite™*) permitem visualizar parcialmente as ID (Figura 10). Como a luz emitida por estas não degrada o DNA, este poderá ser um óptimo método para detectar ID sem danificar o material genético e sem necessidade de revelar as ID latentes.

1.4 Transferência transversal de DNA

Normalmente a interpretação dos perfis genéticos obtidos mediante condições normais de amplificação (28 ciclos) é facilitada devido ao uso de sistemas pouco sensíveis. Isto é importante, porque os peritos têm de conseguir associar o perfil obtido ao vestígio. Usar métodos muito sensíveis, como aumentar o número de ciclos da PCR, pode detectar moléculas de DNA de outras fontes, que não apenas do indivíduo que deixou o vestígio.

A transferência transversal de DNA pode ser definida como a contribuição de DNA para as amostras encontradas e referentes ao acto criminoso, por parte de um ou mais indivíduo(s) não relacionado(s) com o crime, podendo ocorrer antes, durante ou depois deste.

O problema da transferência transversal de DNA coloca-se a um nível mais significativo no caso de análises LCN, não representando uma séria dificuldade nas análises normais dos laboratórios forenses. Isto deve-se, em exclusivo, à extrema sensibilidade do método LCN, protagonizada pelo aumento do número de ciclos da PCR, como já referido.

Assim, percebe-se que qualquer molécula de DNA que esteja na amostra é passível de ser detectada, tornando, deste modo, possível a detecção de moléculas de DNA não exclusivamente pertencentes ao criminoso.

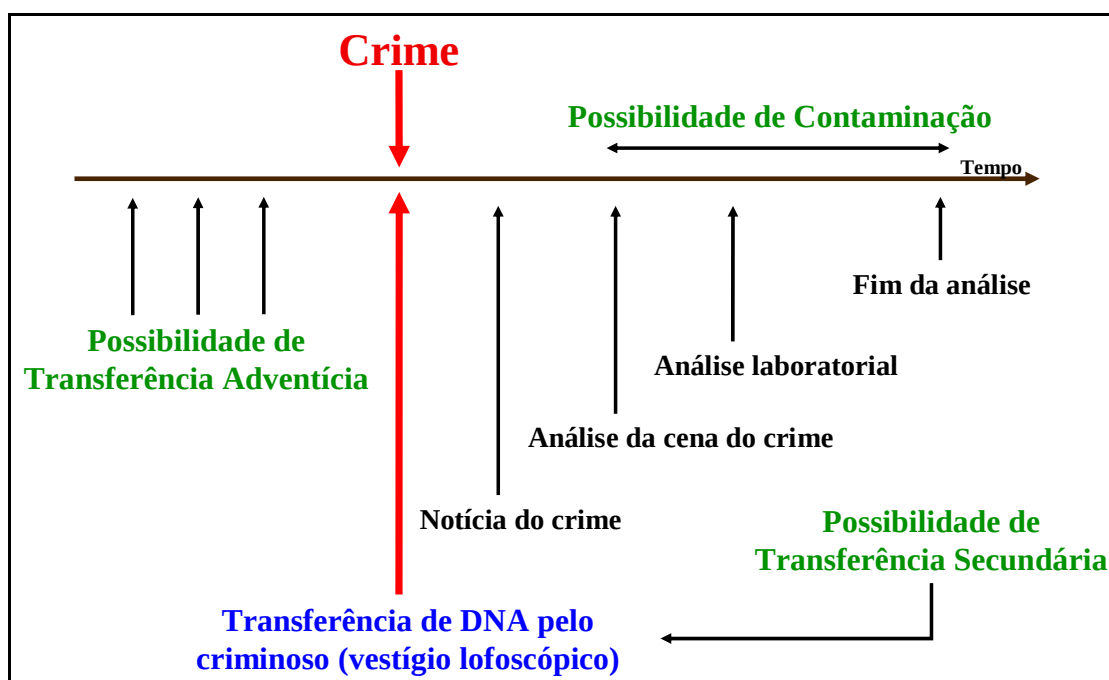


Figura 11. Esquema representativo do momento relativo da transferência transversal de DNA. Adaptado de Butler, 2006.

Na Figura 11 está representado o momento relativo ao acontecimento criminoso em que podem ocorrer as diferentes formas de transferência transversal de DNA: transferência adventícia, transferência secundária e contaminação. Nos tópicos seguintes ver-se-á, com mais detalhe, cada um destes tipos de transferência, bem como as diferentes estratégias para ultrapassar estes problemas.

1.4.1 Transferência adventícia

Apesar da experiência ter demonstrado que os objectos manuseados apresentam o perfil do manuseador mais recente, quando se faz uma análise LCN não se pode descurar a hipótese de um determinado alelo pertencer a um indivíduo não relacionado com o crime, que contactou com esse objecto de modo lícito, algum tempo antes do evento criminoso (Figura 11). Esta eventualidade, no caso particular desse objecto ser manipulado frequentemente como, por exemplo, um balcão do banco onde ocorreu, por hipótese, um roubo. É natural que nesse balcão existam vestígios lofoscópicos de vários indivíduos sem qualquer relação com o crime.

Não existem muitos estudos laboratorialmente controlados, que permitam definir com clareza a real dimensão deste fenómeno conhecido como transferência adventícia. Sabe-se, contudo, que pode levar à detecção de alelos numa amostra que não pertencem ao criminoso, conduzindo a uma falsa exclusão, à semelhança do que acontece com contaminações (Gill & Kirkham, 2004), ou então a misturas difíceis de interpretar (em parte devido aos artefactos produzidos por uma análise tão sensível, evidenciados no ponto

1.3.1.3 deste capítulo). Naturalmente que este fenómeno leva ao aumento da complexidade na interpretação de perfis LCN.

Uma tentativa de solução para este problema é fazer uma “amostragem genética” do DNA presente no local do crime que, não pertencendo ao criminoso, foi depositado antes do evento criminoso, de forma lícita. Será, por isso, boa prática recolher zaragatoas de várias zonas da periferia do vestígio suspeito, e identificar os alelos correspondentes a manipulações anteriores ao crime.

1.4.2 Transferência secundária

Além da transferência normal de células de um indivíduo para um objecto manipulado (transferência primária), também tem sido demonstrado que é possível ocorrer transferência secundária de células (por exemplo, transferência de células de um indivíduo para outro e subsequentemente para um objecto) através de contactos casuais, como o aperto de mãos. Van Oorschot *et al.* observaram que a 28 ciclos, para o *locus* TH01, ocorria transferência primária e transferência secundária, resultantes de contacto físico com objectos. Contudo, Ladd *et al.* (1999), também com 28 ciclos, defendem que a transferência secundária não ocorre com tanta frequência que justifique grande preocupação, porque numa transferência primária está envolvida pouca quantidade de células, estimada entre 20 a 1000. Por sua vez, a transferência secundária é improvável, porque um grande número destas células vai aderir ao indivíduo secundário ou irão ser perdidas, restando um número diminuto para a transferência secundária. Abaz *et al.* (2002), demonstraram também a remota possibilidade da transferência de DNA de um objecto para um indivíduo que o manipule.

No sentido de tentar esclarecer esta situação, Lowe *et al.* (2002), usando condições LCN, confirmaram que estes fenómenos parecem depender particularmente das características dos indivíduos, no que concerne à libertação de células pela pele. Considerando então os estudos de Lowe *et al.* (2002) (que se referiu no ponto 1.2.3), se o indivíduo (A) for bom dador (*good shedder*) e o (B) for mau dador (*poor shedder*), considerando que (A) é o dador secundário e (B) o primário, é possível que o fenómeno da transferência secundária ocorra com alguma probabilidade. Quanto à situação contrária, se (B) for dador secundário e (A) o primário, a probabilidade de se obter um perfil do indivíduo (B) é baixa. Os mesmos autores demonstraram também que a transferência de DNA de um indivíduo (A) para outro (B) e deste para a superfície de um objecto é possível em condições ideais como, por exemplo, se o indivíduo (B) com as mãos lavadas tocar objectos limpos, tendo previamente apertado a mão do indivíduo (A). Estes resultados apenas foram obtidos quando todos os contactos foram realizados em sequência, implicando que, numa situação real, ambos os indivíduos se encontrassem próximos um do outro. Ficou, então, demonstrado que é possível ocorrerem fenómenos de transferência secundária de DNA, mas que o mais frequente será encontrar misturas (Figura 12).

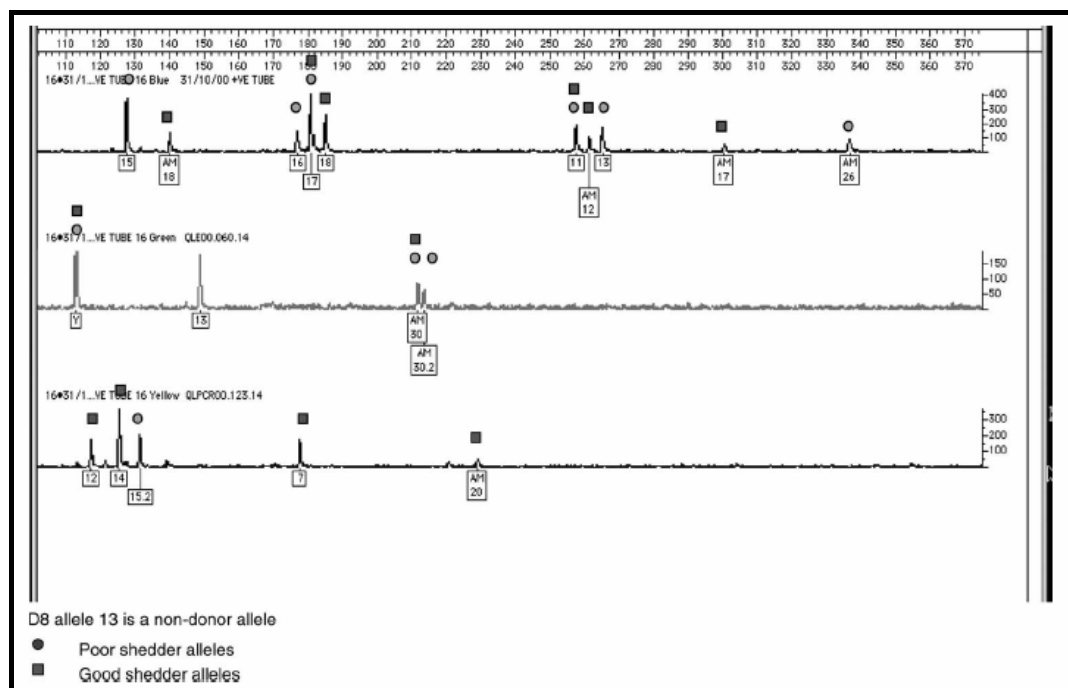


Figura 12. Perfil obtido da análise de um objecto após transferência secundária. Retirado de Lowe *et al.* (2002).

Estes autores defendem ainda que, em casos reais, quando se coloca a hipótese de transferência secundária, devem ser feitos testes específicos como, por exemplo, determinar o tipo de dador dos indivíduos envolvidos. Para além disso, é sempre importante ouvir a história dos implicados, para a tentar relacionar com os resultados genéticos.

1.4.3 Contaminação

A contaminação é outra forma de transferência transversal de DNA, que consiste na deposição de DNA nas amostras depois do crime ocorrer. Numa análise LCN é particularmente importante ter em consideração o risco de contaminação; pois, devido à elevada sensibilidade da amplificação, qualquer molécula de DNA pode ser detectada.

Gill & Kirkham (2004), num estudo para verificar o impacto das contaminações na investigação criminal, usaram controlos negativos para prever o nível de contaminação do laboratório. Este estudo permitiu concluir que o principal resultado que pode ocorrer de uma contaminação é uma falsa exclusão; esta circunstância deve-se ao facto do DNA contaminante poder ser preferencialmente amplificado, relativamente ao DNA vestigial da amostra e, deste modo, o perfil genético da amostra ser mascarado. No entanto, a concordância de perfis pode também ser um equívoco, pois a contaminação é susceptível de produzir um perfil semelhante ao de um indivíduo inocente.

Durante uma investigação, as contaminações podem ocorrer em várias fases do processo: (1) na análise da cena do crime, pelos próprios investigadores; (2) pelo pessoal do laboratório; (3) contaminação cruzada entre amostras e outras já processadas;

(4) contaminação ambiental, tanto do laboratório como da cena do crime; e (5) contaminação inerente ao material usado na análise laboratorial e no processamento da cena do crime. Contudo, e ao contrário das outras duas formas de transferência transversal, as contaminações são as únicas possíveis de evitar pelos investigadores, através do uso de boas práticas de recolha (no local do crime), acondicionamento, transporte para o laboratório forense e posterior análise. Segue-se uma pequena sistematização do que se considera ser o comportamento mais correcto, tanto na cena do crime, como no laboratório, de forma a evitar contaminações de amostras LCN.

1.4.3.1 Na cena do crime

Paul Kirk dizia, "não basta saber colher e preservar vestígios, é preciso saber o que deve ser colhido e porquê". A importância meritória desta frase ganha um significado ainda maior, quando pensamos na realidade portuguesa em termos de investigação criminal.

Como se sabe, em Portugal (à excepção de casos particulares) a recolha de vestígios biológicos da cena do crime está a cargo dos lofoscopistas. Assim, e de acordo com o que a frase de Paul Kirk preconiza, deve existir uma boa articulação entre investigadores (que fazem o exame da cena do crime) e elementos do laboratório forense (que fazem a análise dos vestígios). Num contexto LCN, esta articulação deve ser ainda mais estreita, pois os investigadores devem ter em mente a possibilidade de encontrar amostras LCN e a facilidade com que estas se podem contaminar com DNA dos próprios investigadores.

Durante a recolha de vestígios no local do crime, é necessário, desde logo, que o investigador coloque a hipótese de existirem amostras LCN e, neste caso, todos os cuidados, que normalmente se devem ter em consideração, devem ser redobrados.

Quando se fala em análise da cena do crime, pode-se estar a referir a horas de trabalho, em que poderão estar vários investigadores a laborar. Prevê-se, então, que o risco de contaminação seja bastante elevado, tendo em consideração um contexto LCN. Na verdade, estudos efectuados (Rutty *et al.*, 2003) mostram que o potencial de contaminação da cena do crime, devido à própria investigação, é bastante elevado. Demonstram ainda que, usar roupa protectora (como fatos descartáveis, toucas e máscaras), reduz a contaminação, mas dificilmente a elimina. Para além dos cuidados normais a ter, são sugeridas algumas outras regras que, num contexto LCN, poderão ajudar a reduzir o nível de contaminação: (1) quando se usa máscara ou touca, evitar manipulá-las; (2) reduzir os movimentos na cena do crime para os indispensáveis; (3) mudar frequentemente, e fora da cena do crime, de luvas e máscaras, de forma a evitar contaminação cruzada; (4) limitar o acesso ao local apenas a pessoas que podem contribuir de forma positiva para a resolução do caso; e (5) tentar minimizar a comunicação oral no local.

Como já referido, é difícil obviar a contaminação da cena do crime, pelo que deve ser feita uma lista de todos os intervenientes na análise e ter uma base de dados com os perfis genéticos desses indivíduos. Isto permite comparar os seus perfis e os das amostras,

prevenindo a consideração de vestígios que mais não são do que DNA contaminante, proveniente dos investigadores.

Em último lugar, todo o material usado na recolha dos vestígios biológicos deverá estar estéril, sendo de realçar que cada vestígio deve ser individualizado em contentor próprio.

1.4.3.2 No laboratório forense

As recomendações fornecidas pelos diversos autores, para o processamento de amostras LCN no laboratório, são basicamente as mesmas que para a análise de amostras normais, mas muito mais reforçadas. Assim, as extracções devem ser feitas numa área específica e separada da área de amplificação; o operador deve usar batas, luvas e máscaras descartáveis e mudá-las frequentemente; as bancadas e equipamentos devem ser tratados com DNA *cleaner* (ou equivalente) e irradiados com luz UV; todos os reagentes devem ser estéreis. É, ainda, essencial que amostras LCN, como DNA de ID, sejam analisadas num ambiente estéril (Gill, 2001; Ruttly *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem mesmo que este tipo de amostras sejam estudadas em áreas dedicadas, à semelhança do que acontece para o DNA antigo (Capelli *et al.*, 2003).

Tabela 1. Compilação dos alelos contaminantes detectados em 30 replicados de controlos negativos. Adaptado de Gill *et al.*, (2000).

Amostra	Amelo	D19	D3	D8	TH0	VWA	D21	FGA	D16	D18	D2
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	15	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	17	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	14	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	X	–	–	13	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	14	–	–	–	–	–	–	–	–
10	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	X	–	–	–	–	16	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	–	13	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15	–	–	16	–	–	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	15	–	–	–	–	–	–	–
17	X	15	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	X	14	–	14	–	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	28	–	–	–	–
20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	13	–
21	–	–	–	–	–	–	33.2	–	–	–	–
22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	–	–	–	10	–	–	25 27	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	–	–	15	–	–	–	–	–	–	–	–
26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
27	X	–	–	10	–	–	–	–	–	–	–
28	–	15	–	–	–	–	–	–	–	–	–
29	–	–	15	–	–	16	–	–	–	–	–
30	–	15	–	–	–	–	–	–	–	–	–
+ ve	X Y	14 15	15 17	11 12	6 7	16 17	28 31.2	23 25	11 13	12 13	17 22

Mesmo seguindo estas recomendações à risca, está provado que podem sempre aparecer contaminações esporádicas (Tabela 1) ou, ainda mais grave, sistemáticas (Gill *et al.*, 2000). Este facto poderá estar relacionado com a extrema dificuldade de manter um ambiente estéril, mas, também, com a circunstância dos *kits* comerciais para a análise de amostras (quer de extracção do DNA ou de amplificação por PCR), não incluírem, geralmente, controlo de qualidade para condições tão sensíveis.

O uso de controlos negativos constitui, por isso, uma ferramenta muito útil que permite minimizar as consequências das contaminações, uma vez que são detectáveis aquando da análise dos electroforetogramas desses controlos. Devem ser feitos, por rotina, controlos negativos da extracção e da amplificação. Num contexto LCN, é recomendada a replicação de controlos negativos de extracção, com o objectivo de determinar se a amplificação dos contaminantes de base é reprodutível. Deverá, ainda, ser feito um outro tipo de controlo negativo, relacionado com a recolha das amostras no local do crime como, por exemplo, colher uma amostra da área adjacente ao vestígio (como referido no ponto 1.4.1), pois permitirá controlar as contaminações ambientais e dos investigadores que possam ocorrer a este nível.

1.4.4 Hierarquia das proposições e LCN

Com a generalização das análises genéticas nas ciências forenses, houve a necessidade de desenvolver métodos de interpretação dos resultados. De entre os vários propostos, o conceito de “hierarquia de proposições”, desenvolvido por Cook *et al.* (1998) e Evett *et al.* (2000), proporcionou um maior entendimento na interpretação dos resultados genéticos.

A hierarquia de proposições apresenta-se, normalmente, sobre três níveis e tem como premissa que uma evidência científica só pode ser interpretada se, pelo menos duas proposições concorrentes, forem consideradas (Gill, 2001). No tribunal são consideradas proposições do tipo:

Nível III – nível da acusação.

- a) O suspeito é o perpetrador.
- b) O suspeito não está relacionado com o crime.

Neste nível, o mais alto da hierarquia, normalmente invocam-se considerações que estão para além da competência dos peritos. Por isso, recorre-se frequentemente às proposições do segundo nível.

Nível II – nível de actividade.

- a) O suspeito partiu a janela na cena do crime.
- b) O suspeito não está relacionado com o crime.

Mediante as informações que os cientistas têm acesso, estes poderão dar um parecer acerca do incidente. É neste nível que os cientistas analisam as evidências físicas que correlacionam com as circunstâncias do incidente. Em geral, estas proposições remetem-se às clássicas considerações dos fenómenos de transferência (facilidade de transferência de

uma molécula de DNA de uma fonte para um suporte) e persistência (o tempo que essa molécula de DNA persiste no suporte) (Butler, 2006).

Contudo, se os peritos não conseguirem ter informação suficiente para decidir pela proposição a) ou b), há a necessidade de passar a um nível mais baixo na hierarquia, o nível I.

Nível I – nível da fonte.

- a) O vidro recolhido da roupa do suspeito pertence à janela partida.
- b) O vidro recolhido da roupa do suspeito pertence a outra fonte.

A este nível, Evett *et al.* (2002) dizem que as questões da transferência e persistência devem ser deixadas para o tribunal.

Estes autores referem ainda que, para além do que foi considerado quando a hierarquia original foi definida (Cook *et al.*, 1998), deve ser tido em consideração proposições do género:

- a) A mancha de sangue é do suspeito.
- b) A mancha de sangue é de alguém, que não do suspeito.

Neste caso, fica à consideração do perito que a informação genética provém da mancha visível. Contudo, e dada a sensibilidade dos métodos de LCN, existem casos em que esta consideração pode ser dúbia. É o caso de vestígios lofoscópicos, em que, como se referiu anteriormente, pode haver deposição de DNA de outras fontes que não do autor do vestígio. Torna-se, nestes casos, necessário descer ainda mais um nível, designado por proposições de sub-nível I.

Sub-nível I

- a) O perfil de DNA é do suspeito.
- b) O perfil de DNA é de alguém, que não do suspeito.

Descendo a este nível de proposições significa que o perito não consegue ter a certeza de como é que o DNA chegou ao local de onde foi recuperado, ou mesmo se o DNA pertence ao vestígio que foi a razão de se ter efectuado a análise.

Esta questão não é tão problemática quando se analisam amostras discretas como, por exemplo, ossos. Isto porque, neste caso, a análise não é feita sem que antes se elimine a camada externa do osso para evitar contaminação com DNA externo (Burger *et al.*, 1999; Schmerer *et al.*, 1999). No caso de amostras não discretas, como manchas de sangue ou ID, este procedimento não pode ser feito. Devido à elevada sensibilidade do método LCN e, por isso, à sua capacidade de detectar DNA resultante de transferência transversal, a dificuldade de associação do perfil genético com o vestígio que se está a analisar aumenta, daí a necessidade de se considerar as proposições do sub-nível I.

Como regra geral, parece que, quanto mais alto for o nível das proposições que se consiga atingir, maior é o valor probatório. Efectivamente, a força da evidência do DNA LCN é mais reduzida que a de uma análise de DNA convencional, devido a incertezas relacionadas com a transferência do DNA para a superfície e, também, com o momento em que o DNA foi

transferido. Por conseguinte, a interpretação do caso só deve ser feita após verificação e análise de todas as evidências, e tendo em consideração os diversos cenários possíveis.

Assim, quando se analisam amostras LCN é necessário ter em consideração o seguinte: (1) apesar de se obter um perfil genético, não é possível identificar o tipo de células das quais se obteve o perfil, nem sequer dizer quando é que as células foram depositadas; (2) devido à sensibilidade do método, é normal encontrar misturas; contudo, estas podem não ser relevantes, porque a transferência de células pode ter ocorrido por contactos casuais; (3) a obtenção do perfil do suspeito não significa que o suspeito esteve na cena do crime; e (4) a ausência do perfil do suspeito não significa inocência.

Neste sentido, quando um perfil genético obtido a partir da amostra não corresponde ao do suspeito, pode ser devido a uma das seguintes razões: o suspeito é efectivamente inocente e o perfil encontrado é do criminoso; houve transferência de células antes do crime por um inocente (transferência secundária); ou houve transferência de células por investigadores depois do crime (contaminação). Por este motivo, é necessário minúcia na interpretação dos resultados de LCN, devendo-se comparar sempre os resultados de todas as análises efectuadas e relacioná-los com os da investigação criminal, antes de se apresentar uma conclusão definitiva.

É, também, de realçar, que todas as considerações que forem tomadas devem ser deixadas à consideração do tribunal; contudo, o perito tem o dever de informar acerca do que considera relevante para o esclarecimento da verdade.

1.5 Validação estatística da análise LCN

Devido a todos os artefactos que podem advir de um método tão sensível, a análise estatística dos resultados de LCN não é de todo fácil. A interpretação de perfis LCN STR tem sido feita recorrendo, geralmente, ao método do consenso (ver ponto 1.3.1.3 deste capítulo). Quando este método foi proposto por Gill *et al.* (2000), os autores introduziram também um método probabilístico, mas que por ser extremamente complexo não tem sido aplicado na prática. Este método, bem mais eficiente que o método do “consenso”, era baseado em estatística Bayesiana, em que se tinha em consideração a probabilidade de contaminação, de *allele dropout* e de formação de *stutters*. Este modelo foi mais tarde modificado, para permitir a análise de misturas e subestruturação de populações (Curran *et al.*, 2005).

Evetts *et al.* (2002) consideram que uma forma de análise estatística, que poderá ser fundamental na interpretação de amostras LCN, é o uso de Redes Bayesianas (ou *Bayesian Networks*). As Redes Bayesianas são modelos gráficos que permitem expressar as relações probabilísticas entre um conjunto de variáveis. Usando software adequado é possível criar estas relações, permitindo obter resultados, mesmo a partir de premissas extremamente complexas, como é o caso de perfis LCN.

Recentemente, e na sequência dos trabalhos de Gill *et al.* (2000) e de Curran *et al.*, (2005), foi desenvolvida uma ferramenta informática exclusivamente para análise de perfis LCN.

Este software, designado por *LoComatioN* foi desenvolvido por Gill *et al.*, (2007) no *Forensic Science Service*. Este sistema permite a aplicação de um método probabilístico sem a necessidade do cientista efectuar quaisquer cálculos manuais. Infelizmente, este sistema (ainda) não se encontra disponível para uso em laboratórios externos àquele serviço Britânico.

Desta forma, a validação estatística de perfis LCN é ainda muito complexa para a maioria dos laboratórios forenses, pelo que apenas se recorre ao método do “consenso”, como forma de garantir a fiabilidade dos resultados.

1.6 Análise genética vs análise lofoscópica

Perante as vantagens e dificuldades da análise genética de ID explanadas, resta saber qual a abordagem a optar em relação a uma ID (ou outro vestígio dermopapilar) encontrada no local do crime, se puramente lofoscópica ou se, pelo contrário, genética; tendo sempre presente que a recolha de células da ID pelos métodos actuais (zaragatoa húmida) implica a destruição de quaisquer desenhos dermopapilares que existam.

Cada caso deve ser visto individualmente e as decisões devem ser tomadas com base nas circunstâncias específicas. À lofoscopia apenas interessam vestígios em que é viável definir o relevo das cristas dermopapilares, pois são estes desenhos e os chamados pontos característicos, que individualizam a ID (Saferstein, 2004). Neste sentido, o factor mais adverso para os lofoscopistas são indivíduos que tenham a “friction skin” de tal maneira lisa, que as cristas dermopapilares não são visíveis, como pedreiros, pessoas que trabalham com lixas (ou instrumentos semelhantes), e outros (Cordeiro, 2006). Evidentemente que apesar destes indivíduos não deixarem desenhos dermopapilares de boa qualidade, ficarão sempre algumas células na zona de contacto. Acresce que vestígios provocados por deslizamento da pele, de nada servem aos lofoscopistas; mas, podem conter células, particularmente em superfícies rugosas. Assim, em situações deste género o investigador pode efectuar de imediato uma abordagem genética, pois a análise genética pode ser o único método eficaz na identificação individual da ID.

Neste contexto, é também interessante saber que o investigador, recorrendo às *Crime-lite™*, poderá ter uma ideia relativamente ao vestígio, no sentido de avaliar se proporcionará bons desenhos dermopapilares, sem aplicar métodos reveladores de ID (que, como foi visto no ponto 1.3.3, diminui o sucesso de uma análise genética) e, deste modo, decidir pela recolha das células.

De seguida, e numa perspectiva de maximizar as provas, o investigador deve ter em atenção e considerar o tipo de superfície que está a examinar, bem como a probabilidade de conseguir obter um bom vestígio lofoscópico *versus* um perfil genético do DNA vestigial. Superfícies muito rugosas, podem ser directamente limpas com uma zaragatoa para análise de DNA vestigial. Uma superfície mais lisa, como metal ou vidro, deve ser processada inicialmente com o objectivo da análise clássica de ID. No entanto, uma vez feita a análise

lofoscópica, a técnica genética deve ser então usada sem reservas. Nestes casos, deve-se prescindir inicialmente de colher as células, pois a probabilidade de se conseguirem bons desenhos dermopapilares é elevada e, não se pode esquecer que uma análise LCN, pelas suas características (sucesso por vezes baixo, interpretação complexa dos resultados, artefactos produzidos, etc.), poderá não proporcionar bons resultados.

No entanto, vários autores já provaram o potencial destes dois procedimentos conjugados, efectuando em primeira instância uma análise lofoscópica e recolhendo, posteriormente, células do vestígio na perspectiva de identificar o seu perfil genético (Zamir *et al.*, 2000). Parece, pois, que esta prática poderá ser uma mais valia, devendo ser recomendada na rotina.

2

Material e Métodos

2.1 Testes de sensibilidade

2.1.1 *Identifiler*[™]

A sensibilidade do kit AmpFISTR® *Identifiler*[™] foi testada amplificando 200, 100, 75, 50, 25 e 10 pg de DNA da linha celular 9947A (Applied Biosystems), com um número variável de ciclos de PCR: 28, 30, 32, 34 e 36.

A amplificação foi efectuada num termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems), com as seguintes condições:

- 11 minutos a 95°C
- 28, 30, 32, 34 ou 36 ciclos:
 - 94°C durante 1 minuto
 - 59°C durante 1 minuto
 - 72°C durante 1 minuto
- Incubação durante 60 minutos a 60°C

Para a reacção de amplificação, com volume final de 25 µl:

- 9,5 µl de Reaction Mix
- 5 µl de *Primer* Mix
- 0,5 µl de Taq Gold
- 1 µl de DNA
- 9µl de água milliQ estéril

2.1.2 Yfiler™

A sensibilidade do kit AmpFlSTR® Yfiler™ foi testada amplificando 100, 75, 50, 25 e 10 pg de DNA da linha celular 007 (Promega) e com um número variável de ciclos de PCR: 30, 32, 34, 36 e 38.

A amplificação foi efectuada num termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 Gold (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação:

- 11 minutos a 95°C
- 30, 32, 34, 36 ou 38 ciclos:
 - 94°C durante 1 minuto
 - 61°C durante 1 minuto
 - 72°C durante 1 minuto
- Incubação durante 80 minutos a 60°C

Para a reacção de amplificação, com volume final de 25 µl:

- 9,2 µl de Reaction Mix
- 5 µl de *Primer Mix*
- 0,8 µl de Taq Gold
- 1 µl de DNA
- 9µl de água milliQ estéril

2.1.3 MiniSTR

2.1.3.1 Heptaplex e Triplex

Foi desenvolvido um heptaplex de miniSTR (para análise em simultâneo de sete STR), cujos *loci* estão incluídos em alguns *kits* comerciais de STR, como o Identifiler™.

Pretendia-se um multiplex com fragmentos de amplificação inferiores a 200 pb e que permitisse analisar alguns *loci* incluídos no *kit* Identifiler™ que, neste *kit*, apresentam fragmentos de amplificação superiores a 200 pb. Fez-se a selecção de vários *primers* para a amplificação de miniSTR já descritos na bibliografia e, com base no tamanho dos fragmentos obtidos e do seu grau de polimorfismo, escolheram-se seis STR e o marcador sexual amelogenina. Este multiplex designou-se heptaplex ou hepta.

Os *primers* foram escolhidos de forma a poder-se analisar mais do que um polimorfismo, usando o mesmo fluorocromo, sem que ocorresse sobreposição de alelos entre os diferentes polimorfismos e que apresentassem diferenças significativas de tamanho; contudo, em alguns casos, apenas foi possível uma diferença relativamente pequena (Figura 13).

A compatibilidade entre os *primers* em multiplex, no sentido de testar a formação de *primers dimer* e *hairpins*, foi efectuada recorrendo ao software AutoDimer (Vallone & Butler, 2004).

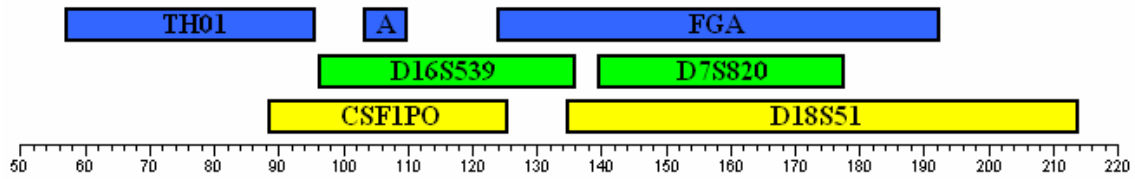


Figura 13. Esquema representativo da distribuição dos *loci* do heptaplex por tamanhos (pb) e cores (fluorocromo). A – Amelogenina.

Foi ainda desenvolvido outro multiplex de miniSTR, um triplex já descrito por Coble & Butler (2005), para os marcadores D10S1248, D14S1434 e D22S1045 (ao longo trabalho este multiplex é também designado por T01).

Os *primers* e os fluorocromos usados para os dois multiplex estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* usados para os miniSTR.

	<i>Locus</i>	<i>GenBank</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	<i>Referência</i>
Triplex T01	D10S1248	AL391869	for [6FAM]-TTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG rev GCAACTCTGGTTGTATTGTCTTCAT	Coble & Butler, 2005
	D14S1434	AL121612	for [PET]-TGTAATAACTCTACGACTGTCTGTCTG rev GAATAGGAGGTGGATGGATGG	Coble & Butler, 2005
	D22S1045	AL022314	for [NED]-ATTTTCCCCGATGATAGTAGTCT rev GCGAATGTATGATTGGCAATATTTT	Coble & Butler, 2005
Heptaplex	D7S820	AC004848	for [VIC]-GAACACTTGTCATAGTTTAGAACG rev TCATTGACAGAATTGCACCAC	Butler <i>et al.</i> , 2003
	D16S539	AC024591	for [VIC]-CTCTTCCCTAGATCAATACAGAC rev GCATGTATCTATCATCCATCTCTG	Pancorbo, 2006
	D18S51	X91254	for [NED]-TCTGAGTGACAAATTGAGACCTT rev CTTCTCTGGTGTGTGGAGATG	Pancorbo, 2006
	CSF1PO	X14720	for [NED]-ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG rev GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA	Butler <i>et al.</i> , 2003
	TH01	D00269	for [6FAM]-CCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC rev GGGAACACAGACTCCATGGTG	Grubwieser <i>et al.</i> , 2006
	FGA	M64982	for [6FAM]-GGCATATTTACAAGCTAGTTTCT rev ATTTGTCTGTAATTGCCAGC	Bender & Schneider, 2005
	Amelogenina	M55418	for [6FAM]-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG rev ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG	Grubwieser <i>et al.</i> , 2006

Foi feita a otimização dos multiplex para a temperatura de *annealing* e concentração de *primers*. A concentração dos *primers* foi otimizada empiricamente, tendo-se iniciado com uma concentração de 0,2 μ M. A concentração final usada encontra-se na Tabela 3. Para facilitar a pipetagem dos *primers* e também evitar contaminações, foi feita uma *primer mix* 10x concentrada, com todos os *primers* de cada multiplex. Em relação à temperatura de *annealing*, para o T01 foi utilizada a descrita por Coble & Butler (2005); ou seja, de 55°C. Contudo, para o heptaplex esta teve de ser otimizada, tendo sido usada para os dois multiplex a temperatura de 55°C.

A genotipagem do T01 foi feita por comparação com o genótipo do DNA padrão 9947A e 007, estabelecido em www.cstl.nist.gov/div831/strbase/miniSTR.htm. Posteriormente, foi

construído um *ladder* alélico que permitisse facilmente, e com mais rigor, determinar o perfil genético da amostra, por comparação.

Tabela 3. Concentração otimizada dos *primers* para os miniSTR.

	<i>Loci</i>	Concentração (µM)
Triplex	D10S1248	0,3
	D14S1434	0,3
	D22S1045	0,5
Heptaplex	D7S820	0,3
	D16S539	0,15
	D18S51	0,5
	CSF1PO	0,5
	TH01	0,2
	FGA	0,2
	Amelogenina	0,2

A genotipagem do heptaplex foi feita através da comparação com um *ladder* alélico construído para o efeito.

2.1.3.2 Amplificação por PCR

Depois de otimizados os multiplex, foi feito o teste de sensibilidade. Para este teste, foram amplificados 200, 100, 50, 25 e 10 pg de DNA da linha celular 9947A, com um número variável de ciclos de PCR: 30, 32, 34, 36 e 38.

As condições de amplificação usadas para os miniSTR foram iguais para os dois multiplex, variando apenas a *Primer Mix*. A amplificação foi realizada recorrendo ao Qiagen® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) da seguinte forma:

Volume final de 25 µl:

- 12,5 µl de Qiagen Buffer
- 2,5 µl de *Primer Mix* (10x concentrada)
- 2,5 µl de Q-Solution
- 1 µl de amostra
- 6,5 µl de água milliQ estéril

As amostras foram amplificadas num termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems), com as seguintes condições de amplificação:

- 95°C durante 15 minutos
- 30, 32, 34, 36 e 38 ciclos:
 - 94°C durante 1 minuto
 - 55°C durante 1:30 minutos
 - 72°C durante 1 minuto
- Incubação durante 45 minutos a 60°C

2.1.3.3 Construção de ladders alélicos

Ladder para o heptaplex

O *ladder* para o heptaplex foi preparado da seguinte forma:

- Diluir o *ladder* do Identifiler™ na proporção de 1:1000 com água milliQ estéril;
- Amplificar 2 µl da diluição, em reacções separadas por grupos de *loci* marcados com o mesmo fluorocromo, nas mesmas condições que no ponto 2.1.3.2 deste capítulo, mas usando 19 ciclos; e
- Analisar os produtos de amplificação.

Ladder para o triplex T01:

O *ladder* para o triplex foi preparado da seguinte forma:

- Depois de analisadas algumas amostras da população, escolher aquelas que, no seu conjunto, tenham os alelos representativos para cada sistema;
- Misturar 2 µl de cada amostra e amplificar 2 µl da mistura em singleplex (um *locus* analisado em cada reacção), da mesma forma que no ponto 2.1.3.2 deste capítulo, mas usando 19 ciclos; e
- Analisar os produtos de amplificação.

2.1.4 WGA

Foi usado o REPLI-g® Mini Kit (Qiagen) para fazer a amplificação total do genoma. Quantidades de 100, 75, 50, 25 e 10 pg foram amplificadas com este *kit* de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, 2005):

- Pipetar 5 µl de amostra de DNA para tubo de PCR;
- Adicionar 5 µl de tampão D1 ao tubo. Vortexar e centrifugar brevemente;
- Incubar à temperatura ambiente (15-25°C) durante 3 min;
- Adicionar 10 µl de tampão N1. Vortexar e centrifugar brevemente;
- Adicionar 30 µl de *master mix* (29 µl de REPLI-g Mini Reaction Buffer e 1 µl REPLI-g Mini DNA Polymerase);
- Incubar a 30°C durante 16 h, usando o termociclador GeneAmp PCR Systems 9700;
- Inactivar a REPLI-g Mini DNA Polymerase aquecendo a amostra a 65°C durante 3 min; e
- Guardar a amostra a 4°C.

Estas amostras foram depois amplificadas com Identifiler™, de acordo com o ponto 2.1.2 deste capítulo, mas usando 28 ciclos de PCR e 5 µl de amostra e de água milliQ estéril.

2.1.5 Detecção e análise dos fragmentos de amplificação

A detecção dos fragmentos de amplificação foi efectuada da mesma forma para os vários métodos de análise.

Juntou-se no mesmo tubo de reacção:

- 13,55 µl de Formamida HiDi (altamente desionizada)
- 0,45 µl de Size Standard 500 Liz
- 1 µl de produto amplificado

As amostras foram depois desnaturadas no termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems), aquecendo-as a 95°C durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram detectados e separados por electroforese capilar, no sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), com um tempo de injeção no capilar de 22 segundos e voltagem de 1 Kv; a separação dos fragmentos foi efectuada a 15 Kv. A análise foi feita a 60°C.

Os resultados foram analisados com o software GeneScan® Analysis v.3.7. Nas análises com Identifiler™ e Yfiler™, as designações alélicas foram determinadas automaticamente através do software Genotyper® v.3.7, por comparação com o *ladder* alélico dos respectivos *kits*. Nas análises com miniSTR, as determinações alélicas foram realizadas manualmente, através da comparação do tamanho (pb) dos fragmentos obtidos com o software GeneScan® Analysis v.3.7, com os *ladders* alélicos construídos.

2.2 Optimização do método de extracção

2.2.1 Amostra

Foi pedido a quatro indivíduos voluntários, funcionários do laboratório, que tocassem numa lâmina de vidro, previamente esterilizada por luz UV.

Cada indivíduo tocou em quatro lâminas diferentes e, em cada uma, com um dedo diferente, usando os dois indicadores e os dois médios.

Cada lâmina foi limpa com uma zaragatoa humedecida em água milliQ estéril, seguindo-se imediatamente a extracção do DNA. A ID de cada lâmina do mesmo indivíduo foi extraída utilizando um protocolo de extracção diferente, sendo que, para cada protocolo, foram extraídas 4 lâminas de indivíduos diferentes.

Para os controlos negativos, limpavam-se com zaragatoas, da mesma forma, lâminas sem ID, previamente esterilizadas, a partir das quais se procedeu à extracção. Foram feitos dois controlos negativos para cada método.

2.2.2 Extracção

2.2.2.1 Método de extracção simples (Schiffner et al., 2005)

- Cortar a ponta da zaragatoa para um tubo eppendorf;

- Adicionar 40 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e 360 µl de SDS (0,01%);
- Agitar e incubar em banho termostático com agitação a 56°C durante 2 horas;
- Vortexar e incubar durante 10 min a 100°C. Vortexar novamente;
- Pipetar 100 µl de água MilliQ estéril para o filtro Microcon YM-100;
- Com uma pipeta, recolher todo o tampão de lise da amostra para esse mesmo filtro. Centrifugar 25 min a 970 g;
- Depois de rejeitar o tampão de lise, adicionar 200 µl de água no filtro e centrifugar 25 min a 970 g;
- Rejeitar o tubo e colocar o filtro invertido num novo tubo previamente pesado. Adicionar 20 µl de água milliQ estéril morna e centrifugar 10 min a 970 g;
- Retirar o filtro, pesar novamente o tubo e armazenar a amostra.

2.2.2.2 Resina Chelex® - Microcon

- Cortar a ponta da zaragatoa para um tubo eppendorf;
- Adicionar 1 ml de água milliQ estéril e incubar à temperatura ambiente por 30 min;
- Vortexar e centrifugar 3 min a 13684 g;
- Eliminar 970 µl do sobrenadante;
- Adicionar 170 µl de resina Chelex® a 5% com uma ponta cortada;
- Incubar a 56°C durante 30 min em banho termostático com agitação;
- Vortexar, incubar a 100°C por 8 min e vortexar novamente;
- Pipetar 100 µl de água milliQ estéril para o filtro Microcon YM-100;
- Com uma pipeta, recolher todo o tampão de lise da amostra para esse mesmo filtro. Centrifugar 25 min a 970 g;
- Depois de rejeitar o tampão de lise, adicionar 200 µl de água no filtro e centrifugar 25 min a 970 g;
- Rejeitar o tubo e colocar o filtro invertido num novo tubo previamente pesado. Adicionar 20 µl de água morna e centrifugar 10 min a 970 g;
- Retirar o filtro, pesar novamente o tubo e armazenar a amostra.

2.2.2.3 Método QIAamp/QIAshredder (Sinclair & McKechnie, 2000)

- Cortar a ponta da zaragatoa para um tubo eppendorf;
- Adicionar 180µl de tampão ATL e 20 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e vortexar;
- Incubar em banho termostático com agitação a 56°C *overnight*;
- Transferir o tampão de lise e a ponta da zaragatoa para a coluna QIAshredder e centrifugar 5 min a 13 500 g;
- Adicionar 200 µl de tampão AL para o que se recuperou e vortexar;
- Incubar a 70°C durante 10 min e centrifugar para *spin down*;
- Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) e vortexar;

- Transferir para uma coluna QIAamp Spin Column e centrifugar a 6000 g durante 1 min;
- Lavar duas vezes o DNA com 500µl de tampão AW1 e AW2 seguido de centrifugação durante 1 min a 6000 g após cada lavagem;
- Colocar a coluna num novo tubo e eluir com 200 µl de tampão AE morno;
- Pipetar 100 µl de água milliQ estéril para o filtro Microcon YM-100;
- Recolher a amostra para esse mesmo filtro. Centrifugar 25 min a 970 g;
- Depois de rejeitar o tampão de lise, adicionar 200 µl de água no filtro e centrifugar 25 min a 970 g;
- Rejeitar o tubo e colocar o filtro invertido num novo tubo previamente pesado. Adicionar 20 µl de água morna e centrifugar 10 min a 970 g;
- Retirar o filtro, pesar novamente o tubo e armazenar a amostra.

2.2.2.4 Extracção orgânica (PC)

Preparação do tampão de extracção

- Pesar 0,1211 g de Tris e adicionar 60 ml de água milliQ estéril;
- Em agitação, ajustar o pH da solução para pH=8 usando ácido acético;
- Adicionar 0,3722 g de EDTA, 0,5844 g de NaCl e 2 g de SDS;
- Agitar bem e perfazer o volume para 100 ml com água milliQ estéril;
- Filtrar o tampão com bomba de vácuo.

Método de extracção

- Cortar a ponta da zaragatoa para um tubo eppendorf;
- Adicionar 470 µl de tampão de extracção, 20 µl de DTT (1 M) e 10 µl de Proteinase K (10 mg/ml);
- Agitar e incubar em banho termostático com agitação a 56°C durante 3 horas;
- Recuperar a solução de lise usando o método de “los dos viales”. Com uma agulha incandescente furar o tubo que tem a amostra na parte inferior e colocá-lo noutra tubo e furar também a tampa. Centrifugar 10 min a 7697 g;
- Descartar o tubo de cima e adicionar 200 µl de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) ao tubo que ficou com o tampão de lise;
- Vortexar e centrifugar 3 min a velocidade máxima;
- Pipetar 100 µl de água milliQ estéril para o filtro Microcon YM-100;
- Recolher 400 µl da fase superior da amostra para esse mesmo filtro. Centrifugar 25 min a 970 g;
- Depois de rejeitar o tampão de lise, adicionar 200 µl de água no filtro e centrifugar 25 min a 970 g;
- Rejeitar o tubo e colocar o filtro invertido num novo tubo previamente pesado. Adicionar 20 µl de água morna e centrifugar 10 min a 970 g;
- Retirar o filtro, pesar novamente o tubo e armazenar a amostra.

2.2.3 Amplificação e análise dos fragmentos

As amostras e os controlos negativos foram amplificados com o *kit* Identifiler™, de acordo com o descrito no ponto 2.1.1 deste capítulo, mas apenas usando 28 e 34 ciclos de PCR e 5 µl de amostra (e consequente redução do volume de água para 5 µl).

A análise dos fragmentos foi efectuada da mesma forma que no ponto 2.1.5 para o Identifiler™.

2.2.4 Quantificação

O DNA foi quantificado por PCR em tempo real, (AB Prism 7000 Sequence Detection System), usando o Quantifiler™ Human DNA Quantification *Kit* de acordo com os especificações do fabricante (Applied Biosystems, 2003). Foram usados 2 µl de amostra para a quantificação.

Depois da quantificação, foi calculada a quantidade de DNA total extraído, através da simples multiplicação da concentração obtida (pg/µl) pelo volume total de DNA extraído, calculado mediante a subtracção do peso do tubo.

2.2.5 Protocolo PC adaptado a amostras LCN

Como consequência do protocolo de extracção PC descrito no ponto 2.2.2.4 deste capítulo, e porque é usada uma análise de elevada sensibilidade, foram detectados artefactos importantes, que serão descritos posteriormente. Por este facto, houve a necessidade de adaptar este protocolo para o tipo de análise em questão (de elevada sensibilidade). Tendo sido efectuadas algumas alterações ao protocolo inicial, o definitivo foi realizado da seguinte forma:

Preparação do tampão de extracção:

- Pesar 0,1211 g de Tris e adicionar 60 ml de água milliQ estéril.
- Em agitação, ajustar o pH da solução para pH=8 usando Ácido Acético.
- Adicionar 0,3722 g de EDTA e 0,5844 g de NaCl.
- Agitar bem e perfazer o volume para 80 ml com água milliQ estéril.
- Autoclavar.
- Preparar uma solução de SDS com 2 g de SDS num volume final de 20 ml em água milliQ estéril
- Esterilizar a solução com luz UV durante 40 min.
- Adicionar a solução de SDS estéril ao resto do tampão autoclavado.
- Agitar e aliquotar.

Método de extracção:

- Com uma lâmina de bisturi estéril cortar a(s) ponta(s) da(s) zaragatoa(s) para um tubo eppendorf (1,5 ml).
- Adicionar 470 µl de tampão de extracção, 20 µl de DTT (1 M) e 10 µl de Proteinase K (10 mg/ml).
- Selar o tubo com parafilme (American National Can™), agitar e incubar em banho termostático com agitação a 56°C durante 3 horas.
- Lavar o tubo com água milliQ e recuperar a solução de lise usando a coluna de homogeneização QIAshredder, passando todo o conteúdo (incluindo pontas de zaragatoa) do tubo que se retirou do banho para a coluna QIAshredder. Centrifugar de seguida durante 5 min a velocidade máxima.
- Retirar a coluna e adicionar 200 µl de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1).
- Vortexar e centrifugar 3 min a velocidade máxima.
- Pipetar 100 µl de água milliQ estéril para o filtro Microcon YM-100.
- Recolher 400 µl da fase superior da amostra para esse mesmo filtro. Centrifugar 25 min a 970 g.
- Depois de rejeitar o tampão de lise, adicionar 200 µl de água no filtro e centrifugar 25 min a 970 g.
- Rejeitar o tubo e colocar o filtro invertido num novo tubo. Adicionar 20 µl de água morna e centrifugar 10 min a 970 g.
- Retirar o filtro e armazenar a amostra.

2.3 Análise genética de impressões digitais

2.3.1 Amostras

Foi pedido a um indivíduo do sexo masculino que, logo quando se levantasse de manhã, deixasse ID em lâminas de vidro de microscópio, que foram previamente esterilizadas com luz UV. As ID foram tiradas de modo a possibilitar a obtenção de amostras com intervalo de exposição de 4 dias, até um máximo de 56, em que cada amostra consistia em 3 ID. Foram feitos 4 grupos nestas condições. Assim, no total foram recolhidas 180 ID, organizadas em 4 grupos de 15 conjuntos de 3 ID. As ID foram deixadas em casa do voluntário, numa divisão só acedida pelo próprio para recolher as referidas ID. Ao indivíduo foi exigido que lavasse as mãos antes de se deitar. O contacto teve sempre a duração de 3 segundos.

Foi-lhe também colhida uma zaragatoa bucal, como amostra de referência.

2.3.2 Revelação das impressões digitais

Desses 4 grupos, 3 foram submetidos a processos lofoscópicos de revelação de ID e o outro grupo não sofreu qualquer processo de revelação (também designado ao longo deste trabalho por “sem”).

Um grupo foi revelado com cianoacrilato (Cyanoacrylate B-83000 BVDA), outro com pó magnético (Magna Power yetBlack cat. Nº 57, Folien-Vogel, Vogel & Hoeller) e, ainda um outro com pó branco à base de bismuto (Instant White B-40100 BVDA).

As revelações foram feitas de acordo com os procedimentos usados no Laboratório da Polícia Técnica da Directoria do Porto da Polícia Judiciária. De referir que a aplicação do cianoacrilato (também referido neste trabalho por “ciano”) foi feita em câmara própria, onde é libertado o vapor de cianoacrilato sem nenhuma manipulação das amostras; durante o processo de revelação, ocorre uma reacção de polimerização entre os componentes da ID (principalmente os aminoácidos, ácidos gordos e proteínas) e os ésteres de cianoacrilato, produzindo um depósito visível, mas incolor. O pó branco, à base de bismuto (referido neste trabalho por “pincel” ou “pinc”) é aplicado com um pincel, no qual se encontra o pó; sendo um dos reveladores mais usados em lofoscopia. O pó magnético (também referido neste trabalho por “mag”) é aplicado com um íman (*magna-brusch*) que capta o pó magnético e permite que este seja aplicado nas ID.



Figura 14. Modelo de caixa usada no transporte das ID.

As ID foram transportadas da casa do indivíduo para o Laboratório da Polícia Técnica da Directoria do Porto da Polícia Judiciária em pequenas caixas de cartão, construídas para o efeito (Figura 14). Cada caixa transportou um grupo de três ID com as mesmas características de exposição (tiradas no mesmo dia). Essas caixas foram previamente esterilizadas com luz UV.

2.3.3 Extracção do DNA

Em relação à amostra de referência, a extracção foi efectuada com Chelex® 100, segundo Walsh *et al.* (1991).

Todas as ID foram transportadas para o laboratório nas referidas caixas.

A extracção do DNA das ID foi feita no mesmo dia da revelação, tanto para as ID reveladas como para as não reveladas.

As lâminas onde se encontravam as ID foram limpas em conjuntos de 3 (referentes a ID com o mesmo número de dias de degradação e que sofreram o mesmo processo de revelação) com a mesma zaragatoa humedecida em água miliQ estéril e, de seguida, com uma segunda zaragatoa seca.

A extracção do DNA foi realizada usando o protocolo descrito no ponto 2.2.5 deste capítulo, mas usando 67 µl de água milliQ estéril para eluir o DNA.

O DNA extraído foi preservado a -80°C e descongelado à temperatura ambiente, antes de analisado.

2.3.4 Amplificação por PCR

2.3.4.1 Identifiler™

Amplificação de todas as amostras de ID (reveladas e não reveladas) com o *kit* Identifiler™, usando o mesmo protocolo que no ponto 2.1.1 deste capítulo, mas com 5 µl de amostra e também 5 µl de água milliQ estéril.

A amplificação foi efectuada com 28 (Ident28) e 34 ciclos (Ident34), sendo que com 34 ciclos foram feitas duas amplificações de cada amostra (duas réplicas), excepto as amostras não reveladas em que se fizeram três réplicas. A amostra de referência foi amplificada da mesma forma, com 28 ciclos.

2.3.4.2 Yfiler™

Amplificação de todas as amostras (reveladas e não reveladas) com o *Kit* Yfiler™, usando o mesmo protocolo que no ponto 2.1.2 deste capítulo, mas com 5 µl de amostra e também 5 µl de água milliQ estéril.

A amplificação foi efectuada com 30 (Yfiler30) e 36 ciclos (Yfiler36), sendo que com 36 ciclos foram feitas duas amplificações de cada amostra (duas réplicas). A amostra de referência foi amplificada da mesma forma, com 30 ciclos.

2.3.4.3 MiniSTR

Amplificação de todas as amostras (reveladas e não reveladas) com os multiplex T01 e heptaplex a 32 (miniSTR32) e 36 ciclos (miniSTR36), com o mesmo protocolo usado no ponto 2.1.3.2 deste capítulo, mas com 5 µl de amostra e, também, 5 µl de água milliQ estéril. Cada amostra foi amplificada apenas uma vez com os números de ciclos atrás assinalados. A amostra de referência foi amplificada da mesma forma, com 32 ciclos.

2.3.4.4 Nested-PCR

Os produtos de amplificação das 15 amostras de ID não reveladas e amplificadas com Ident28 foram diluídas de 1:1000 em água milliQ estéril.

Dessa diluição, 2 µl foram re-amplificados com o heptaplex, a fim de se proceder ao *nested*-PCR.

A *mix* de reacção foi preparada da seguinte forma (para um volume final de 12,5 µl):

- 6,25 µl de Qiagen Buffer
- 1,25 µl de *Primer Mix* (10x)
- 1,25 µl de Q-Solution
- 2 µl de amostra
- 1,75 µl de água milliQ estéril

A amplificação do heptaplex foi efectuada da mesma forma que no ponto 2.1.3.2 deste capítulo, mas usando 24 ciclos.

2.3.4.5 Amplificação total do genoma

As 15 amostras de ID não reveladas foram analisadas com este método, de acordo com especificado no ponto 2.1.4 deste capítulo.

2.3.5 Detecção e análise dos fragmentos de amplificação

A análise dos fragmentos de amplificação de todas as amplificações foi efectuada de acordo com o descrito no ponto 2.1.5 deste capítulo.

2.3.6 Quantificação

As amostras foram todas quantificadas da mesma forma que no ponto 2.2.4 deste capítulo.

2.3.7 Controlo de qualidade

Para garantir a fiabilidade dos resultados, todas as operações foram feitas nas melhores condições de esterilidade possíveis. As extracções foram efectuadas em câmaras previamente esterilizadas com luz UV e, todo o material usado foi previamente autoclavado e/ou irradiado com luz UV, incluindo luvas, máscaras, suportes para amostras, entre outros. Procedeu-se às extracções quando apenas o autor do trabalho se encontrava no laboratório, de forma a impedir contaminação das amostras LCN por DNA de outros operadores e/ou por amostras manipuladas por estes.

As amostras foram extraídas em pequenos grupos (de 6-7), de forma a diminuir a contaminação cruzada. Sempre que se passava de um grupo para outro, as câmaras de trabalho eram esterilizadas com luz UV.

As amplificações por PCR foram efectuadas em câmaras UV, com ambiente estéril, e todo o material usado, além de ter a garantia de estéril por parte do fornecedor, foi irradiado com luz UV antes de usado.

Foram incluídos 4 controlos negativos de extracção e, sempre que se fazia uma amplificação por PCR, eram também feitos 4 controlos negativos de amplificação.

As amostras de referência foram analisadas em dias completamente diferentes da análise das ID.

2.3.8 Análise dos resultados

O *peak threshold* foi definido nos 50 rfu. No entanto, apenas se considerou um alelo quando apresentava uma altura (rfu) superior a 5% da altura do alelo mais alto do *locus*. Alelos contaminantes foram considerados como tal, quando a sua altura era superior a 5% da altura do alelo mais alto do *locus*, e quando não correspondem ao genótipo do indivíduo dador das ID, determinado pela análise da amostra de referência. No caso de produtos *stutter*, foram contabilizados mesmo quando inferiores a 5%, relativamente à altura do alelo mais alto, mas desde que acima de 50 rfu.

A análise dos genótipos foi feita através de percentagens; isto é, calculando a percentagem de perfil detectado, tendo em consideração a percentagem de alelos detectados em relação ao total de alelos do perfil genético do indivíduo. Por exemplo, um perfil que tenha, relativamente ao Identifiler™, 30 alelos; se numa análise apenas forem detectados 18 alelos, considera-se que se obteve 60% do perfil, ou seja, obteve-se um sucesso de 60%. A conversão em percentagem permite a comparação entre métodos e entre amostras.

Na determinação da percentagem de perfil obtido (sucesso da análise) não se teve em consideração a detecção de alelos contaminantes; estes foram contabilizados de uma forma independente.

O equilíbrio heterozigótico (Hb) foi calculado pela fórmula $Hb = A_1/A_2$, em que A_1 é a altura do alelo mais baixo e A_2 é altura do alelo mais alto. Sendo assim, um $Hb=0$ significa que ocorreu *allele dropout*, e $Hb=1$ significa que os dois alelos estão perfeitamente equilibrados. Considerou-se que ocorreu desequilíbrio heterozigótico quando $Hb < 0,8$.

Os produtos *stutter* foram classificados como tal quando foram detectados alelos não pertencentes ao perfil do indivíduo e com uma unidade de repetição inferior ao alelo correspondente (pertencente ao perfil). Em presença desta situação, mas em que a altura do *stutter* era superior à do alelo correspondente, foram considerados como alelos contaminantes; isto porque, parece pouco provável ocorrerem *stutters* maiores que o alelo correspondente, apesar de ser um fenómeno teoricamente possível.

Com os kits Identifiler™ e Yfiler™, para algumas análises, fez-se a separação entre *loci* com fragmentos de amplificação menores e maiores de 200 pb. No caso do Identifiler™ consideraram-se como menores de 200 pb os *loci*: D8S1179, D3S1358, TH01, D19S433, vWA, Amelogenina e D5S818; e como maiores de 200 pb os *loci*: D21S11, D7S820 CSF1PO, D13S317, D16S539, D2S1338, TPOX, D18S51 e FGA. Para o Yfiler™, consideraram-se como menores de 200 pb os *loci*: DYS456, DYS3891, DYS458, DYS393, DYS391, Y GATA H4 e DYS437; e como maiores de 200 pb os *loci*: DYS390, DYS389II, DYS19, DYS385a/b, DYS439, DYS635, DYS392, DYS438 e DYS448.

Para comparar graficamente grupos de amostras, recorreu-se a gráficos caixas-com-bigodes. Estes gráficos são apropriados para evidenciar as principais características matemáticas de um determinado conjunto de dados e facilitam a comparação de múltiplos conjuntos.

Um gráfico caixa-com-bigodes compreende uma caixa, bigodes e *outliers*. A mediana dos resultados encontra-se dentro da caixa e é representada por um pequeno quadrado. A parte inferior da caixa é o primeiro quartil (Q_1), que corresponde ao quartil de 25% da amostra. A parte superior da caixa é o terceiro quartil (Q_3), que corresponde ao quartil de 75% da amostra. Desta forma, metade dos dados encontram-se entre estes dois quartis. Assim, 25% dos dados são menores ou iguais ao Q_1 e 75% dos dados são menores ou iguais a Q_3 . Os bigodes são linhas que se estendem para cima e para baixo da caixa até ao valor máximo, dentro do limite superior e inferior, respectivamente. O limite inferior é definido por $Q_1 - 1.5(Q_3 - Q_1)$ e o limite superior definido por $Q_3 + 1.5(Q_3 - Q_1)$. Os *outliers* são valores que estão fora destes limites, sendo representados por pequenos círculos. Pode-se ainda estabelecer limites mais extremos definidos por $Q_1 - 3(Q_3 - Q_1)$ e por $Q_3 + 3(Q_3 - Q_1)$, que separam *outliers* de *outliers* extremos ou severos. Estes são representados por asteriscos.

As caixa-com-bigodes foram construídas recorrendo ao software Statística 7 e outro tipo de gráficos foram realizados também neste software ou no Microsoft Office Excel 2003.

Para efectuar a análise estatística dos resultados, a população amostral foi tratada no geral, e salvo qualquer indicação, como sendo amostras dependentes, pois as várias ID foram obtidas do mesmo indivíduo. Neste sentido, testes como ANOVA não puderam ser aplicados, pois implicam que as populações sejam independentes.

Antes de efectuar algum teste verificou-se a normalidade da amostra, recorrendo ao teste de Kolmogorov-Smirnov, teste usado para determinar, com uma certa margem de erro, se uma amostra é proveniente de uma população com distribuição normal. Isto permite decidir se se aplicam testes paramétricos ou não paramétricos, sendo que para amostras com distribuição não normal, apenas se podem usar testes não paramétricos e vice-versa. Para amostras não Gaussianas, usar a mediana para comparar as amostras proporciona resultados mais robustos que a média. De referir que, para amostras pequenas ($n < 30$), houve maior tendência para usar testes não paramétricos; isto porque, para estas amostras, o teste de Kolmogorov-Smirnov apresenta limitações na determinação da sua normalidade.

Assim, para amostras não Gaussianas, quando se pretendeu comparar dois grupos, usou-se o teste de Wilcoxon e o teste dos Sinais. Ambos os testes permitem realizar testes sobre quartis, sendo que o de Wilcoxon incide sobre a mediana e o dos Sinais, de um modo geral, sobre um qualquer quartil. Estes testes alinham as amostras por pares e calculam a diferença entre os valores de uma amostra e da outra, determinando o número de valores negativos e positivos identificados na diferença de todos os pares. Tendo como base o exposto, é possível comparar as duas populações e determinar se existem diferenças significativas. Para além disso, o teste de Wilcoxon ainda tem em consideração a amplitude das diferenças. Os dois testes são normalmente usados em conjunto e um reforça os resultados do outro. Para mais de 2 grupos usou-se o teste de Friedman. Este teste funciona da mesma forma que os anteriores, mas permite testar várias populações em simultâneo. Geralmente, se com este teste se obtiverem diferenças significativas entre as populações, aplica-se depois o teste de Wilcoxon para fazer comparações múltiplas, com o objectivo de determinar de que modo é que as populações diferem.

Para amostras normais (em que não se rejeita a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov) usa-se o teste-*t* para amostras emparelhadas (*paired samples test*). Este teste compara as médias das amostras, pois em amostras com distribuição normal, analisar o valor médio é equivalente a analisar a mediana. Para além disso, permite que as amostras sejam emparelhadas, procurando assegurar que os elementos de cada uma sejam, tanto quanto possível, semelhantes em todos os aspectos, menos em relação ao factor cujo efeito se pretende medir.

Os testes estatísticos foram todos efectuados no software SPSS 13.0 para Windows.

2.3.9 Microscopia

Foi tirada uma ID de um indivíduo voluntário numa lâmina de vidro previamente limpa com álcool. A lâmina foi depois tratada com azul de triptano (concentração de 0,4% em PBS, Merck) durante 30 segundos e depois lavada com PBS (GIBCO). Este composto químico penetra nas células inviáveis, tornando-as azuis; as células viáveis não coram e permanecem transparentes. A ID foi depois observada num microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK40), tendo sido obtidas fotografias das células (Olympus PM-20).

3

Resultados

3.1 Testes de sensibilidade

3.1.1 Identifiler™

A amplificação de quantidades exiguas de DNA 9947A mostrou que, para todos os números de ciclos testados, ocorre *allele* e *locus dropout* para as quantidades mais baixas de DNA. Estes são mais acentuados abaixo dos 50 pg. Contudo, para estas quantidades, consegue-se detectar um maior número de alelos aumentando o número de ciclos.

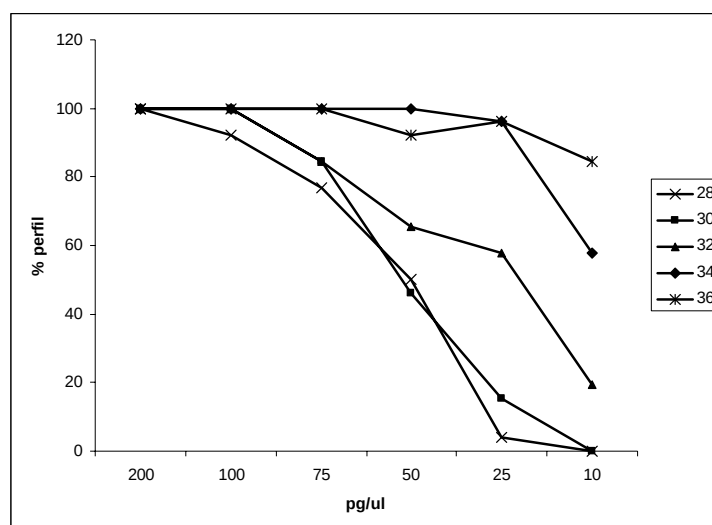


Figura 15. Gráfico do teste de sensibilidade para o Identifiler™.

Com 28 ciclos (Ident28) obtém-se um perfil que se pode considerar fiável apenas com 200 pg de DNA (Figura 15). Com 100 pg continua-se a detectar a maioria dos alelos, mas estes já apresentam uma altura (rfu) bastante baixa, podendo haver dúvidas na consideração de alguns deles. Esta dificuldade aumenta com a diminuição da quantidade de DNA, podendo afirmar-se que, com 50 pg de DNA, apenas se detectam 50% dos alelos (Figura 15).

A aplicação de 34 ciclos (Ident34), permite a detecção de quase 100% de alelos em todas as diluições até 25 pg, sendo que a 10 pg ocorre uma diminuição súbita do sucesso, mas continuando a detectar-se, mesmo assim, 60 % dos alelos da amostra (Figura 15).

Com um número intermédio de ciclos (30 e 32), a percentagem de alelos detectados é correspondente à sensibilidade. Observa-se que com um número mais elevado de ciclos, e para as quantidades mais baixas testadas, detecta-se esporadicamente *allele dropout* e também desequilíbrio heterozigótico. Nas duas réplicas efectuadas, não foram identificados alelos contaminantes nem o aumento significativo do tamanho de produtos *stutter*.

3.1.2 Yfiler™

Usando o DNA padrão 007 (Promega), linha celular masculina, amplificaram-se com o *kit* Yfiler™ várias diluições até 10 pg, o equivalente a aproximadamente 2 células diplóides. Os resultados que se observaram para este *kit* são semelhantes aos já descritos para o Identifiler™, e encontram-se representados na Figura 16.

Deste modo, usando 30 ciclos (Yfiler30), o recomendado pelo manual para condições normais, observa-se um perfil completo com 100 pg de DNA, sendo que com 75 pg ocorre o desaparecimento de alguns alelos. Com 50 pg, poucos alelos são detectados, e menos ainda com 25 pg. Com 10 pg não foi detectado nenhum alelo (Figura 16).

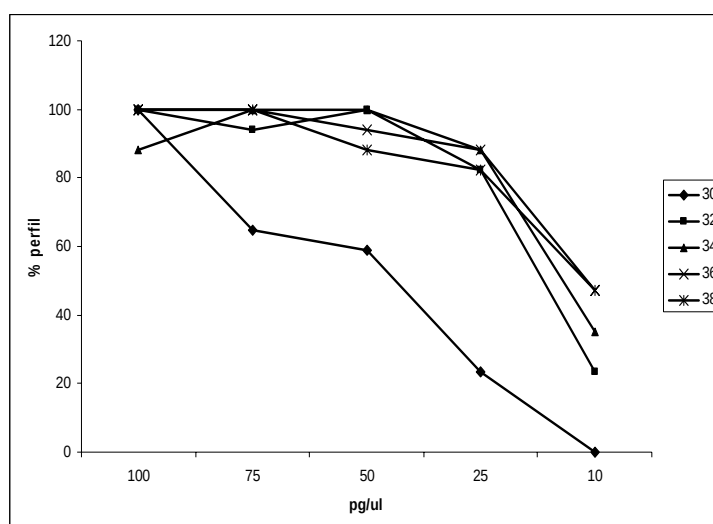


Figura 16. Gráfico do teste de sensibilidade para o Yfiler™.

Pelo contrário, aumentando o número de ciclos da PCR para 36 (Yfiler36) consegue-se detectar um número muito superior de alelos nas diluições que falharam para 30 ciclos. Não obstante, com 25 pg e 10 pg de DNA, alguns sistemas não amplificam, mesmo com este número elevado de ciclos (Figura 16).

Usando um número de ciclos intermédio (32 e 34 ciclos), observam-se variações ligeiras entre cada número de ciclos, também com valores ligeiramente abaixo de 36 ciclos. Aumentando para 38 o número de ciclos, parece não ocorrer aumento do sucesso, salientando-se apenas o aumento da altura dos picos detectados (Figura 16).

3.1.3 MiniSTR

A análise de possíveis interacções entre os diferentes *primers* do heptaplex com o software Autodimer revelou que não existem quaisquer interacções. Uma análise empírica da amplificação de várias amostras confirmou estes resultados.

Tabela 4. Comparação do tamanho (pb) dos alelos analisados com Identifiler™ e heptaplex.

<i>Locus</i>	<i>Alelos</i>	Identifiler™ (pb)	Heptaplex (pb)	Redução (pb)
D7S820	6-15	257-293	140-176	117
D16S539	5-15	252-292	96-136	156
D18S51	7-27	262-345	135-215	127
CSF1PO	6-15	304-341	89-125	215
TH01	4-13.3	163-202	58-97	105
FGA	17-33.2	214-281	124-192	90
Amelogenina	X,Y	107-112	104, 110	3

Através da análise do *ladder* construído para o heptaplex foi possível constatar que os fragmentos de amplificação são significativamente mais reduzidos que os obtidos usando o *kit* Identifiler™. O CSF1PO foi o *locus* em que se conseguiu a maior redução (215 pb), seguindo-se o D16S539 (156 pb) (Tabela 4). O FGA foi o *locus* em que se conseguiu uma menor redução (Tabela 4). A amelogenina ficou com tamanho similar ao Identifiler™, pois já neste *kit* tem um tamanho bastante reduzido (Tabela 4). No caso do D18S51, apesar de se ter conseguido reduzir em 127 pb, os *primers* usados levam a que os alelos de maior tamanho deste *locus* ultrapassem os 200 pb (Tabela 4).

A análise de algumas amostras, incluindo DNA padrão 9947A e 007, permite observar a existência de concordância entre o genótipo obtido com o *kit* Identifiler™ e o obtido com estes *primers*. Para além disso, possibilita verificar que amostras ditas normais são facilmente analisadas com este multiplex, observando-se equilíbrio entre os diferentes *loci*, havendo apenas, por vezes, alguns problemas de *pull-ups*, particularmente entre os fluorocromos 6FAM e VIC (Figura 17). Este problema será facilmente resolvido alterando a marcação do D16S539 e D7S820 para, por exemplo, o fluorocromo PET, evitando assim interferências de matriz entre o 6FAM e o VIC.

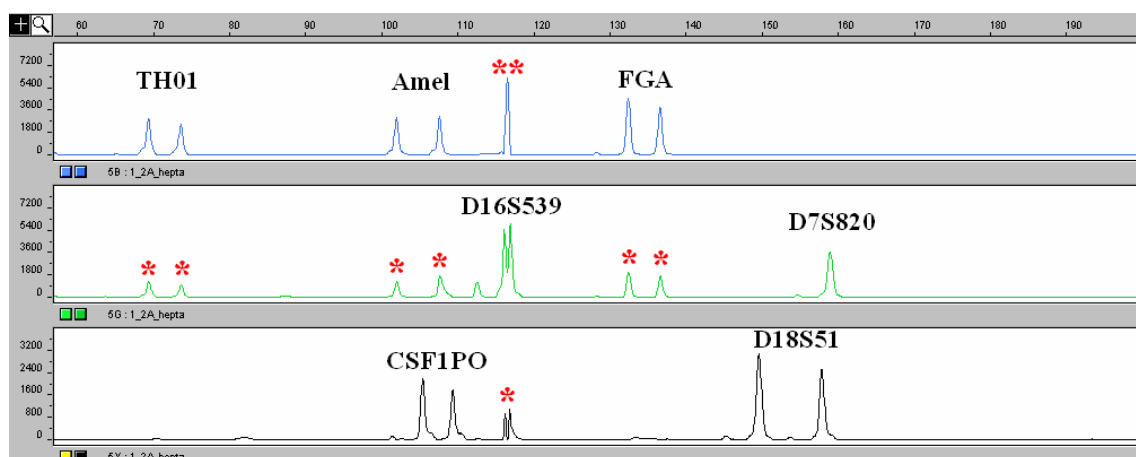


Figura 17. Exemplo de uma amostra de saliva analisada com o heptaplex. *Pull-ups* (*); Interferência de matriz (**).

Na Figura 18 está representado o *ladder* construído para o heptaplex. Em geral, os alelos dos vários sistemas marcados com o mesmo fluorocromo estão bem separados. Apenas os sistemas D16S539 e D7S820, e o CSF1PO e D18S51, estão relativamente perto uns dos outros, sem grandes espaços entre os alelos terminais, mas sem ocorrer sobreposição de alelos.

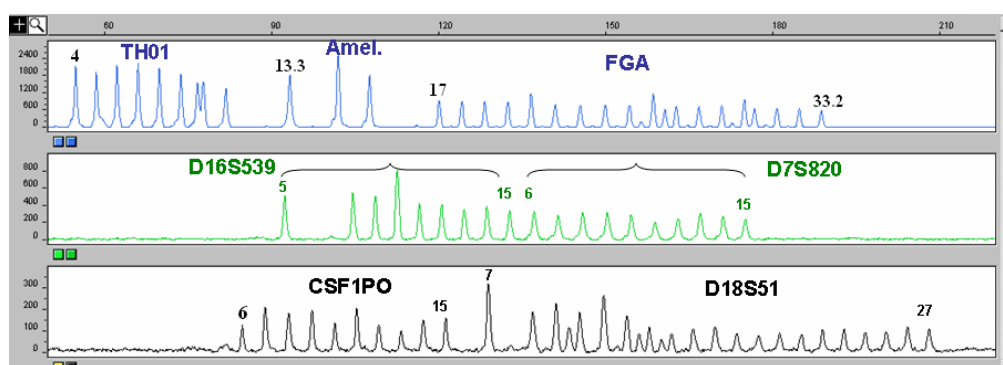


Figura 18. *Ladder* alélico construído para o heptaplex.

No caso do triplex T01, estes *primers* também permitem obter produtos de amplificação bastante pequenos, como se pode verificar através do *ladder* (figura 19). A análise de várias amostras, num estudo populacional efectuado, permite concluir que este triplex pode ser aplicado com fiabilidade a amostras forenses (Figura 20).

Em relação aos testes de sensibilidade, para os dois multiplex, 32 parece ser o número ideal de ciclos para se obter uma sensibilidade idêntica à do *kit* Identifiler™ para condições normais (Ident28). Tal como no caso do Identifiler™ e Yfiler™, aumentando o número de ciclos, incrementa-se a sensibilidade na detecção de alelos. Usando 36 ciclos, tanto no triplex como no heptaplex, consegue-se uma sensibilidade semelhante à do Ident34, que é suficiente para se detectar alelos com apenas 10 pg de DNA (Figura 21 e Figura 22).

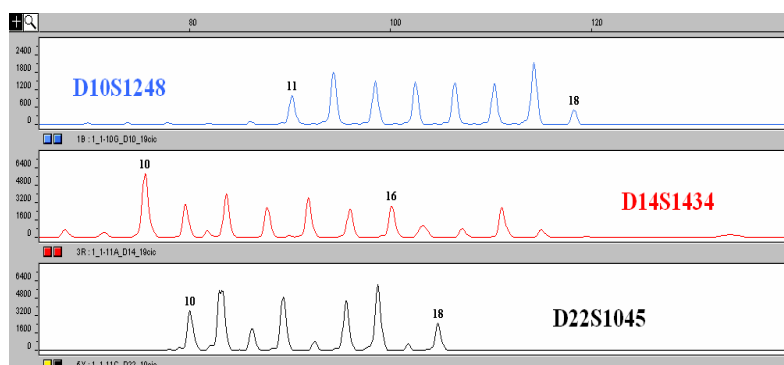


Figura 19. Ladder alélico construído para o triplex.

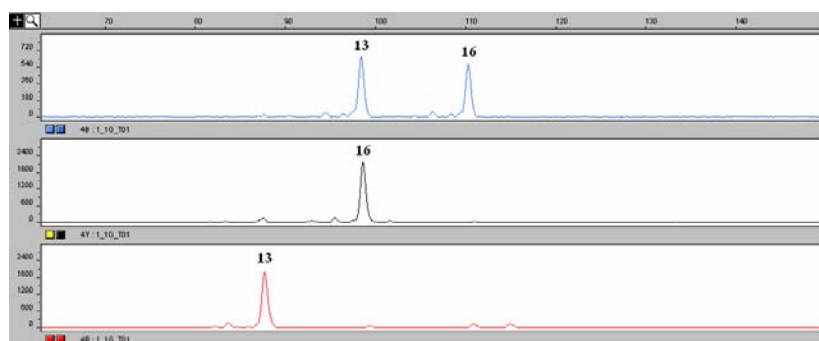


Figura 20. Exemplo de uma amostra de saliva analisada com o triplex a 32 ciclos.

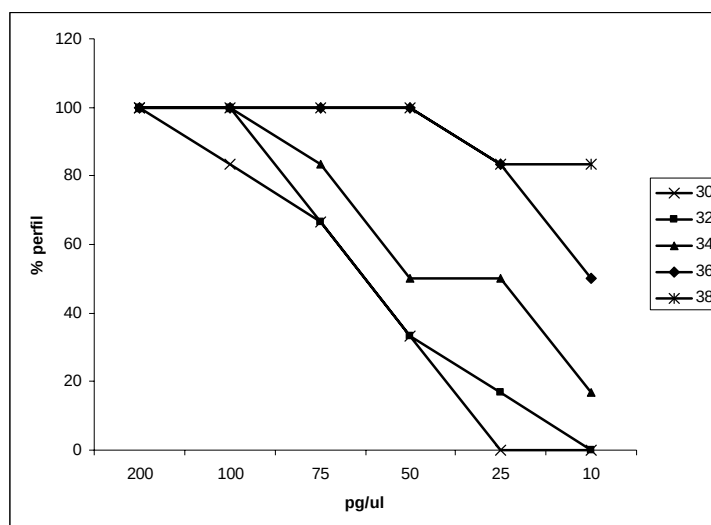


Figura 21. Gráfico do teste de sensibilidade para o triplex.

No entanto, o triplex é menos sensível que o heptaplex. Na Figura 21 e Figura 22 pode-se verificar que o heptaplex detecta, em geral, mais alelos que o triplex. Além disso, a altura dos picos é também sempre mais baixa no triplex. Contudo, alguns sistemas do heptaplex, particularmente os marcados com o fluorocromo NED, não amplificam com tanta eficácia como os outros sistemas. Amplificando com 36 ciclos consegue-se garantir que estes amplificam convenientemente.

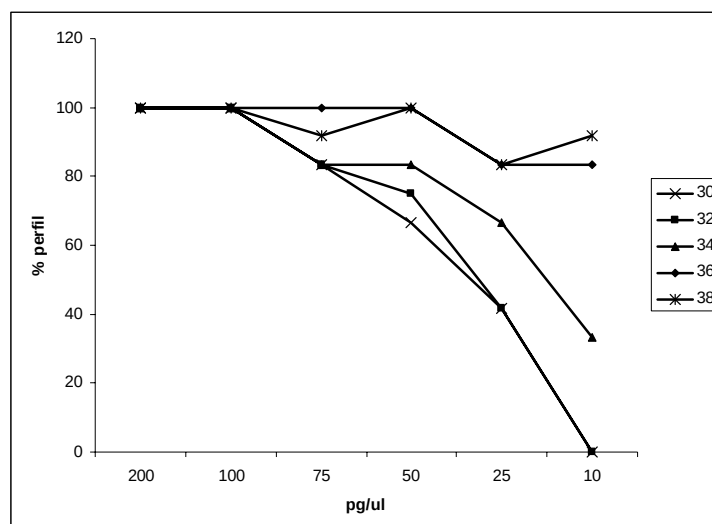


Figura 22. Gráfico do teste de sensibilidade para o heptaplex.

3.1.4 WGA

A amplificação total do genoma (WGA) foi também testada para quantidades extremamente baixas de DNA. Comparando os resultados obtidos, com os de Ident28 e Ident34, verifica-se que o WGA permite a detecção de alelos que o Ident28 já não detecta. Com WGA, mesmo com 10 pg, consegue-se detectar aproximadamente 70% dos alelos da amostra, enquanto que com Ident28 já não é detectável qualquer alelo (Figura 23). No entanto, comparando com os resultados obtidos com Ident34, denota-se que este último apresenta um maior sucesso até 25 pg, sendo que com 10 pg os resultados são ligeiramente mais baixos com Ident34 (Figura 23).

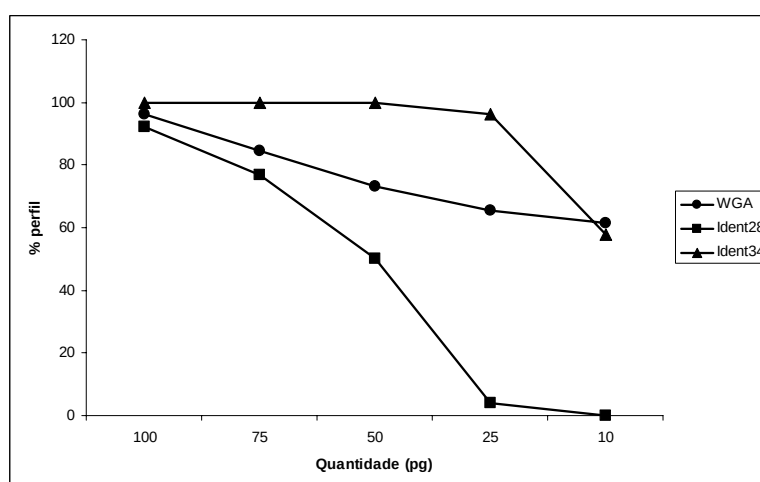


Figura 23. Gráfico da percentagem de alelos do 9947A detectados com WGA, Ident28 e Ident34.

É de notar que, usando WGA parece ocorrer, na generalidade, maior desequilíbrio dos alelos heterozigóticos que com Ident34, mesmo para 100 pg de DNA. Adicionalmente, os picos são

mais altos com WGA (mesmo com 10 pg alguns dos picos atingem alturas de 5000 rfu) do que com Ident34, aparecendo muitas vezes dobrados (forma +A e -A).

3.2 Método de extracção

Em termos de quantidade de DNA extraído, em média, os métodos que proporcionam maior quantidade de DNA extraído são o PC e o QIAamp/QIAshredder (Figura 24).

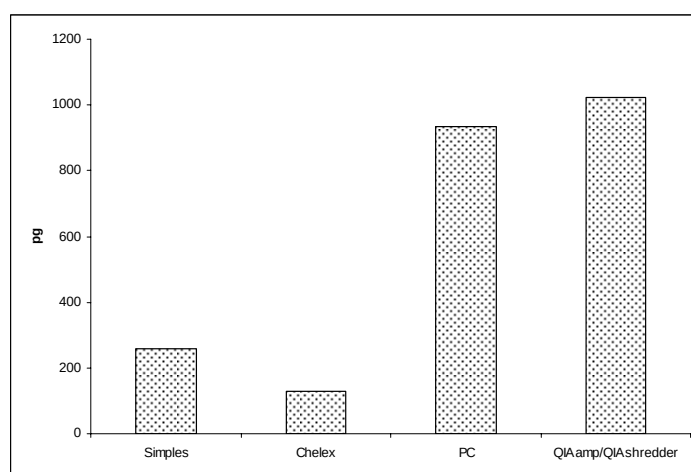


Figura 24. Gráfico da quantidade total média (pg) de DNA extraído por cada método.

A amplificação com Ident34, permitiu detectar um maior número de alelos do perfil do indivíduo, quando se extraiu o DNA com o método PC e QIAamp/QIAshredder, do que com os outros dois métodos. No entanto, também foi detectado um elevado número de alelos contaminantes, particularmente nos *loci* com fragmentos de amplificação mais pequenos (pb). O método simples (Schiffner *et al.*, 2005), neste aspecto é preferível, pois o número de contaminantes foi consideravelmente mais baixo. Com Chelex® também se detectou bastantes alelos contaminantes.

A amplificação dos controlos negativos de extracção do método PC e QIAamp/QIAshredder, com Ident34, permitiu confirmar a elevada quantidade de alelos contaminantes que se detecta com uma amplificação sensível (Figura 25), contrastando com a ausência de alelos contaminantes detectados, quando se amplificou com Ident28.

De acordo com estes resultados e, também, com as características dos diferentes métodos de extracção discutidas no capítulo Discussão dos Resultados, considerou-se o método PC como método de eleição para a concretização deste trabalho. Contudo, este método não pode ser usado desta forma, pois como se verificou, o nível de contaminação é preocupante.

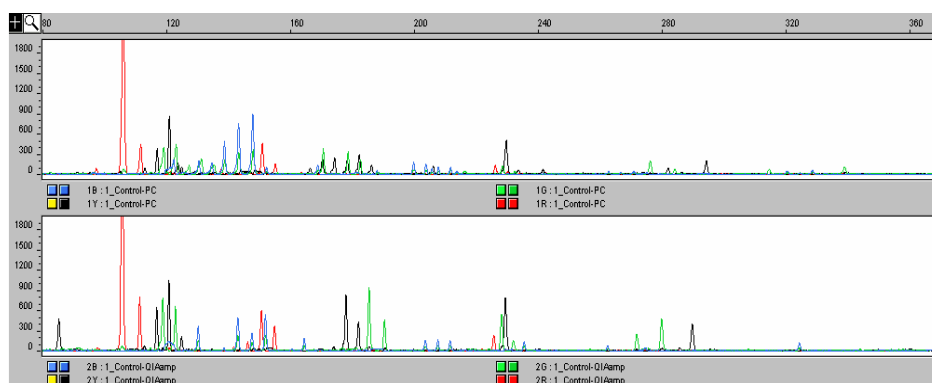


Figura 25. Electroforetograma da amplificação de controlos negativos com Ident34. Extracção com PC (painel de cima) e QIAamp/QIAshredder (painel de baixo).

Fazendo alguns estudos para indagar a proveniência da contaminação, percebeu-se que o tampão de extracção e o método de remoção da zaragatoa (método de “los dos viales”) eram os principais responsáveis pelo elevado nível de contaminação. Estes dois passos foram, por isso, alterados no protocolo, ficando definitivo de acordo com o descrito no ponto 2.2.5 do capítulo Material e Métodos.

Outro ponto importante, relativo à diminuição do nível de contaminação, é o comportamento no laboratório. Com a experiência foi-se percebendo que o simples facto de outros operadores se encontrarem no laboratório ao mesmo tempo em que se procedia à extracção, provocava uma elevada contaminação dos controlos negativos. Por outro lado, também o facto de existirem amostras de rotina nas bancadas, próximas do local onde se efectua a extracção LCN, também introduzia alelos contaminantes (contaminação ambiental). A contaminação foi, de facto, o principal problema que se teve de ultrapassar, aquando da optimização da técnica LCN. Foi, por isso, necessário adoptar medidas extremas para possibilitar a obtenção de resultados fiáveis.

Tabela 5. Compilação de alelos contaminantes detectados em 13 controlos negativos de extracção com PC (análise com Ident34).

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	30.2
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda – 1- D8S1179; 2- D3S1358; 3- TH01; 4- D19S433; 5- vWA; 6- Amelogenina; 7- D5S818; 8- D21S11; 9- D7S820; 10- CSF1PO; 11- D13S317; 12- D16S539; 13- D2S1338; 14- TPOX; 15- D18S51; 16- FGA

Tendo todos os pontos citados em consideração, a Tabela 5 mostra que os resultados são absolutamente diferentes dos iniciais. Em treze controlos negativos de extracção, apenas se detectaram 3 alelos contaminantes. É de destacar que estes alelos têm alturas inferiores a 100 rfu.

3.3 Análise de impressões digitais

A coloração de células de ID com azul de triptano, originou células coradas de azul e células transparentes que não incorporaram o corante (Figura 26), sendo que a maior parte das células observadas apresentavam coloração azul.

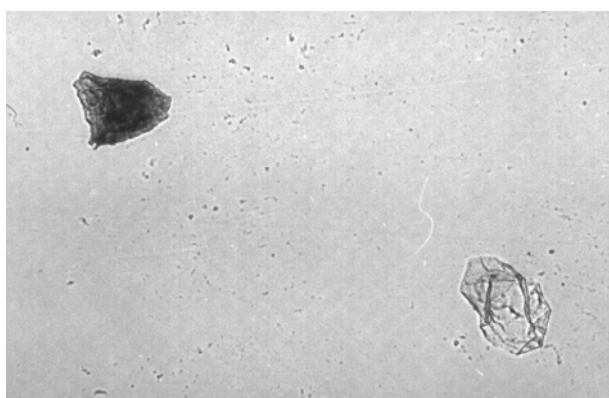


Figura 26. Fotografia de células da ID. Ampliação de 400x.

Tabela 6. Concentração de DNA (pg/μl) obtida para cada amostra.

Dia	Sem revelador	Pó magnético	Cianoacrilato	Pincel
0	763	72	19	7
4	175	34	27	5
8	117	25	44	21
12	99	26	21	12
16	268	59	20	55
20	667	22	47	46
24	55	21	49	16
28	47	22	45	25
32	94	26	50	0
36	51	13	59	12
40	42	27	28	15
44	52	19	50	17
48	171	33	26	64
52	68	25	117	38
56	28	87	102	12
Mediana	94,7	26,1	45,2	16,4

Os resultados da quantificação das amostras encontram-se representados na Tabela 6. O valor destes resultados é discutido no próximo capítulo. Considerando estas quantidades

como absolutas, verifica-se que se conseguiu recuperar maior quantidade de DNA das ID não reveladas que das reveladas. Nas amostras reveladas com pincel, recuperaram-se as menores quantidades de DNA, uma mediana de 16,4 pg/μl, enquanto nas amostras reveladas com cianoacrilato, recuperaram-se as maiores quantidades de DNA, de entre os métodos reveladores (mediana de 45,2 pg/μl).

Em algumas ID, particularmente nas não reveladas, a concentração de DNA na amostra é extremamente elevada, sendo o valor mais elevado 763 pg/μl para a amostra de 0 (zero) dias sem revelador. A amostra de 20 dias também apresenta um valor elevado, com 667 pg/μl de DNA. As ID com menor concentração de DNA estão no grupo das reveladas com pincel. Numa amostra não se obteve qualquer DNA (32 dias), noutra obteve-se 5 pg/μl e noutra 7pg/μl.

A Tabela 7 mostra que não ocorre variação significativa entre o par ciano-mag e pinc-mag ($p > 0,05$). Para o par ciano-sem e pinc-ciano, verificam-se diferenças relativamente significativas ($p < 0,05$). Para os outros pares as diferenças são bastante significativas.

Tabela 7. Resultado da estatística do teste de Wilcoxon da concentração obtida para os 4 métodos de revelação.

	Mag - Sem	Ciano - Sem	Pinc - Sem	Ciano - Mag	Pinc - Mag	Pinc - Ciano
Z	-3,010 ^(a)	-2,272 ^(a)	-3,408 ^(a)	-1,420 ^(b)	-1,477 ^(a)	-2,215 ^(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003	,023	,001	,156	,140	,027

^(a) Baseado nas ordens positivas; ^(b) Baseado nas ordens negativas.

Comparando os resultados da quantificação com os da quantidade de perfil recuperado com Ident28 (Figura 27), observa-se que, por vezes, não existe relação entre a quantidade de perfil recuperado e a quantidade de DNA extraído, pois há concentrações que às vezes dão percentagens de perfil elevadas, noutros casos apenas permitem a recuperação de pouco perfil. Note-se, por exemplo, o caso do dia 0 em comparação com o dia 20 das amostras não reveladas. No dia 20 consegue-se 100% de perfil, enquanto no dia 0, com uma maior concentração de DNA, apenas se consegue 24%. Comparando também o dia 4 com o dia 48, verifica-se que no segundo, com uma concentração de 171 pg/μl se recupera 100% do perfil, enquanto no primeiro, com maior concentração (175 pg/μl), não é detectado nenhum alelo. Para as ID não reveladas obtiveram-se concentrações bastante elevadas, mas, mesmo assim, não permitiram, em muitos casos, a detecção do perfil completo; por exemplo, nos dias 0, 4, 8, 12 e 16. Adicionalmente, a concentração mínima com a qual se consegue obter um perfil completo é de 117 pg/μl.

É de referir que, em nenhuma amostra se verificou ocorrer inibição do IPC (controlo interno do RT-PCR).

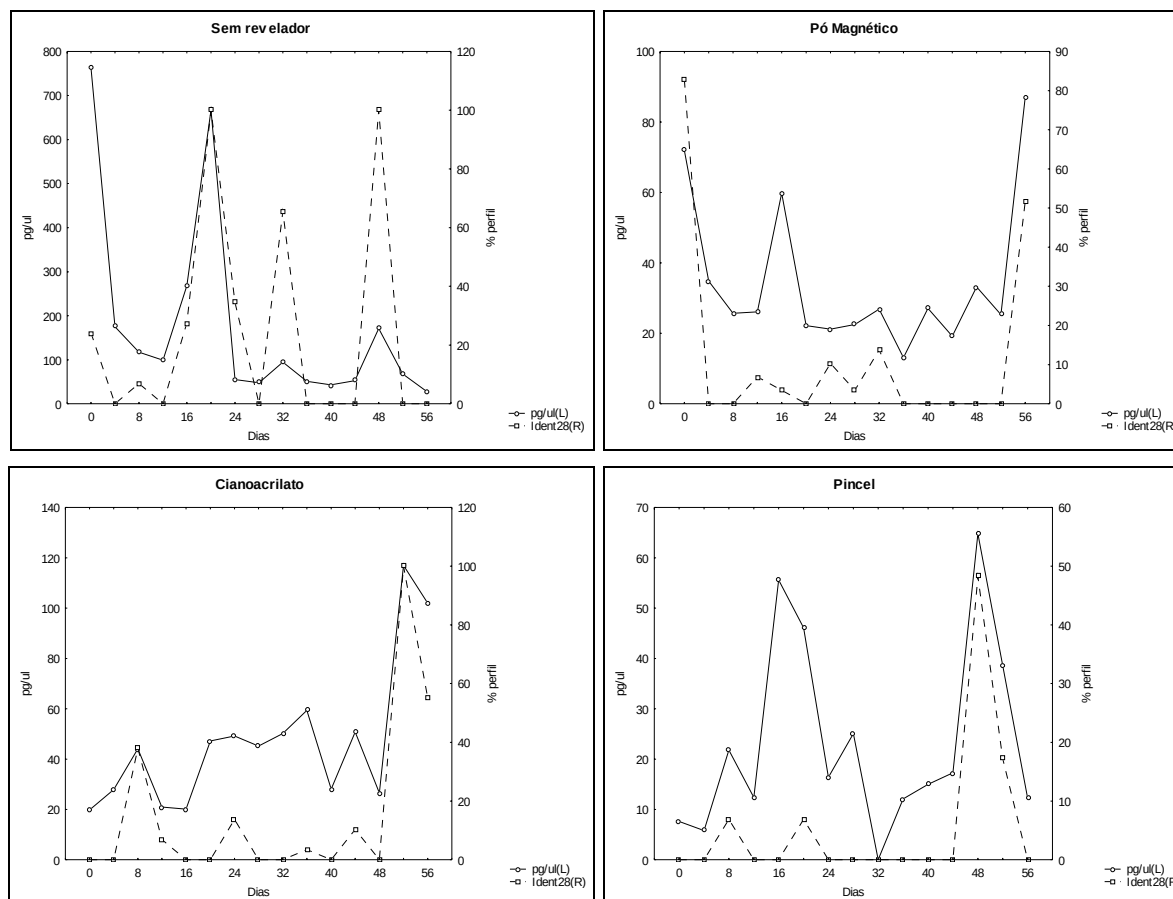


Figura 27. Gráficos da comparação entre a concentração de DNA obtida e a percentagem de perfil detectado com Ident28.

3.3.1 Identifiler™

3.3.1.1 Número de ciclos

Em relação à análise dos resultados com Identifiler™, o sucesso da análise é substancialmente superior quando as amostras são analisadas a 34 ciclos. Na Figura 28 pode-se constatar que os valores de sucesso obtidos nas duas réplicas da análise a 34 ciclos são maioritariamente superiores aos da amplificação a 28 ciclos, com todos os métodos de revelação. No entanto, das 60 amostras analisadas, em 3 (5%) foi possível obter um perfil completo com 28 ciclos (Figura 28). Com Ident34, foram obtidos perfis completos em 22% das amostras analisadas. Mesmo usando 34 ciclos, em quatro amostras, o sucesso continuou abaixo de 20% em ambas as réplicas e, numa amostra, apenas numa réplica. Não foram observadas amostras que amplificadas com 34 ciclos proporcionassem um sucesso de 0% (em que não são observados nenhuns alelos), e apenas numa situação foi observado menos de 10% do perfil (amostra não revelada com 36 dias (Figura 28), 1 alelo observado em ambas as réplicas).

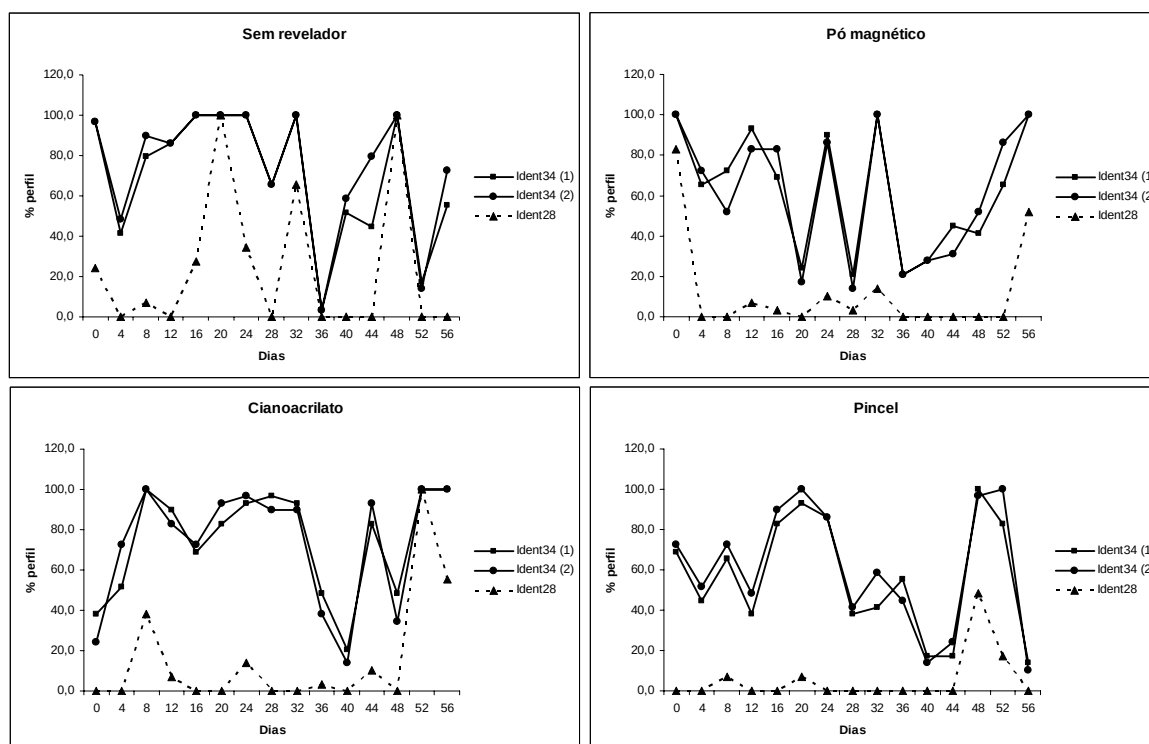


Figura 28. Gráficos dos resultados do sucesso para os vários dias e métodos reveladores para Ident28, e as duas réplicas de Ident34.

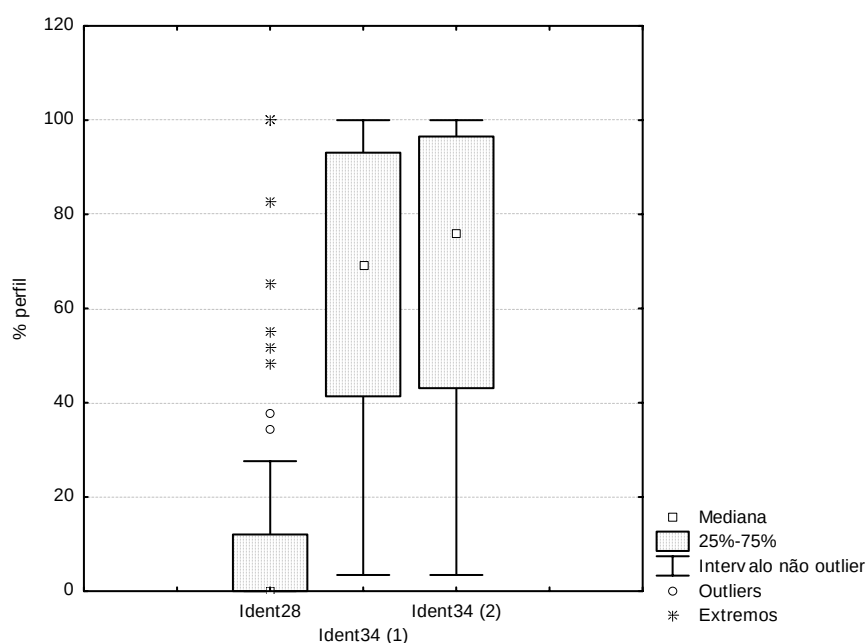


Figura 29. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso com Ident28 e as duas réplicas de Ident34.

Assim, a Figura 29 mostra que a mediana da amplificação a 34 ciclos localiza-se, em ambas as réplicas com Ident34, aproximadamente nos 70% de perfil recuperado, enquanto na amplificação com Ident28 a mediana situa-se nos 0%. A 34 ciclos, em 50% das amostras recuperou-se entre 40% e 95% de perfil, enquanto a 28 ciclos, em 75 % das amostras

recuperou-se um máximo de 12%. Porém, nesta última observam-se alguns *outliers* e *outliers* extremos, que chegam a atingir 100% de perfil recuperado.

As duas réplicas da amplificação a 34 ciclos apresentam os quartis muito semelhantes. Comparando-as estatisticamente, fazendo o teste de Wilcoxon e dos Sinais, os dois testes mostram que não existem diferenças significativas entre elas ($p > 0,05$).

Tabela 8. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação da percentagem de perfil obtido com Ident28 e Ident34.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ident34 - Ident28	Negative Ranks	0 ^(a)	,00	,00
	Positive Ranks	57 ^(b)	29,00	1653,00
	Ties	3 ^(c)		
	Total	60		

(a) Ident34 < Ident28; (b) Ident34 > Ident28; (c) Ident34 = Ident28;

Usando a primeira réplica de Ident34 para comparações com Ident28, o teste de Wilcoxon (Tabela 8) mostra que a soma das ordens (*Sum of Ranks*) das observações positivas é muito superior à das observações negativas, o que indica que a percentagem de perfil detectado é muito superior com Ident34. Em nenhum caso houve piores resultados com Ident34 que com Ident28, pois o número de observações negativas (N) foi nulo. Estes resultados conduzem a um valor de $p = 0,000$, o que mostra haver diferenças muito significativas entre estes dois grupos.

3.3.1.2 Métodos de revelação

Fazendo o teste de Friedman para as diferenças encontradas no sucesso entre os vários reveladores, verifica-se que, no global, não são estatisticamente significativas (Tabela 9).

Tabela 9. Teste de Friedman para a comparação do sucesso entre os diferentes métodos de revelação.

N	30
Chi-Square	7,254
df	3
Asymp. Sig.	,064

Contudo, analisando os 4 métodos emparelhados entre si, recorrendo ao teste de Wilcoxon (Tabela 10), observa-se que no par sem-pinc existem diferenças significativas ($p < 0,05$). No par ciano-pinc, obtém-se uma diferença menos significativa ($p = 0,05$). Todos os outros pares não apresentam diferenças significativas. Estes resultados são corroborados pelo teste dos Sinais (Tabela 11), em que se verificam diferenças significativas para o par sem-pinc, mas para o par ciano-pinc essas diferenças deixam de ser significativas.

Tabela 10. Resultado da estatística do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os diferentes métodos de revelação.

	Mag - Sem	Ciano - Sem	Pinc - Sem	Ciano - Mag	Pinc - Mag	Pinc - Ciano
Z	-1,418 ^(a)	-,339 ^(b)	-2,324 ^(a)	-1,669 ^(b)	-,444 ^(a)	-1,959 ^(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,156	,734	,020	,095	,657	,050

(a) Baseado nas ordens positivas; (b) Baseado nas ordens negativas.

Tabela 11. Resultado da estatística do teste dos Sinais para a comparação do sucesso entre os diferentes métodos de revelação.

	Mag - Sem	Ciano - Sem	Pinc - Sem	Ciano - Mag	Pinc - Mag	Pinc - Ciano
Z	-,770	,000	-2,835		-,371	-1,323
Asymp. Sig. (2-tailed)	,441	1,000	,005		,710	,186
Exact Sig. (2-tailed)				,424^(a)		

(a) Usada a distribuição binomial

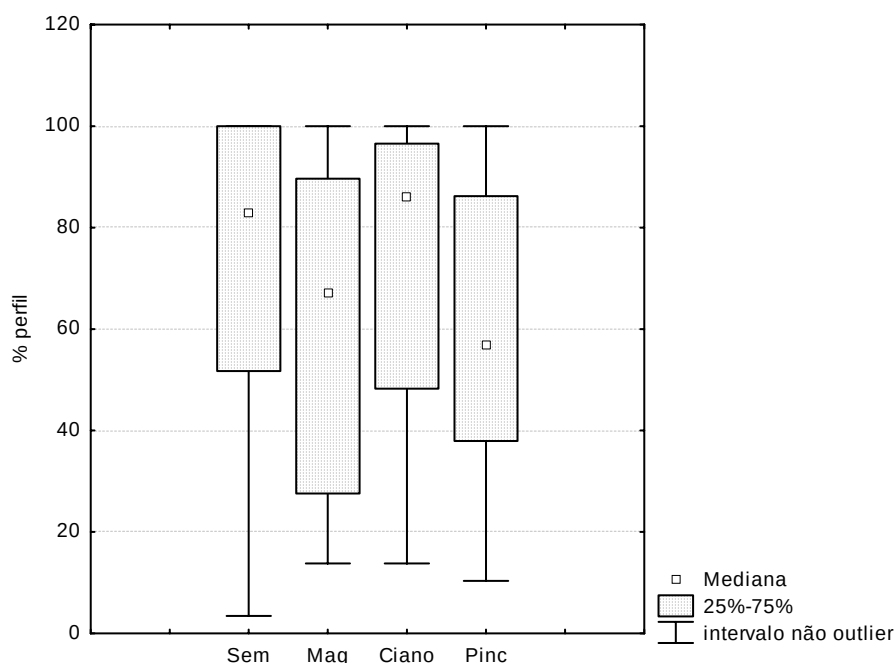


Figura 30. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso da análise com Ident34, das amostras reveladas e não reveladas.

Na Figura 30 está representada a distribuição dos valores obtidos para os vários métodos reveladores. Confirma-se que as ID reveladas com pincel apresentam os valores mais baixos e as não reveladas, ou reveladas com cianoacrilato, apresentam os valores mais elevados. As ID não reveladas e as reveladas com cianoacrilato são as que apresentam a mediana mais elevada, (83% e 86% respectivamente), enquanto as reveladas com pó magnético e com pincel, apresentam os piores resultados (mediana de 67% e 57% respectivamente).

3.3.1.3 Alelos contaminantes

Usando a amplificação com Ident34, detectou-se alguns alelos contaminantes esporádicos nos controlos negativos de amplificação e extracção, mas foram negligenciados por ocorrerem em número extremamente baixo e por não serem reproduzíveis. Com Ident28 estes alelos não foram detectados. Também não se detectou qualquer contaminação sistemática nestes controlos. No entanto, na análise das amostras foram detectados alelos que, por não pertencerem ao perfil do indivíduo que deixou as ID, foram considerados contaminantes.

A 28 ciclos apenas foi observado um alelo contaminante na amostra pincel_48. No entanto, quando amplificadas a 34 ciclos, houve a detecção de um maior número de alelos contaminantes (*allele dropin*) em algumas amostras (Figura 31). Usando as duas réplicas da amplificação com Ident34, foi detectado uma média de 1,45 alelos contaminantes por amostra, sendo que se observou um máximo de 8 alelos contaminantes em duas amplificações, não correspondentes à mesma amostra. Observou-se, em várias ocasiões, que para a mesma amostra, as duas réplicas deram resultados divergentes, sendo que um caso limite é a amostra pincel_32, em que na primeira réplica não se detectou qualquer alelo contaminante e na segunda amplificação detectaram-se 8. No global das amostras, este *kit* detectou uma proporção de 8% de alelos contaminantes.

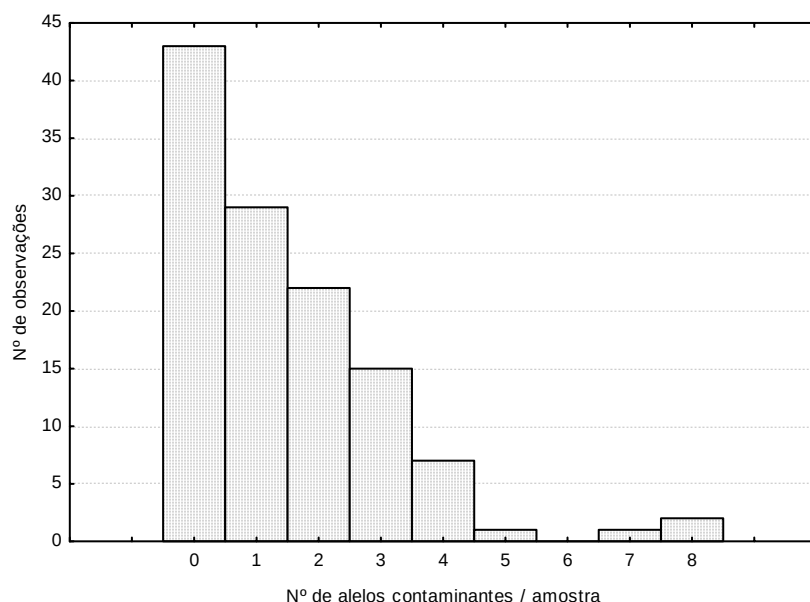


Figura 31. Histograma da frequência do número de alelos contaminantes por amostra (Ident34). Tem em consideração todas as amostras e as duas réplicas feitas (N=120).

É de notar que não há diferenças significativas na contaminação entre os diferentes métodos de revelação ($p > 0,05$ para qualquer par, usando o teste-*t* para amostras emparelhadas), tendo em consideração o número de alelos contaminantes por amostra. Contudo, considerando a percentagem de alelos contaminantes no total de alelos

detectados, verifica-se que as amostras não reveladas apresentam, em média, menor percentagem de alelos contaminantes (5%) que as amostras reveladas (pó magnético - 10%, cianoacrilato - 10% e pincel - 9%). Estatisticamente, estas diferenças continuam a não ser significativas ($p > 0,05$).

Adicionalmente, não existem diferenças significativas na detecção de alelos contaminantes entre marcadores maiores e menores de 200 pb.

3.3.1.4 Exposição ao ambiente

Parece não existir uma correlação entre a quantidade de perfil obtido e o número de dias decorridos após a colheita das ID. Contudo, na amplificação com 34 ciclos consegue-se definir uma linha de tendência com um declive negativo (que tende para a diminuição da percentagem de perfil obtido com o aumento do número de dias) para todas as amostras, excepto para as reveladas com cianoacrilato, em que o declive é ligeiramente positivo (Figura 32). As linhas de tendência têm, no entanto, coeficientes de correlação (R^2) muito baixos, evidenciando não existir uma associação forte entre os dois factores em discussão.

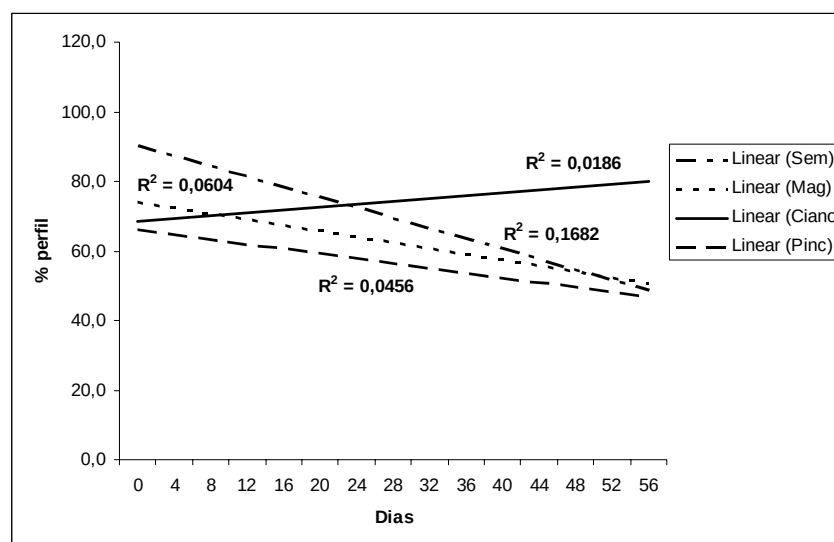


Figura 32. Rectas de tendência e respectivo R^2 obtidos para os valores de sucesso da 1ª réplica com Ident34 para as amostras reveladas e não reveladas.

3.3.1.5 Loci menores e maiores que 200 pb

Fazendo a separação entre *loci* maiores e menores que 200 pb, os menores que 200 pb permitem obter um sucesso superior aos maiores do que 200 pb (Figura 33). Este facto ocorre tanto na amplificação a 28 como a 34 ciclos. Com 28 ciclos, apesar da mediana ser de 0% em ambos os grupos, nota-se o 3º quartil mais elevado nos *loci* menores de 200 pb e mais baixo nos maiores que 200 pb.

O teste de Wilcoxon e o teste dos Sinais usados para a comparação entre o sucesso obtido nestes dois grupos, mostram que as diferenças são muito significativas ($p < 0,01$). De facto, na Tabela 12 verifica-se que existem diferenças entre os dois grupos de marcadores (usando as duas réplicas da amplificação com Ident34). A soma das ordens das observações negativas é muito maior do que a soma das ordens das observações positivas, o que indica que o sucesso com os marcadores com menos de 200 pb é significativamente superior, pois os valores negativos são obtidos quando o sucesso dos marcadores maiores do que 200 pb é menor que a dos marcadores menores que 200 pb.

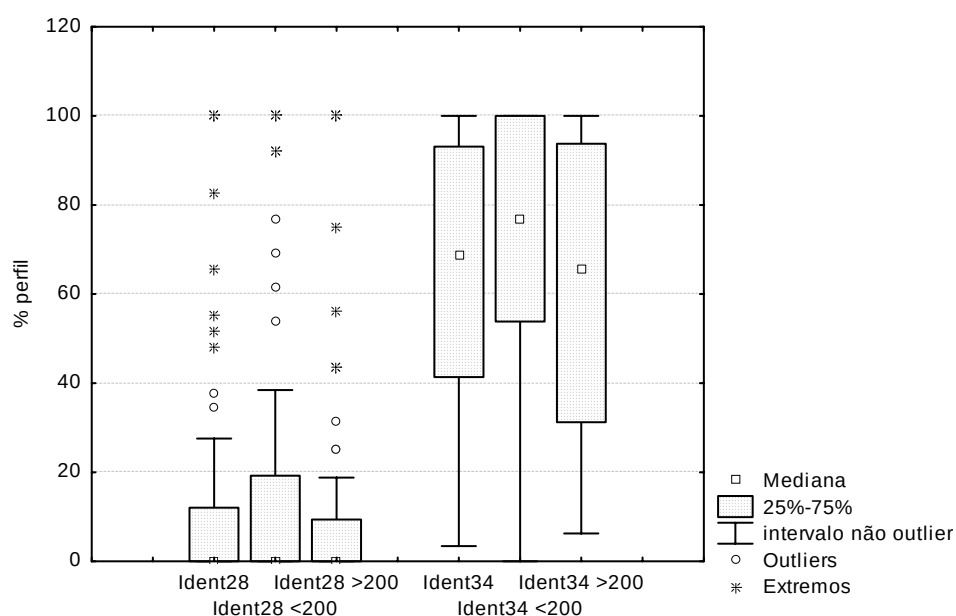


Figura 33. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com todos os *loci*, e apenas com os *loci* menores e maiores que 200 pb, com Ident28 e Ident34.

Tabela 12. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para o sucesso com Ident34 entre os marcadores menores que 200 pb (<200) e maiores que 200 pb (>200).

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
>200 - <200	Negative Ranks	79 ^(a)	50,54	3992,50
	Positive Ranks	16 ^(b)	35,47	567,50
	Ties	25 ^(c)		
	Total	120		

(a) >200 < <200; (b) >200 > <200; (c) >200 = <200

Com efeito, na Figura 34 está representada a distribuição dos valores da diferença de percentagem de perfil recuperado entre os STR com os *loci* menores e maiores de 200 pb. Quando os valores são positivos, significa que houve maior sucesso com os *loci* menores de 200 pb; quando dão valores iguais a 0, não houve diferenças; sendo os valores negativos indicativos de que houve maior sucesso com marcadores maiores que 200 pb. Salvo raras exceções, observa-se que essa diferença é sempre positiva, incluindo a mediana com

valores também positivos. A diferença é, em média, 10%, mas chega a atingir os 60% de perfil recuperado (no caso de revelação com pó magnético).

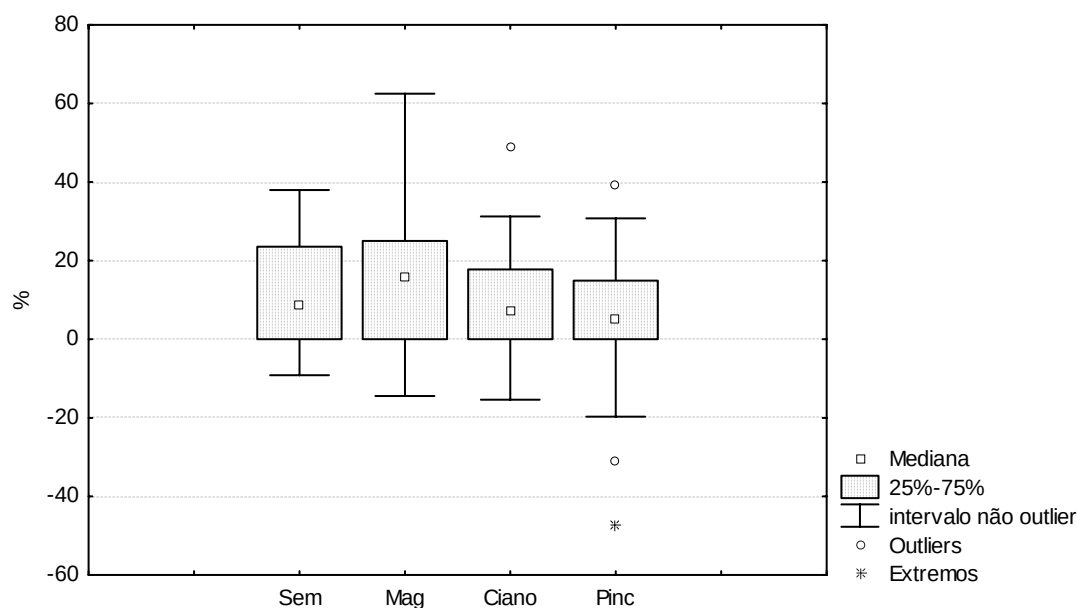


Figura 34. Caixa-com-bigodes dos valores da diferença entre a percentagem de perfil obtido nos *loci* menores e maiores de 200 pb.

3.3.1.6 Hb, allele e locus dropout

Para se conseguir quantificar o equilíbrio heterozigótico, determinou-se a relação de alturas entre os dois picos (alelos) do mesmo *locus*, através da fórmula já referida. Por razões óbvias, só foram tidos em conta os sistemas para os quais o indivíduo é heterozigótico, excluindo-se assim o D7S820, o D16S539 e o D5S818.

Em primeiro lugar, todos os *loci* mostraram elevada assimetria heterozigótica, constatado pelas medianas observadas, sempre com valores de $H_b < 0,5$, excepto para o D19S, com $H_b \approx 0,6$ (Figura 35), e uma consequente dispersão dos valores. Considerando haver desequilíbrio heterozigótico quando $H_b < 0,8$, verifica-se que 80% dos *loci* heterozigóticos, que proporcionam resultados, estão nestas condições.

A elaboração de um gráfico de dispersão com os valores obtidos de H_b vs A_2 (Figura 36), permite observar que existe a tendência para um aumento do desequilíbrio com a diminuição da eficiência da amplificação (determinada pela altura dos picos). Parece possível definir dois grupos de resultados. Um grupo com os valores de A_2 inferiores a 2500 rfu e outro grupo para valores de A_2 superiores a 2500 rfu. Para *loci* com valores de A_2 superiores a 2500 rfu, a probabilidade de ocorrer *allele dropout* é significativamente baixa, tendo acontecido este fenómeno apenas em duas situações. Adicionalmente, para este mesmo grupo, a distribuição dos valores de H_b faz-se num espaço mais restrito, com valores mais próximos de 1. Também é observável que para valores de A_2 abaixo de 2500 rfu, os

valores de Hb estão distribuídos de uma forma bastante uniforme entre 0 e 1, salvo uma pequena região entre 0 e aproximadamente 0,05, na qual não se observam quaisquer valores. Para este grupo, a probabilidade de *allele dropout* é considerável, pois como se verifica, este fenómeno ocorreu em diversas situações.

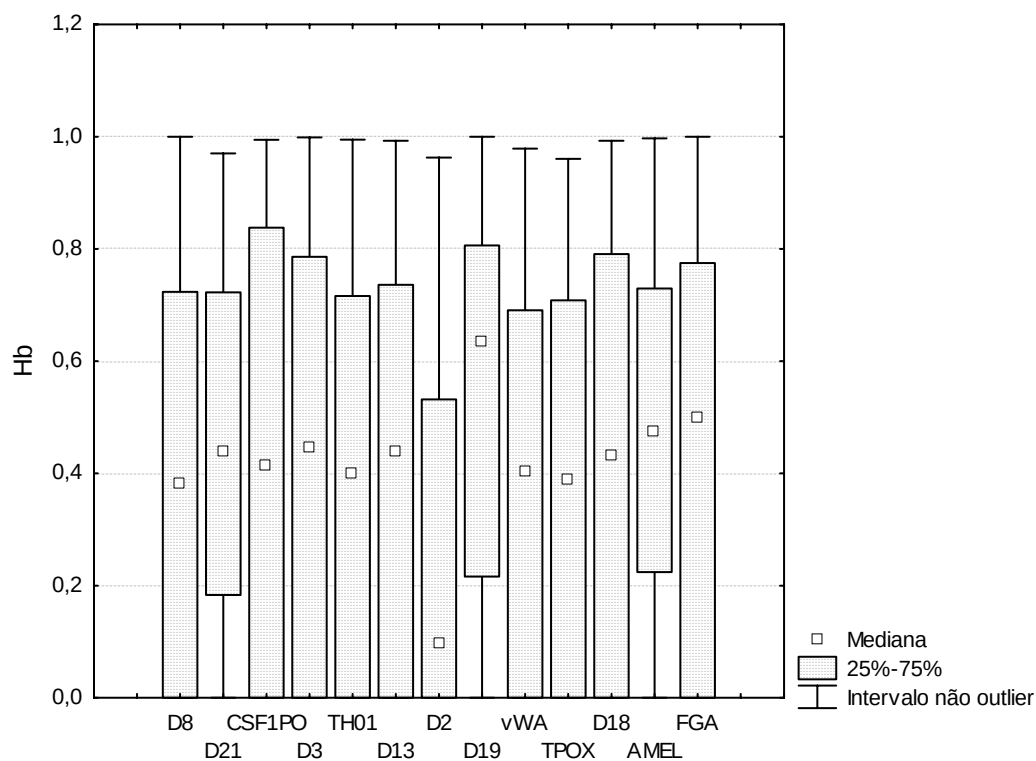


Figura 35. Caixa-com-bigodes dos valores de Hb obtidos para cada *loci*. Para a designação completa dos *loci* ver Tabela 5.

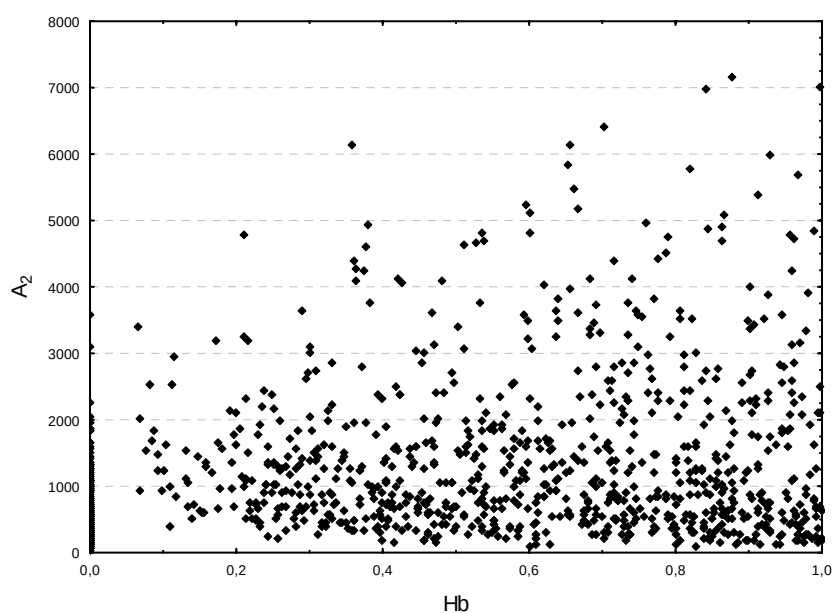


Figura 36. Gráfico de dispersão de valores de Hb vs altura (rfu) do alelo mais alto (A_2).

No gráfico da Figura 37 denota-se que, em amostras com quantidade de DNA, nas quais é possível obter um perfil total com Ident28, quando analisadas com Ident34, em média, não ocorre a introdução significativa de desequilíbrio heterozigótico, pois $Hb=0,8$. Pelo contrário, com a diminuição da percentagem de perfil detectado com Ident28 há o aumento do desequilíbrio heterozigótico.

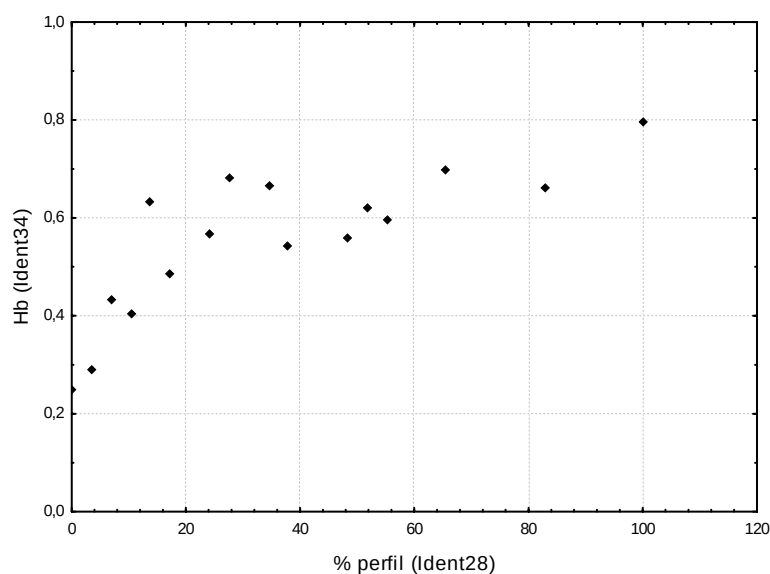


Figura 37. Gráfico de dispersão dos valores médios de Hb obtidos com Ident34 vs percentagem de perfil obtido com Ident28.

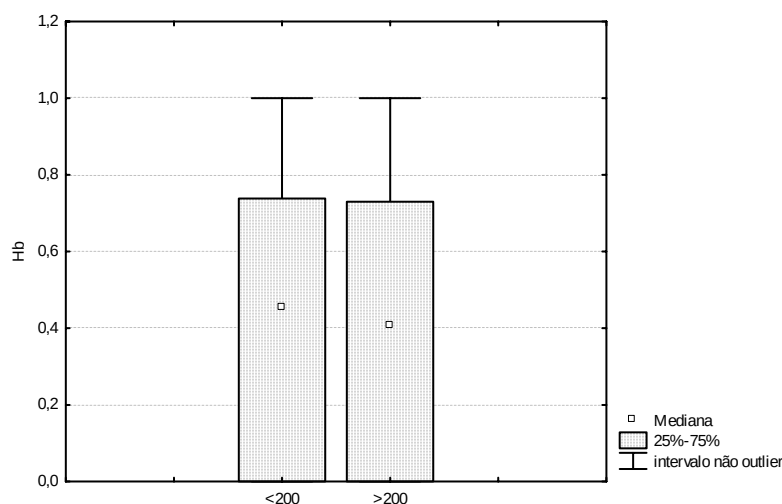


Figura 38. Caixa-com-bigodes dos valores de Hb para os loci menores e maiores que 200 pb.

Considerando os valores de Hb entre os marcadores maiores e menores que 200 pb como amostras independentes, analisaram-se as diferenças com o teste de Mann-Whitney, teste variante da ANOVA, mas não paramétrico (por se ter observado que são amostras não Gaussianas). Este teste mostrou não existirem diferenças significativas ao nível do Hb ($p>0,05$) entre os dois grupos. Esse facto pode ser confirmado graficamente através da observação da Figura 38.

No entanto, parece que existe grande variabilidade entre sistemas, usando o teste de Friedman alinhados por amostra ($p < 0,001$). Fazendo uma demonstração gráfica da distribuição dos valores, o D2S1338 é o que apresenta valores de maior desequilíbrio, pois os quartis estão mais próximos de valores mais baixos; os outros sistemas, no geral, comportam-se de modo semelhante, sendo que o D19S433 se distancia um pouco pela positiva, pois a mediana tem um valor mais elevado (Figura 35).

Tabela 13. Resultado da estatística do teste de Wilcoxon para o Hb entre os métodos de revelação.

	Mag - Sem	Ciano - Sem	Pinc - Sem	Ciano - Mag	Pinc - Mag	Pinc - Ciano
Z	-1,479 ^(a)	-1,609 ^(a)	-5,496 ^(a)	-1,696 ^(b)	-2,028 ^(a)	-2,923 ^(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,139	,108	,000	,090	,043	,003

(a) Baseado nas ordens positivas; (b) Baseado nas ordens negativas

Parece também existir uma grande variabilidade com os diferentes reveladores. De facto, fazendo o teste de Friedman, constata-se que existem diferenças significativas entre os reveladores ($p < 0,01$). Numa análise mais fina, fazendo os testes de Wilcoxon e dos Sinais para as amostras emparelhadas por dia e por *loci*, verifica-se que as diferenças são muito significativas entre os pares pinc-sem e pinc-ciano. São também relativamente significativas para o par pinc-mag (Tabela 13). Para os outros pares, as diferenças não se mostraram significativas do ponto de vista estatístico.

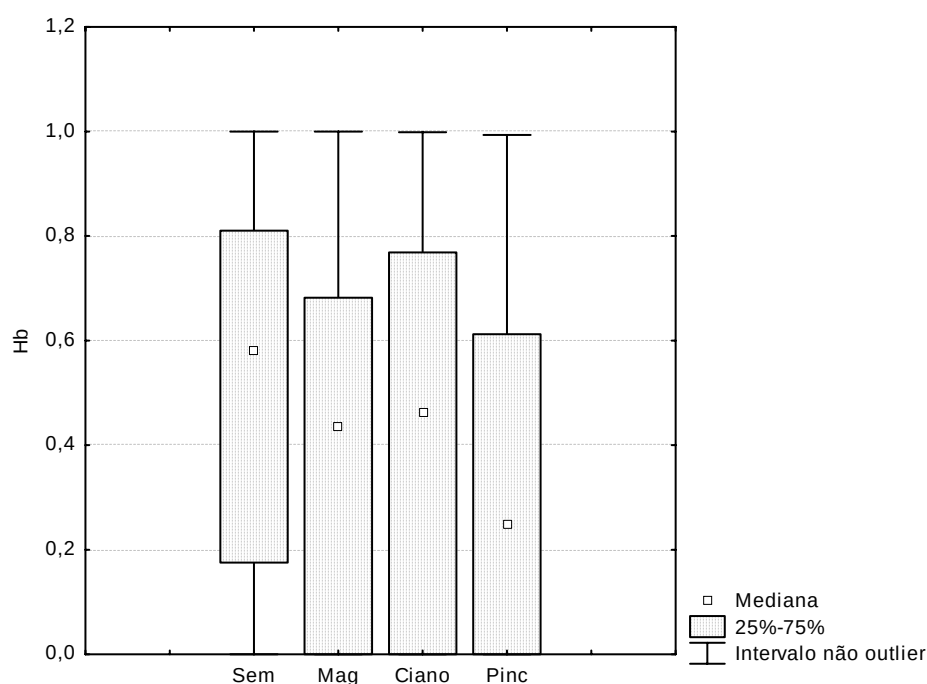


Figura 39. Caixa-com-bigodes dos valores médios de Hb para as amostras reveladas e não reveladas.

A Figura 39 mostra que a revelação com pincel permite valores de Hb mais baixos que com os outros reveladores ou sem revelador. Apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas, observa-se também que a revelação com pó magnético e com cianoacrilato permite obter valores também mais baixos do que nas amostras não reveladas, sendo que com cianoacrilato, os valores são um pouco mais elevados.

Verificando agora os resultados de *allele* e *locus dropout*, considere-se a Tabela 14 com os resultados obtidos para os 4 grupos de amostras, onde apenas se incluem os sistemas heterozigóticos e as duas réplicas de amplificação. O *allele dropout* ocorreu, em média, em 24% de todos os STR heterozigóticos (370/1560). A revelação com pincel foi a que ofereceu o valor mais elevado de *allele dropout* e as amostras sem reveladores o menor valor; a revelação com cianoacrilato foi a que proporcionou os melhores resultados dos métodos reveladores.

Tabela 14. Número de sistemas em que foi verificada heterozigotia, *allele dropout* e *locus dropout*, para a análise de ID reveladas e não reveladas.

	Sem	Mag	Ciano	Pinc	Total (%)
Heterozigotia	63%	48%	62%	44%	54%
<i>Allele dropout</i>	18%	26%	22%	30%	24%
<i>Locus dropout</i>	19%	26%	16%	26%	22%

Em relação ao *locus dropout*, ocorreu em 22 % dos *loci* heterozigóticos. Mais uma vez, nas amostras reveladas com pincel e pó magnético obtiveram-se os piores resultados, com menor percentagem de heterozigotia e maior percentagem de *allele* e *locus dropout*.

Comparando por *loci*, a Tabela 15 mostra que o *locus dropout* foi bem mais significativo no caso de alelos com tamanho superior a 200 pb, com uma média de 27,2%, comparada com 16,3% para os menores de 200 pb; observa-se também, que os valores de sucesso obtidos são superiores nos sistemas com fragmentos de amplificação menores que 200 pb. Pelo contrário, o *allele dropout* não é significativamente diferente nos dois grupos.

O D21S11 foi o polimorfismo que apresentou menor frequência de *allele dropout* (18/120) e, pelo contrário, o D2S1338 foi aquele em que se observou maior frequência (39/120).

É de evidenciar também que, separando os STR heterozigóticos em menores e maiores de 200 pb, observam-se diferenças significativas em termos de sucesso; isto porque, o *locus dropout* é mais elevado nos sistemas maiores que 200 pb, fazendo baixar a percentagem de sucesso observada. No entanto, o TH01, apesar de ser um locus de baixo peso molecular, tem uma percentagem de *locus dropout* consideravelmente superior à dos *loci* com tamanho semelhante.

Note-se ainda que os sistemas em que se obteve uma maior frequência de sucesso foram os sistemas para os quais o indivíduo é homozigótico.

Tabela 15. Percentagem de sucesso, *allele dropout* e *locus dropout* para cada *locus*.

Tamanho (pb)	STR	Sucesso (%)	<i>Allele dropout</i> (%)	<i>Locus dropout</i> (%)
<200	D8	60,0	25,8	14,2
	D3	60,0	25,0	15,0
	TH01	51,7	25,8	22,5
	D19	65,8	18,3	15,8
	vWA	54,2	27,5	18,3
	AME	76,7	15,8	7,5
	D5	79,2	-	20,8
	Média	63,9	23,1	16,3
>200	D21	58,3	15,0	26,7
	D7	71,7	-	28,3
	CSF1	40,8	30,0	29,2
	D13	54,2	24,2	21,7
	D16	75,8	-	24,2
	D2	35,8	32,5	31,7
	TPOX	47,5	25,0	27,5
	D18	48,3	22,5	29,2
	FGA	53,3	20,8	25,8
	Média	53,9	24,3	27,2

Estão incluídas as duas amplificações de cada amostra. Para a designação completa dos *loci* consultar a Tabela 5.

3.3.1.7 Stutters

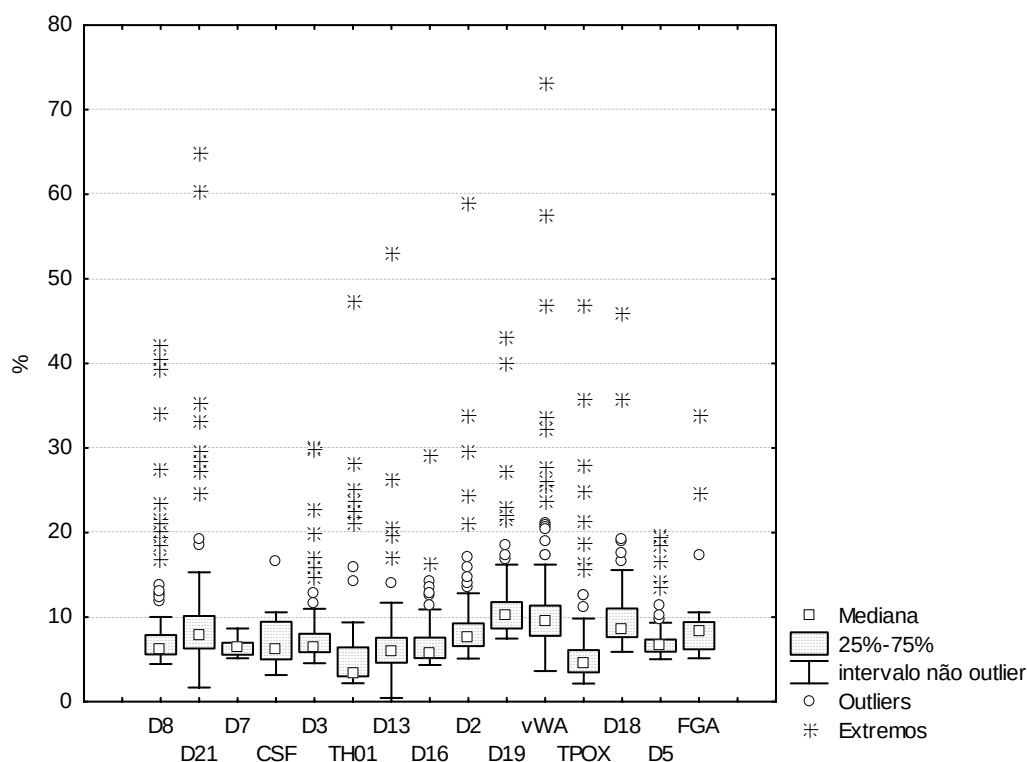


Figura 40. Caixa-com-bigodes dos valores de altura relativa dos produtos *stutter* (%) para os vários *loci*. Para a designação completa dos *loci* consultar a Tabela 5.

Na Figura 40 é visível a distribuição de valores da proporção da altura de produtos *stutter* em relação ao alelo correspondente, para cada *locus*.

Na generalidade dos casos a dispersão dos valores não *outliers* situa-se abaixo dos 15%. Contudo, em quase todas as amostras, existem muitos *outliers* e mesmo *outliers* extremos que se encontram maioritariamente até aos 30%, mas que chegam a ter alturas bastante elevadas. Estas podem chegar a atingir aproximadamente 70% do tamanho do pico correspondente, como no caso do vWA. O D7S820 é o que parece apresentar valores de *stutters* mais baixos.

3.3.1.8 Consenso

Fazendo três réplicas da amplificação a 34 ciclos das amostras de ID não reveladas, foi possível construir um perfil de consenso para cada amostra. Os resultados parciais são mostrados na Tabela 16.

A análise da tabela permite verificar que alguns erros, que se cometeriam reportando apenas os resultados de uma única amplificação, são eliminados quando se faz o consenso. Um exemplo demonstrativo deste facto é o da amostra 0 para o *locus* CSF1PO, em que para a primeira réplica se reportava erradamente 9,11, mas com o consenso já se reporta o genótipo correcto 11,12.

Tabela 16. Resultados parciais obtidos nas três réplicas para as ID não reveladas e respectivo consenso.

Amostra	Réplica	D8	D21	D7	CSF1PO	D3	TH01	D13
0	1 ^a	11,14	28,30	11,F	9,11	14,15	8,9	10,12
	2 ^a	11,14	28,30	11,F	11,12	14,15,16	8,9	10,12
	3 ^a	11,14	28,30	11,F	11,12	14,15	8,9	10,12
	Consenso	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
4	1 ^a	–	28,F	–	–	–	8,9,3	–
	2 ^a	11,14	–	11,F'	11,F'	14,F'	8,F'	9,12
	3 ^a	11,F'	28,29	11,F'	12,F'	15,F'	8,F'	–
	Consenso	11,F'	28,F'	11,F'	–	–	8,F'	–
8	1 ^a	11,13,14	28,30,31,2	–	12,F'	14,15	8,9	12,F'
	2 ^a	11,14,15	28,30	11,12	11,12	14,15	7,9	10,12
	3 ^a	11,14	28,30,31	11,F'	9,11,12	14,15	8,9	10,F'
	Consenso	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
12	1 ^a	11,14	28,F'	11,F'	11,F'	14,15	8,9	10,11
	2 ^a	11,14	28,30	11,F'	12,F'	14,15	9,F'	10,12
	3 ^a	14,F'	28,F'	11,F'	11,F'	14,15	9,F'	10,12
	Consenso	11,14	28,F'	11,F'	11,F'	14,15	9,F'	10,12
Controlo		11,14	28,30	11,11	11,12	14,15	8,9	10,12

Tabela 16 (continuação).

Amostra	Réplica	D8	D21	D7	CSF1PO	D3	TH01	D13
16	1 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	7,8,9	10,12
	2 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	3 ^a	11,14	28,30,31	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	Consenso	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
20	1 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	2 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	3 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	Consenso	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
24	1 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	2 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
	3 ^a	11,13,14	28,30	11,F'	9,11,12	14,15	8,9	10,12
	Consenso	11,14	18,30	11,F'	11,12	14,15	8,9	10,12
28	1 ^a	11,14	28,30	11,F'	11,F	14,15	8,F'	10,12
	2 ^a	11,14	28,30	11,F'	12,F	14,15	8,F'	10,12
	3 ^a	11,13,14	28,F'	11,F'	11,12	14,F'	9,F'	–
	Consenso	11,14	28,30	11,F'	11,12	14,15	8,F'	10,12
Controlo		11,14	28,30	11,11	11,12	14,15	8,9	10,12

F' – possibilidade de *allele dropout*.

Estas diferenças são mais perceptíveis analisando a Tabela 17. Nesta tabela estão representados o número de observações dos itens especificados e a percentagem correspondente, nos replicados e nos perfis de consenso (obtidos aplicando a regra do consenso aos três replicados). Observa-se em primeiro lugar que o perfil é mais afectado por *allele dropout* do que por contaminantes, pois a percentagem de *loci* afectados por contaminantes é inferior aos afectados por *allele dropout*, tanto para os replicados como para os perfis de consenso. Usando apenas o resultado de uma amplificação para constituir o perfil (replicados), a percentagem de sistemas que são afectados por contaminantes é significativamente superior do que fazendo um consenso (6,67% e 1,25% respectivamente). O erro introduzido por alelos contaminantes é razoavelmente eliminado quando se faz o consenso, pois observou-se a presença do mesmo alelo contaminante em dois replicados da mesma amostra em apenas 3 situações (1,25%). Pelo contrário, a frequência de *allele dropout*, apesar de ser mais reduzida com o consenso, continua ainda a afectar um elevado número de *loci* (12,5%).

Observa-se também, que a proporção de *locus dropout* é superior quando se faz consenso, porque nestes apenas se reporta um alelo quando este se encontra pelo menos duplicado, levando a que se considere um menor número de alelos. Por outro lado, no consenso, a frequência de sistemas correctos é ligeiramente superior, enquanto que a frequência de *loci* incorrectos é mais baixa.

Tabela 17. Síntese dos resultados do consenso.

	Replicado	Consenso
Loci total	720	240
Contaminação	48 (6,67%)	3 (1,25%)
Allele dropout	114 (15,83%)	30 (12,5%)
Locus dropout	126 (2,6%)	45 (18,75%)
Loci correctos	432 (60%)	162 (67,5%)
Loci incorrectos	162 (22,5%)	33 (13,75%)

Contaminação – loci afectados por contaminantes; *Loci correctos* - loci em que se observou o genótipo correcto; *Loci errados* - loci em que se observou informação incorrecta (contaminação e *allele dropout*).

3.3.2 Yfiler™

3.3.2.1 Número de ciclos

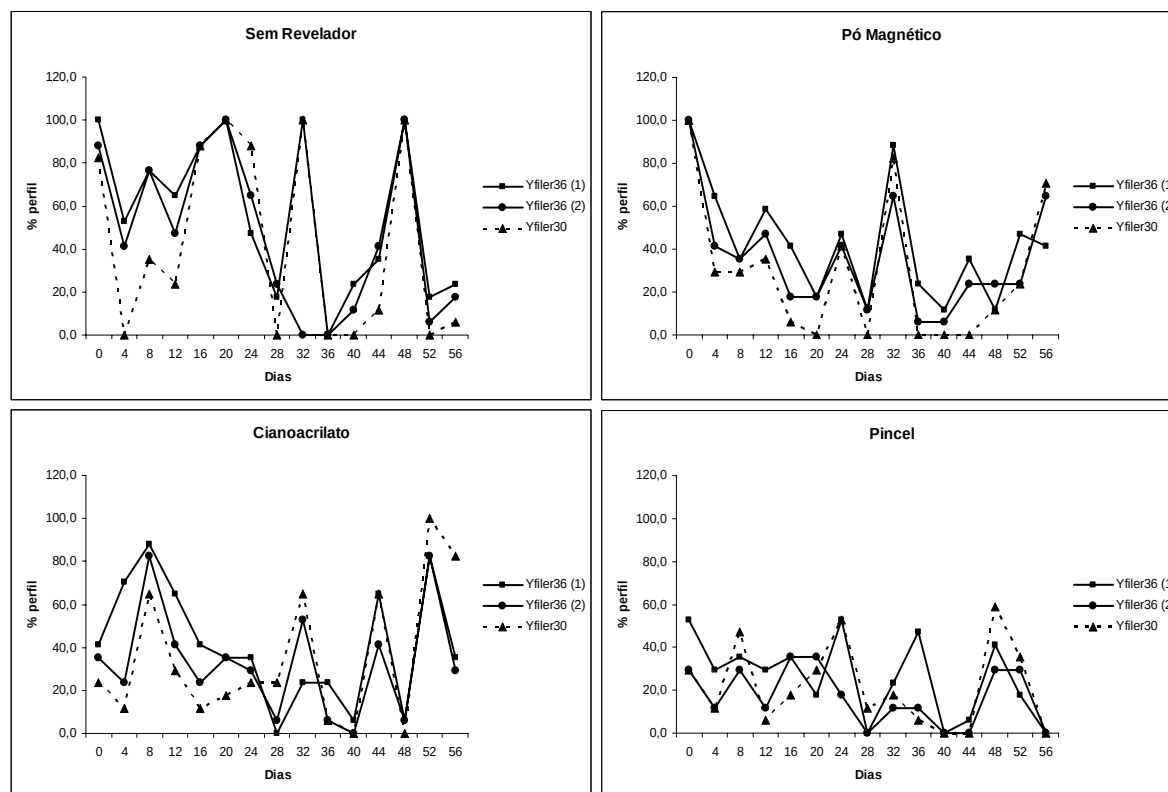


Figura 41. Gráficos dos resultados do sucesso de amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.

A diferença entre 30 e 36 ciclos com Yfiler™ não é muito notória, pelo menos comparado com o Identifiler™, em que as diferenças são facilmente visíveis (Figura 41). Contudo, verifica-se que os valores de sucesso nas amostras não reveladas parecem mais elevados, enquanto as reveladas com pincel parecem ter valores mais baixos. Verifica-se também, que

no total das amostras obteve-se perfis completos (100%) em 5 na primeira réplica e 3 na segunda réplica com 36 ciclos e, em 5 amostras com 30 ciclos.

A Figura 42 mostra a distribuição dos valores de todas as amostras amplificadas com 30 ciclos e as duas réplicas da amplificação a 36 ciclos. Existem diferenças entre a amplificação a 30 e 36 ciclos, sendo que nesta última, a percentagem de perfil detectado é, em geral, superior. A mediana a 30 ciclos encontra-se nos 23,5 %, enquanto com 36 ciclos se situa nos 35,3 % para a primeira réplica, e nos 29,4 % para a segunda.

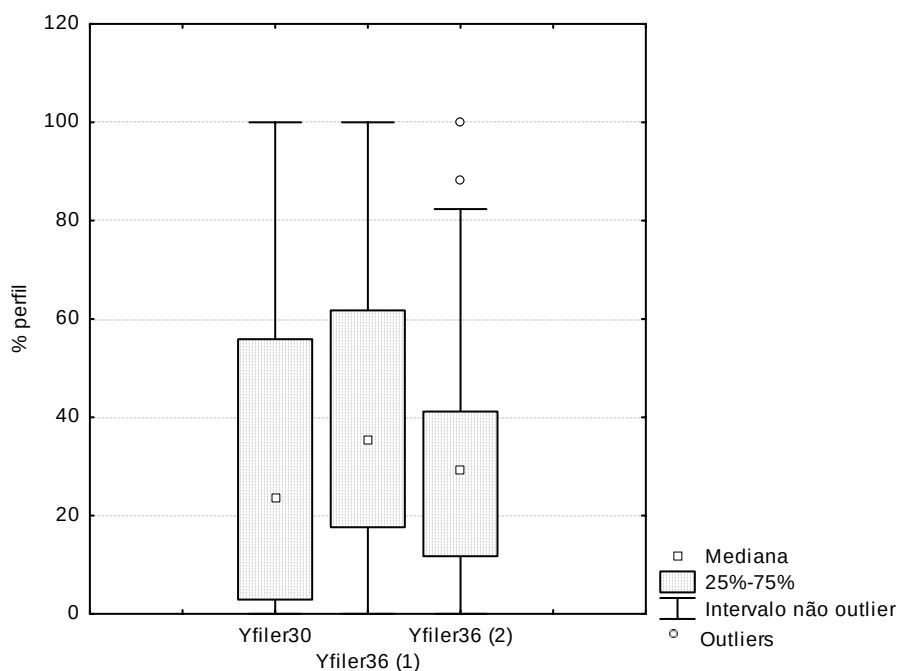


Figura 42. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso da amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.

Na mesma figura também é notório que a diferença entre o sucesso a 30 e 36 ciclos não é muito elevada, pelo menos não tão elevada como a verificada para o Identifiler™ (Figura 29). De facto, fazendo o teste de Wilcoxon (Tabela 18) e dos Sinais, a diferença entre as duas amplificações relativamente ao sucesso obtido não é estatisticamente significativa, particularmente se se comparar com a segunda réplica (Yfiler36 (2)). Fazendo o teste de Wilcoxon para comparar os resultados obtidos com as duas réplicas de Yfiler36, constata-se que as duas réplicas são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Na Tabela 19 é visível que, em algumas amostras, os resultados obtidos com um maior número de ciclos são piores que com a amplificação normal, a verificar pelo número de vezes (N) em que da subtracção do sucesso com Yfiler36 por Yfiler30 se obteve um valor negativo. Esse facto é observável em 16 amostras com a primeira réplica e em 20 amostras com a segunda réplica. Recorde-se que com o Identifiler™ esta ocorrência não se verificou em nenhuma situação (Tabela 8).

Tabela 18. Resultados da estatística do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre a amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.

	Yfiler36 (1) - Yfiler30	Yfiler36 (2) - Yfiler30
Z	-1,940 ^(a)	-,652 ^(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,052	,515

(a) Baseado nas ordens negativas.

Tabela 19. Resultados das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre a amplificação com Yfiler30 e as duas réplicas de Yfiler36.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Yfiler36_1 - Yfiler30	Negative Ranks	16 ^(a)	24,94	399,00
	Positive Ranks	32 ^(b)	24,28	777,00
	Ties	9 ^(c)		
	Total	57		
Yfiler36_2 - Yfiler30	Negative Ranks	20 ^(d)	30,88	617,50
	Positive Ranks	32 ^(e)	23,77	760,50
	Ties	5 ^(f)		
	Total	57		

(a) Yfiler36 (1) < Yfiler30; (b) Yfiler36 (1) > Yfiler30; (c) Yfiler36 (1) = Yfiler30; (d) Yfiler36 (2) < Yfiler30;

(e) Yfiler36 (2) > Yfiler30; (f) Yfiler36 (2) = Yfiler30

Tabela 20. Resultados das ordens do teste de Wilcoxon, para a comparação do sucesso entre os pares Ident28-Yfiler30 e Ident34-Yfiler36.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ident28 - Yfiler30	Negative Ranks	42 ^(a)	22,45	943,00
	Positive Ranks	1 ^(b)	3,00	3,00
	Ties	17 ^(c)		
	Total	60		
Ident34 - Yfiler36	Negative Ranks	6 ^(d)	10,00	60,00
	Positive Ranks	50 ^(e)	30,72	1536,00
	Ties	4 ^(f)		
	Total	60		

(a) Ident28 < Yfiler30; (b) Ident28 > Yfiler30; (c) Ident28 = Yfiler30; (d) Ident34 < Yfiler36; (e) Ident34 > Yfiler36; (f) Ident34 = Yfiler36

Comparando os resultados obtidos com Yfiler™ com os obtidos com Identifiler™, verifica-se que as diferenças entre o número de ciclos normais e o usado para amostras LCN, são muito mais significativas usando o Identifiler™ do que o Yfiler™. Enquanto com Yfiler30 se obteve um sucesso bastante elevado, com Ident28 esse sucesso foi significativamente inferior ($p < 0,01$). Por outro lado, quando se aplicou um maior número de ciclos, e comparando a Figura 29 com a Figura 42, verifica-se que o Ident34 permitiu a obtenção de sucessos significativamente mais elevados que o Yfiler36 ($p < 0,01$). A Tabela 20 mostra justamente o que se acabou de referir; repare-se que a soma das ordens negativas para o par Ident28-Yfiler30 é muito superior à soma das ordens positivas, indicando que os valores da subtração do sucesso obtido com Ident28 e Yfiler30 são maioritariamente valores negativos; isto é, o sucesso obtido com Yfiler30 é superior ao obtido com Ident28. Por outro

lado, a soma das ordens positivas para o par Ident34-Yfiler36 é muito superior à soma das ordens negativas, indicando que o sucesso obtido com Ident34 é superior ao obtido com Yfiler36.

3.3.2.2 Loci maiores e menores que 200 pb

Separando os *loci* por tamanhos dos fragmentos de amplificação, e considerando os maiores e menores que 200 pb, nota-se que o sucesso da amplificação varia entre estes dois grupos. Os *loci* menores que 200 pb têm um sucesso consideravelmente superior aos *loci* maiores que 200 pb, e ao sucesso do *kit* em geral, tendo em consideração a mediana e o valor dos quartis (Figura 43).

Nesta figura é também visível que na amplificação a 30 ciclos existe uma diferença considerável entre os *loci* maiores e menores que 200 pb. Contudo, a diferença entre os dois grupos, no caso da amplificação a 36 ciclos, é mais elevada.

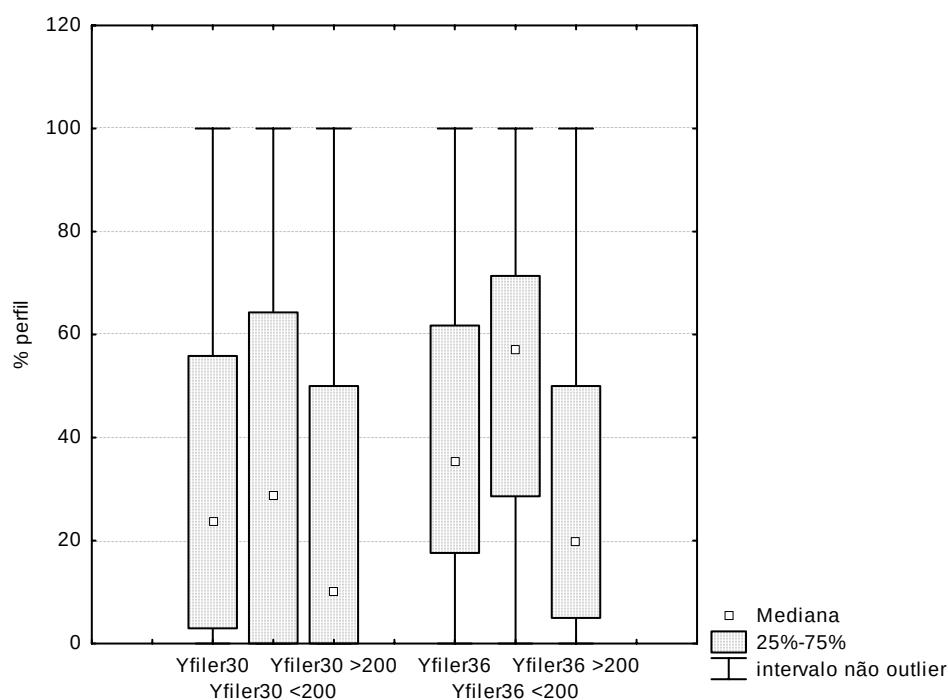


Figura 43. Caixa-com-bigodes dos valores do sucesso obtidos todos os *loci*, e com os *loci* menores e maiores de 200 pb, das amplificações com Yfiler30 e Yfiler36.

As diferenças entre os dois grupos são muito significativas, tanto para a amplificação a 30 ciclos como para a amplificação a 36 ciclos ($p < 0,01$ pelo teste de Wilcoxon e dos Sinais). Pela Tabela 21 constata-se que o número de observações negativas é maior do que o número de observações positivas em ambos os grupos, o que conduz ao facto da soma das ordens negativas seja muito superior à soma das ordens positivas, confirmando, estatisticamente, que o sucesso com *loci* maiores que 200 pb seja menor que com *loci* menores que 200 pb.

Tabela 21. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os *loci* maiores e menores que 200 pb, para a amplificação com Yfiler30 e Yfiler36.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Yfiler36 >200 - Yfiler36 <200	Negative Ranks	45 ^(a)	26,82	1207,00
	Positive Ranks	5 ^(b)	13,60	68,00
	Ties	10 ^(c)		
	Total	60		
Yfiler30 >200 - Yfiler30 <200	Negative Ranks	31 ^(d)	22,52	698,00
	Positive Ranks	9 ^(e)	13,56	122,00
	Ties	20 ^(f)		
	Total	60		

(a) Yfiler36 >200 < Yfiler36 <200; (b) Yfiler36 >200 > Yfiler36 <200; (c) Yfiler36 >200 = Yfiler36 <200; (d) Yfiler30 >200 < Yfiler30 <200; (e) Yfiler30 >200 > Yfiler30 <200; (f) Yfiler30 >200 = Yfiler30 <200

Na Figura 44 é visível a distribuição dos valores da diferença entre o sucesso obtido com os *loci* menores e maiores que 200 pb, com a amplificação a 36 ciclos. Os valores dessa diferença assumem maioritariamente valores positivos, sendo que a mediana assume sempre valores acima de 20% de diferença. Adicionalmente, a mediana das ID reveladas tem valores mais elevados do que a das ID não reveladas.

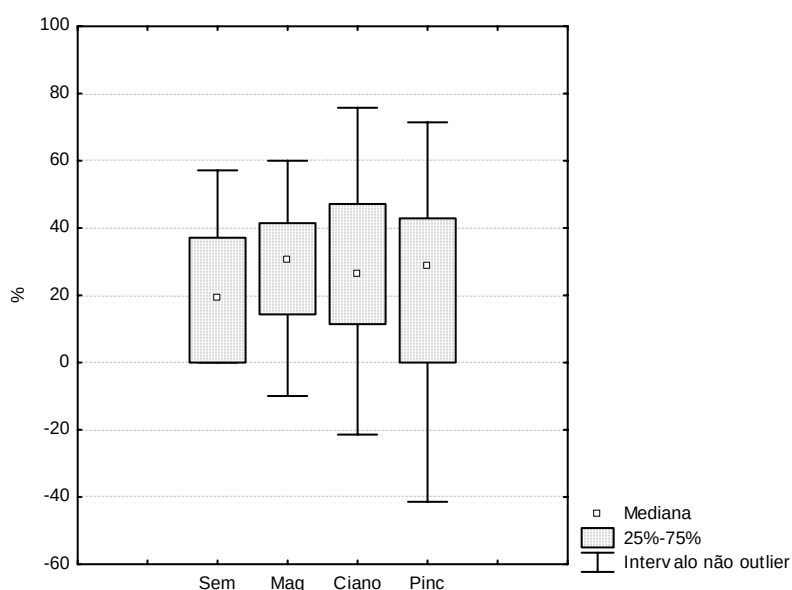


Figura 44. Caixa-com-bigodes dos valores da diferença entre *loci* menores maiores de 200 pb, da amplificação com Yfiler36 das amostras reveladas e não reveladas.

Comparando a diferença entre os *loci* menores e maiores que 200 pb, para os *kits* Yfiler™ (Yfiler36) e Identifiler™ (Ident34), usando todas as amostras e as duas réplicas, verifica-se que os valores da diferença são maiores no Yfiler™ do que no Identifiler™ (Figura 45), sendo que a mediana é de 27% (média de 25%) para o Yfiler™ e de apenas 8% para o Identifiler™ (média de 10%).

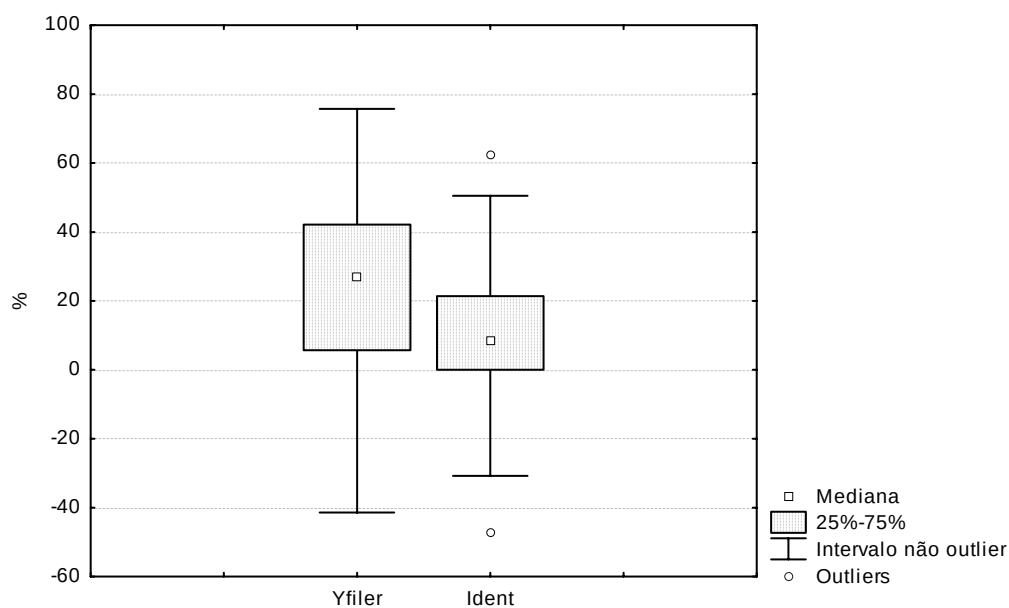


Figura 45. Caixa-com-bigodes dos valores da diferença entre os *loci* menores e maiores de 200 pb, de todas as amostras amplificadas com Ident34 e Yfiler36.

3.3.2.3 Métodos de revelação

A amplificação com Yfiler36 das amostras de ID reveladas e não reveladas mostrou, mais uma vez, que a revelação influencia a percentagem de alelos detectados (Figura 46).

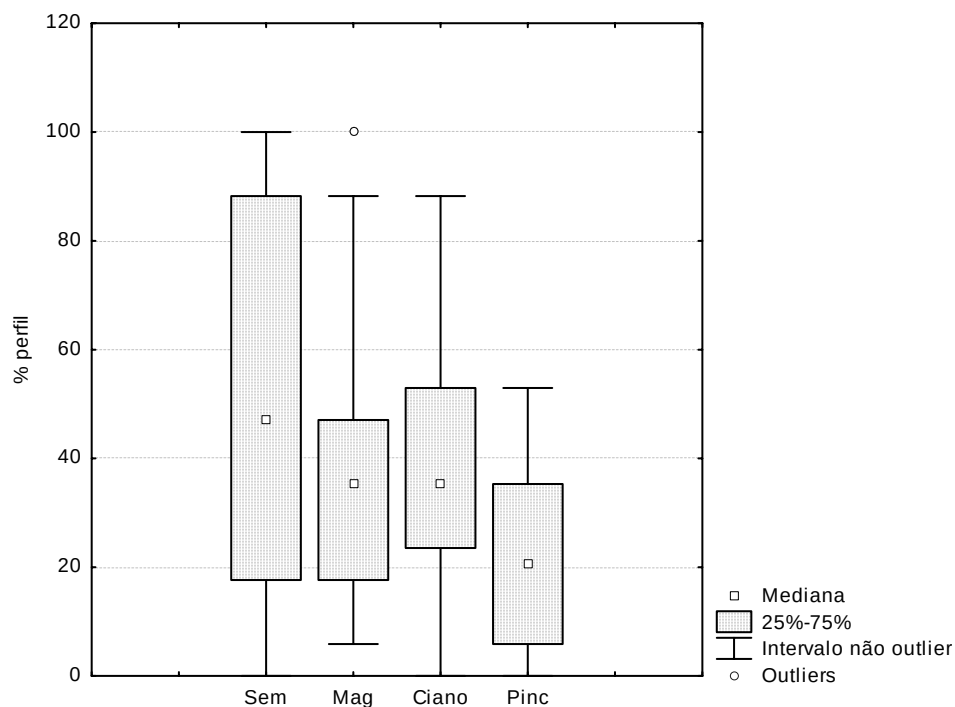


Figura 46. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso da análise com Yfiler36, das amostras reveladas e não reveladas.

A mediana dos valores é superior para as amostras não reveladas (47%) e inferior para as amostras reveladas com pincel (21%). As amostras reveladas com cianoacrilato e pó magnético proporcionaram uma mediana intermédia, de 35%.

O teste de Friedman mostrou que existem diferenças significativas entre os vários métodos ($p < 0,01$). Uma análise mais pormenorizada, com os testes de Wilcoxon e dos Sinais, permite evidenciar que as diferenças são sempre muito significativas quando se compara qualquer método com o pincel (Tabela 22). As diferenças entre qualquer dos dois outros métodos não se revelam estatisticamente significativas.

Tabela 22. Resultados da estatística do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os vários métodos de revelação.

	Mag - Sem	Ciano - Sem	Pinc - Sem	Ciano - Mag	Pinc - Mag	Pinc - Ciano
Z	-1,522 ^(a)	-1,675 ^(a)	-3,992 ^(a)	-,385 ^(a)	-3,031 ^(a)	-2,656 ^(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,128	,094	,000	,700	,002	,008

(a) Baseado nas ordens positivas.

É de notar ainda que, comparando a Tabela 22 com a Tabela 10, verifica-se que as diferenças entre os reveladores são mais significativas com Yfiler™ do que com o Identifiler™, pois os valores de p são mais baixos para o primeiro.

3.3.2.4 Alelos contaminantes

Com a amplificação a 30 ciclos, em 5 amostras foi detectado 1 alelo contaminante, a amostra Ciano_36 com 4 contaminantes e a Pinc_52 com 3 contaminantes. Comparando com o Ident28 verifica-se que foram detectados mais alelos contaminantes com Yfiler30.

O aumento do número de ciclos para 36 leva a que o nível de contaminação aumente. Para estas condições, o número de alelos contaminantes por amostra está representado na Figura 47. Os resultados mostram um nível de contaminação baixo, sendo que a média é de 0,37 alelos contaminantes por amostra. O máximo de alelos contaminantes detectados foi 5 e apenas verificado numa amostra, mas nas duas réplicas.

Não existem diferenças significativas entre as amostras não reveladas e as reveladas em termos de alelos contaminantes por amostra ($p > 0,05$).

Comparando Yfiler36 com Ident34, a quantidade de contaminantes detectados com Yfiler36 é significativamente inferior à do Ident34 ($p < 0,01$). A Tabela 23 mostra que a soma das ordens positivas é muito superior à soma das ordens negativas, significando que fazendo a subtração dos resultados obtidos entre Ident34 e Yfiler36, os valores encontrados são maioritariamente positivos, sugerindo que as contaminações são mais elevadas com Ident34 (o que também se verifica comparando a Figura 47 com a Figura 31).

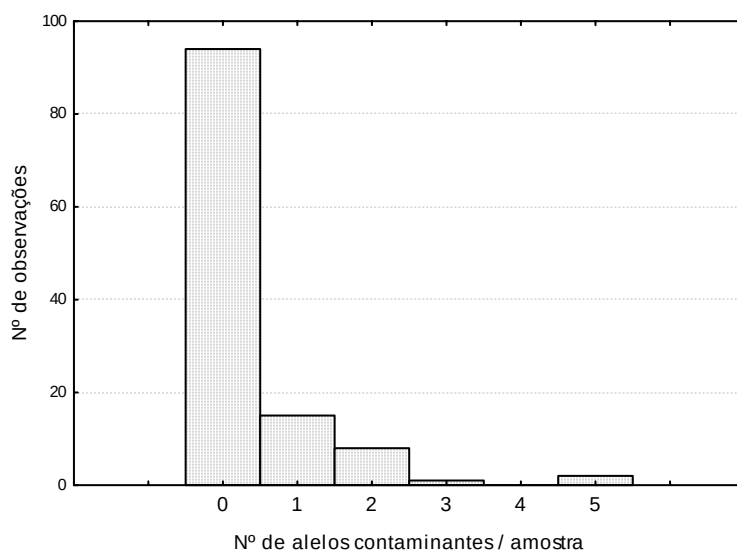


Figura 47. Histograma da frequência do número de alelos contaminantes por amostra, da análise com Yfiler36. Tem em consideração todas as amostras e as duas réplicas feitas (N=120).

Tabela 23. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre Ident34 e Yfiler36.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ident34 - Yfiler36	Negative Ranks	11 ^(a)	31,05	341,50
	Positive Ranks	69 ^(b)	42,01	2898,50
	Ties	40 ^(c)		
	Total	120		

(a) Ident34 < Yfiler36; (b) Ident34 > Yfiler36; (c) Ident34 = Yfiler36

3.3.3 MiniSTR

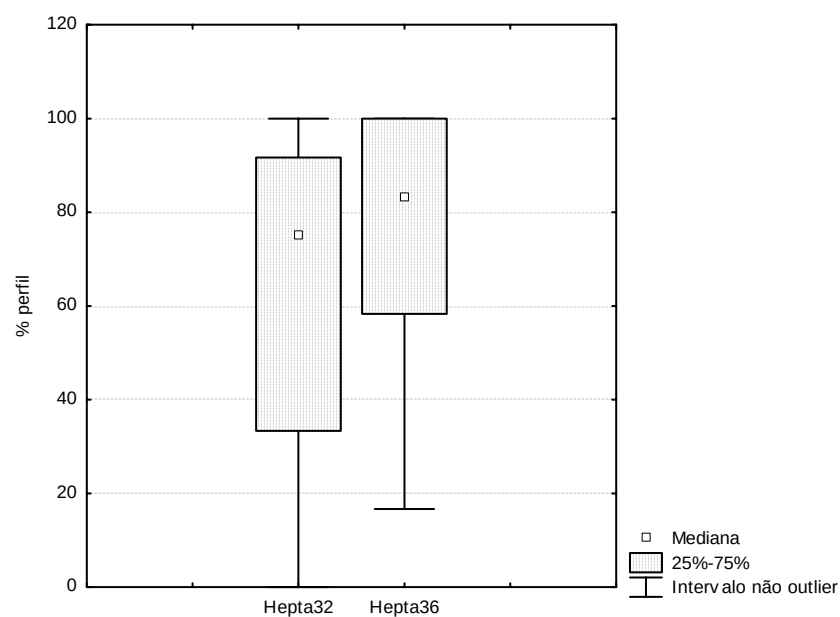


Figura 48. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso com o heptaplex a 32 e 36 ciclos.

Comparando os resultados obtidos com o heptaplex a 32 e 36 ciclos, em termos de percentagem de alelos detectados, o número de ciclos mais elevado permitiu detectar um maior número de alelos (Figura 48). Contudo, a diferença não é muito acentuada, tendo em consideração a mediana dos valores.

Comparando os resultados obtidos com o triplex, já se verifica uma diferença mais acentuada entre a amplificação a 32 e a 36 ciclos (Figura 49). A 36 ciclos a mediana encontra-se nos 100% e a 32 ciclos nos 35%. É também visível que o sucesso com 32 ciclos foi mais evidente com o heptaplex. Contudo, aumentando para 36 ciclos, com o triplex obteve-se maior sucesso do que com o heptaplex.

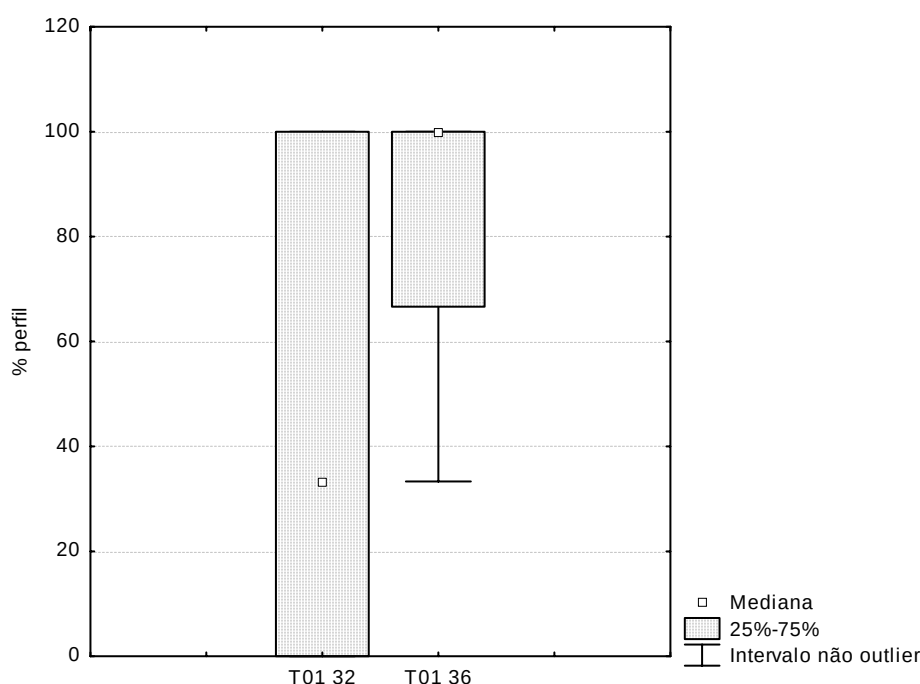


Figura 49. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso com o triplex a 32 e 36 ciclos.

Comparando os resultados obtidos com os miniSTR36 com os obtidos com Iden34, observa-se, através da Figura 50, que com os miniSTR obteve-se um sucesso superior ao Identifiler™ (a mediana é aproximadamente 20% superior), inclusive em relação aos *loci* do Identifiler™ menores que 200 pb (a mediana é 12% superior). Essas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

O teste de Wilcoxon mostra que das 60 amostras analisadas com os dois métodos, os miniSTR permitem melhores resultados em 42 amostras e resultados inferiores em apenas 7 amostras (Tabela 24).

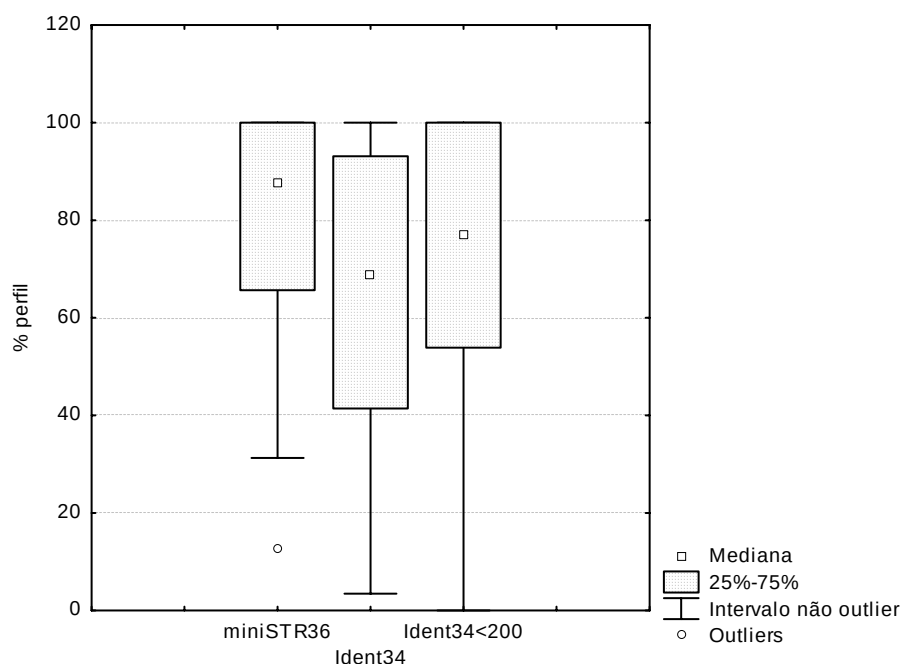


Figura 50. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso dos miniSTR36, Ident34 e *loci* menores que 200 pb de Ident34.

Tabela 24. Resultados das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação do sucesso entre os miniSTR (36 ciclos) e STR (Ident34).

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
miniSTR36 - Ident34	Negative Ranks	7 ^(a)	14,07	98,50
	Positive Ranks	42 ^(b)	26,82	1126,50
	Ties	11 ^(c)		
	Total	60		

(a) miniSTR36 < Ident34; (b) miniSTR36 > Ident34; (c) miniSTR36 = Ident34

Comparando, mais uma vez, os vários reveladores, verifica-se que os resultados são semelhantes aos obtidos com Identifiler™ e Yfiler™, em que as amostras não reveladas e as reveladas com cianoacrilato permitem obter as maiores percentagens de perfil, com as medianas mais elevadas, enquanto que com a revelação com pincel obteve-se os quartis mais baixos (Figura 51).

Em relação a alelos contaminantes, existem diferenças muito significativas entre a amplificação a 32 e 36 ciclos ($p < 0,01$) para o heptaplex. Para o triplex as diferenças são significativas, mas menos significativas ($p = 0,020$). Para os dois multiplex, a 36 ciclos, observa-se um maior número de contaminantes por amostra (Tabela 25), pois a soma das ordens positivas é muito superior à soma das ordens negativas. Não se observaram diferenças significativas entre reveladores.

Em termos de percentagem de alelos contaminantes no total de alelos detectados, verifica-se, mais uma vez, que aumentando o número de ciclos o valor aumenta substancialmente. Com 32 ciclos, obteve-se 7% e 3,5% para o T01 e heptaplex, respectivamente; enquanto com

36 ciclos, o valor aumenta para 14,4% e 12,7%, respectivamente para T01 e heptaplex. Comparando as amostras não reveladas com as amostras reveladas a 36 ciclos, verifica-se que, nas não reveladas, obtém-se uma percentagem relativa de alelos contaminantes mais baixa que nas reveladas. Com o T01 obtém-se uma média de 4,5% nas não reveladas e 19,6%, 17,7% e 15,6%, respectivamente para as reveladas com pó magnético, cianoacrilato e pincel. Com o heptaplex obtém-se uma média de 9,6% para as amostras não reveladas e 15,5%, 9,1% e 15,6%, respectivamente para as reveladas com pó magnético, cianoacrilato e pincel. Considerando os miniSTR de uma forma geral, obtém-se 8,4% de alelos contaminantes para as amostras não reveladas e 17,5%, 12,2% e 16,5%, respectivamente para as reveladas com pó magnético, cianoacrilato e pincel.

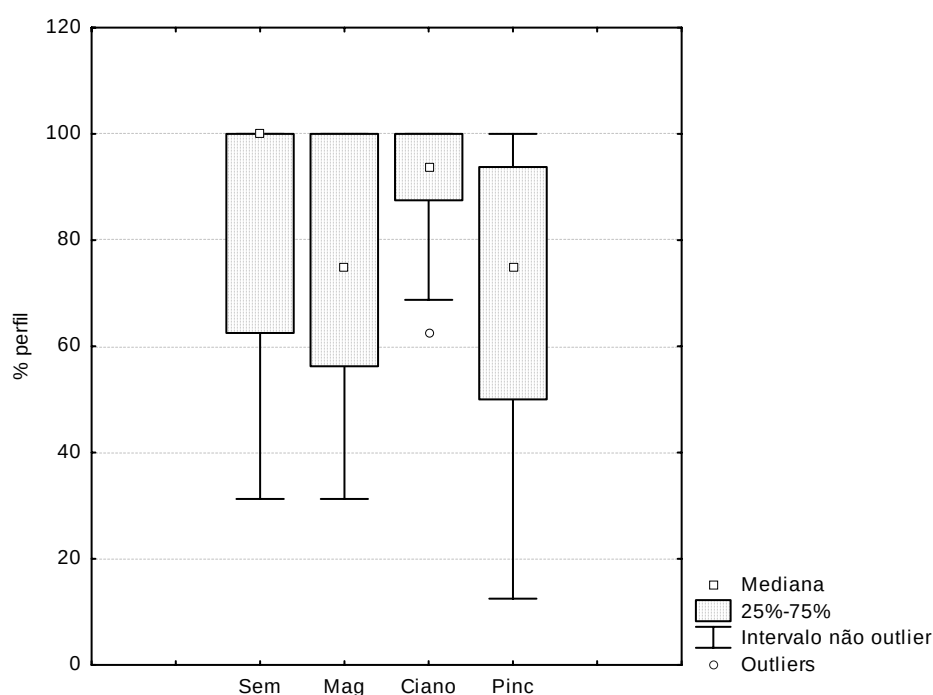


Figura 51. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com miniSTR36 nas amostras reveladas e não reveladas.

Comparando estes valores com o Identifiler™ denota-se que, usando os miniSTR, detecta-se um maior número de alelos contaminantes, considerando condições LCN para ambos.

De referir, também, que nos controlos negativos na amplificação, a 36 ciclos, dos miniSTR, detectou-se em geral maior número de alelos contaminantes esporádicos que com qualquer outro método usado.

Em relação a *stutters*, apesar da baixa amostragem, pode-se dizer que os miniSTR revelam o mesmo comportamento que os STR. Contudo, mesmo a 32 ciclos, foram verificados *stutters* com tamanho superior a 15%. Relativamente ao triplex, o D22S1045 foi o único no qual se detectaram *stutters* a 32 ciclos, sendo que o mais elevado apresenta 45% da altura do alelo

correspondente. Para o heptaplex, a 32 ciclos apenas no D16S539 e D7S820 foram detectados *stutters*, mas em poucas amostras, com o máximo de 35% observado.

Tabela 25. Resultado das ordens do teste de Wilcoxon para a comparação entre o número de contaminantes detectados na amplificação a 32 e 36 ciclos com o T01 e heptaplex.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
T01_36 - T01_32	Negative Ranks	5 ^(a)	19,00	95,00
	Positive Ranks	22 ^(b)	12,86	283,00
	Ties	33 ^(c)		
	Total	60		
Hepta36 - Hepta32	Negative Ranks	7 ^(d)	7,50	52,50
	Positive Ranks	29 ^(e)	21,16	613,50
	Ties	24 ^(f)		
	Total	60		

(a) T01_36 < T01_32; (b) T01_36 > T01_32; (c) T01_36 = T01_32; (d) Hepta36 < Hepta32; (e) Hepta36 > Hepta32; (f) Hepta36 = Hepta32

Com 36 ciclos, os três *loci* do triplex mostraram *stutters*, sendo que o D22 evidenciou maior quantidade e os maiores *stutters*, sendo o mais elevado com 54%. Neste *locus*, raras vezes, foi detectado, o que se pode considerar, *stutters* posteriores. O D14S1434 e D10S1248 também evidenciaram *stutters* elevados (mais elevado dos dois com 33%). No heptaplex, com 36 ciclos, um maior número de *loci* evidenciaram *stutters*, alguns também com elevado tamanho. O mais elevado foi detectado no *locus* FGA, com 45%.

3.3.4 WGA

A amplificação do genoma total foi efectuada apenas nas ID não reveladas (N=15). A Figura 52 evidencia que o sucesso obtido com este método não foi significativamente superior à amplificação apenas com Ident28, sem a prévia amplificação do genoma total (comparando as medianas).

Fazendo uma análise estatística com o teste-*t* para amostras emparelhadas (Tabela 26), as diferenças entre WGA e Ident28 não são significativas. Pelo contrário, as diferenças para o Ident34 mostram-se muito significativas.

Observe-se que com a WGA não se conseguiram melhores resultados do que com Ident28. Parece mesmo ocorrer uma ligeira diminuição dos resultados em quase todas as amostras; inclusive, nas 2 amostras em que se conseguiu obter um perfil completo com Ident28; com WGA conseguiu-se, numa 93%, e na outra 38%, do perfil. Nestes resultados observou-se ainda a presença de 2 amostras com 1 alelo contaminante e uma amostra com 2 alelos contaminantes.

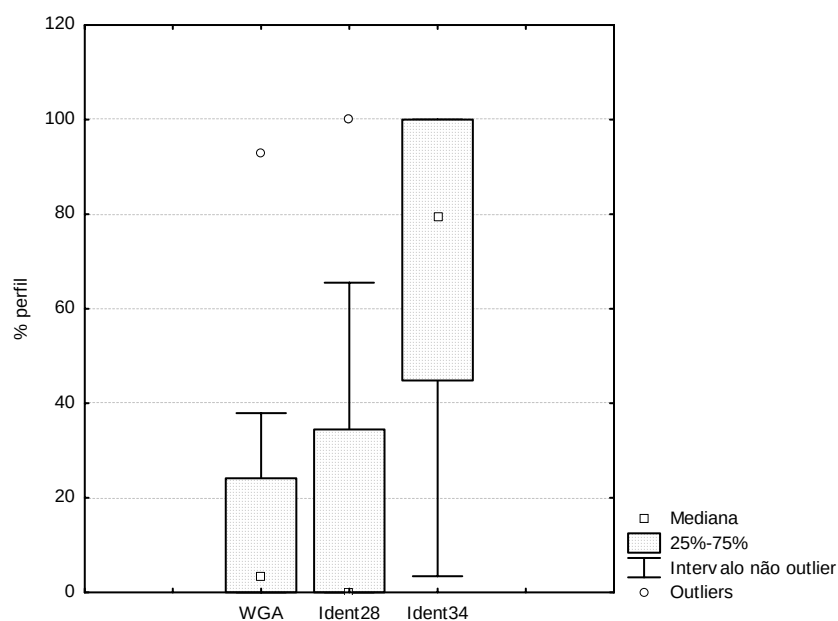


Figura 52. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com WGA, Ident28 e Ident34.

Tabela 26. Teste-t para amostras emparelhadas, para os pares WGA-Ident28 e WGA-Ident34.

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	WGA - Ident28	-8,27586	19,41037	5,01174	-19,02497	2,47324	-1,651	14	,121
Pair 2	WGA - Ident34	-53,79310	27,33258	7,05724	-68,92938	-38,65683	-7,622	14	,000

A Figura 53 mostra a relação para cada amostra da percentagem de sucesso em relação a cada método. No geral, as amostras deram melhores resultados com Ident28 do que com WGA, excepto nalguns casos, que não deram quaisquer resultados com Ident28, tendo sido possível detectar 1 ou 2 alelos com WGA. Comparando com Ident34, nenhuma amostra deu resultados inferiores com este método do que com os outros dois.

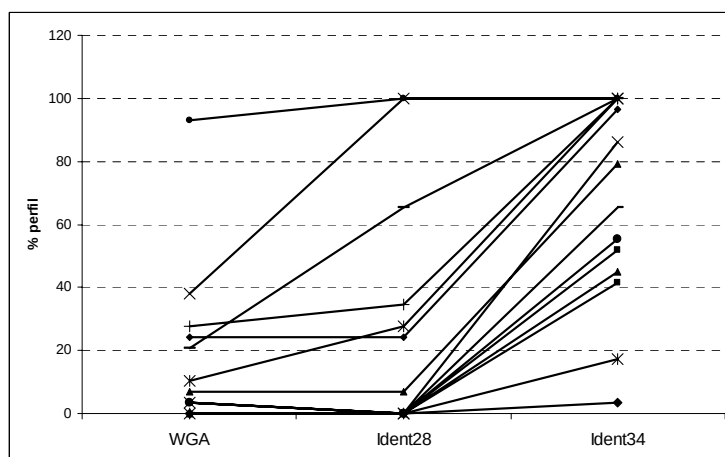


Figura 53. Gráfico demonstrativo do sucesso de cada amostra com WGA, Ident28 e Ident34.

3.3.5 Nested-PCR

O teste-*t* para amostras emparelhadas mostra que não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos com *nested*-PCR e Ident34 ($p>0,05$) em relação ao sucesso da detecção de alelos.

Contudo, usando este protocolo de *nested*-PCR os picos aparecem muitas vezes dobrados e bastante elevados, indicando que o número de ciclos do *nested*-PCR aplicado é demasiado e que deve ser, por esta razão, reduzido em trabalhos futuros.

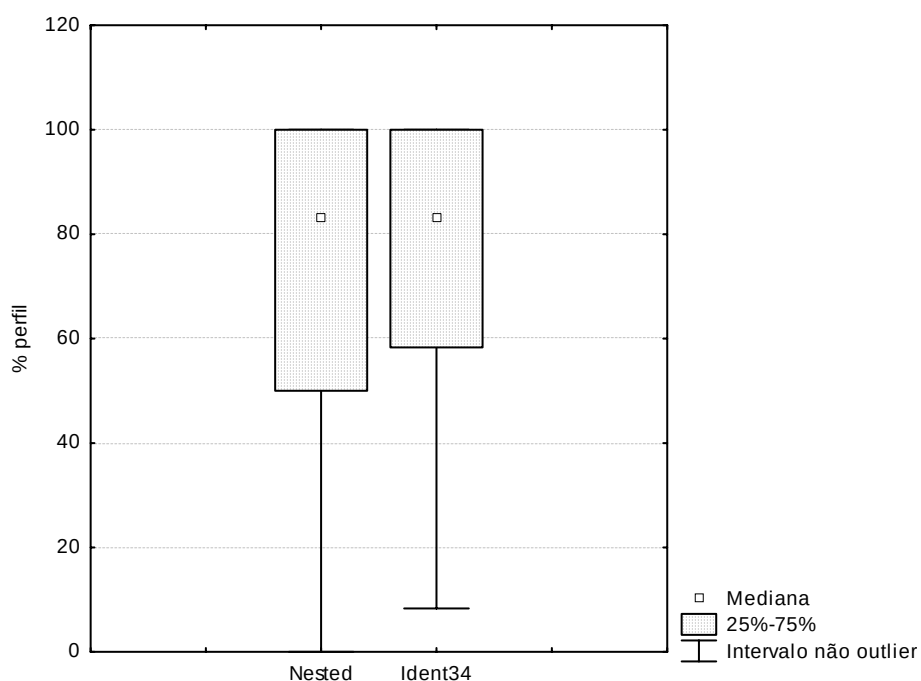


Figura 54. Caixa-com-bigodes dos valores de sucesso obtidos com *nested*-PCR e Ident34, para os *loci* comuns nos dois métodos.

Em termos de contaminantes ou produtos inespecíficos, com *nested*-PCR, detectaram-se 6 alelos contaminantes no total das amostras, enquanto que com Ident34, para os mesmos *loci* e amostras, detectaram-se 7 alelos contaminantes, reflectindo uma diferença não significativa.

4

Discussão

Na rotina da maior parte dos laboratórios forenses, em situações em que é necessário analisar amostras muito degradadas ou com uma quantidade exígua de DNA, a metodologia mais usada é a sequenciação das regiões hipervariáveis HVI e HVII do mtDNA. Como cada célula humana contém inúmeras cópias deste DNA (em média 500), mesmo com um número reduzido de células é possível extrair mtDNA suficiente para proceder à sua análise. Além disso, a membrana dupla das mitocôndrias e a forma circular do DNA, protege-o da degradação.

Apesar destas características, o mtDNA tem a grande desvantagem de ser muito pouco informativo, não permitindo efectuar a identificação individual de uma forma eficaz, pois os membros de uma mesma família, aparentados pela linha materna, possuem informação genética mitocondrial idêntica. É, por isso, vantajoso proceder à análise do DNA nuclear (particularmente dos autossomas), pois este, como tem hereditariedade mendeliana, e o seu poder de discriminação é mais elevado, permitindo efectuar a identificação individual quando analisados um número adequado de marcadores genéticos.

A grande dificuldade da análise de DNA nuclear reside no facto de apenas existir uma cópia de DNA nuclear por célula (cópia diplóide ou haplóide, respectivamente para células somáticas ou sexuais). Em caso de amostras LCN, em que o número de células é extremamente baixo, a quantidade de DNA nuclear é também muito baixa. Nestes casos, apenas metodologias muito sensíveis permitem detectá-lo.

O aumento do número de ciclos da PCR tem sido, sem dúvida, a abordagem mais usada para incrementar a sensibilidade do método. Esta inovação no método de análise normal, permite que o DNA da amostra seja multiplicado mais vezes do que usando o número de ciclos normais, de modo a possibilitar a detecção destas moléculas.

A aplicação desta técnica à análise genética de ID tem provado que é possível efectuar a análise da fracção celular destes vestígios. A sua aplicação poderá ser uma mais valia em

situações em que os métodos lofoscópicos tradicionais falham ou, alternativamente, como complemento destes.

Neste trabalho prático estudaram-se vários métodos de análise de DNA nuclear aplicados ao estudo de DNA LCN, mais especificamente a ID experimentais. Os estudos efectuados tiveram como base fundamental o aumento do número de ciclos, como método para aumentar a sensibilidade. Neste sentido, tentou-se alargar, de uma forma fiável, este conceito a outros marcadores de DNA nuclear, que não só aos STR autossómicos já amplamente mencionados na bibliografia. Assim, a análise do cromossoma Y, através de Y-STR (Yfiler™) e, também, dos miniSTR autossómicos, constituíram uma parte fundamental deste trabalho. Testou-se, também, a aplicação da amplificação total do genoma e *nested-PCR*, como alternativas ao aumento do número de ciclos.

4.1 Testes de sensibilidade

Para a escolha do número de ciclos mais apropriado à análise de amostras LCN, não se efectuou nenhum estudo exaustivo, mas apenas um teste de sensibilidade, que permitiu verificar qual o valor mais apropriado para a detecção de quantidades muito baixas de DNA.

Com base nos resultados obtidos e, também, na literatura disponível (Gill *et al.*, 2000) ficou definido que na amplificação com o *kit* Identifiler™, 34 ciclos eram necessários para se conseguir detectar quantidades ínfimas de DNA. Este número de ciclos parece possibilitar um bom compromisso entre qualidade e quantidade de perfil obtido (Figura 15).

No caso do Yfiler™, para análise de STR do cromossoma Y, não foi encontrada bibliografia com a aplicação deste *kit* e destes marcadores a amostras LCN. A análise dos resultados, evidencia que 36 é o número de ciclos ajustado a amostras LCN (Figura 16). Da mesma forma, com os miniSTR, a amplificação a 36 ciclos parece ajustada para amostras LCN e 32 ciclos para amostras com quantidade rotineira de DNA (Figura 21 e Figura 22).

Estes valores foram estabelecidos tendo em consideração o número de alelos detectados em cada concentração de DNA e com cada número de ciclos usados; mas, também, tendo em mente a altura dos picos. No entanto, outros estudos poderiam ser efectuados, caso se dispusesse de mais tempo para a excussão desse trabalho. Todavia, tendo em consideração os resultados obtidos, conclui-se que estas condições reflectem, em geral, as condições ideais para este tipo de amostras.

Em relação aos miniSTR, suspeita-se que a necessidade de um número de ciclos mais elevado que o indicado para o *kit* Identifiler™, é devida à baixa concentração de *primers* recomendado pelo *kit* usado na amplificação destes marcadores. Verificou-se, também, que comparando a amplificação dos miniSTR com o Qiagen® Multiplex PCR Kit, com a amplificação usando os componentes da PCR separadamente (*primers*, dNTPs, MgCl₂, Taq DNA polimerase, tampão da Taq DNA polimerase, etc), o *kit* conduz à produção de picos mais baixos; todavia, mais equilibrados e definidos, justificando-se a sua utilização.

Apesar das diferenças de sensibilidade entre os dois multiplex de miniSTR serem algo significativas (Figura 21e Figura 22), não se optou por se usar um número de ciclos diferente na sua amplificação. A razão pela qual se fez esta opção residiu no facto de não se ter conseguido otimizar o heptaplex de uma forma mais perfeita (talvez pelas características de alguns *primers*), pois baixando o número de ciclos para permitir uma maior equivalência de sensibilidade, alguns dos sistemas poderiam não amplificar. Em face do exposto, optou-se por manter o número de ciclos mais elevado, aumentando a sensibilidade de alguns sistemas, mas garantindo resultados para todos eles.

Em relação ao heptaplex de miniSTR, observou-se que existe concordância entre os genótipos obtidos e os conseguidos usando o Identifiler™, tanto em relação ao DNA 9947A, como para outras amostras analisadas. Neste trabalho não se procedeu a estudos exaustivos de concordância de resultados entre os genótipos obtidos para os dois *kits*, porque, para além de não ser uma experiência fundamental para atingir os objectivos propostos para este trabalho, essa abordagem já tinha sido efectuada, em parte, pelos autores que desenvolveram estes *primers* (Tabela 2). No entanto, é de realçar que diferentes *primers* podem levar ao aparecimento de alelos nulos, devido a mutações no seu local de ligação. Estes acontecimentos são raros e não ocorrem exclusivamente com os *primers* para miniSTR, mas também podem ocorrer com os diferentes *kits* comerciais disponíveis no mercado. É, por isso, necessário ter este facto em consideração, não só quando se usam *primers* específicos para miniSTR, com o objectivo de efectuar a comparação dos resultados com os dos *kits* já existentes como, também, quando se pretende comparar perfis obtidos com diferentes *kits* de amplificação que, em geral, usam *primers* diferentes.

Verifica-se que tanto o heptaplex como o T01 apresentam fragmentos de amplificação inferiores a 200 pb (Figura 18 e Figura 19). No caso do D18S51 do heptaplex, apesar de se ter conseguido reduzir 127 pb em relação ao Identifiler™, os *primers* usados levam a que os alelos maiores ultrapassem os 200 pb de tamanho. Também o painel superior do FGA apresenta alelos de tamanho considerável. No entanto, em ambos os sistemas, observa-se que os alelos em questão são extremamente raros para a população portuguesa (Pinheiro *et al.*, 2005). Em relação à distribuição dos sistemas, o D16S539, o D7S820, o CSF1PO e o D18S51, apesar dos alelos terminais se encontrarem relativamente próximos uns dos outros, na população estudada (e mesmo noutras) estes alelos também são extremamente raros (Pinheiro *et al.*, 2005).

Em relação à WGA, o manual do *kit* usado (REPLI-g) recomenda que se deve amplificar no mínimo 1 ng de DNA e que este deve ser de elevado peso molecular. Contudo, a amplificação do DNA 9947A com WGA, permitiu detectar alelos em quantidades de DNA muito baixas, mesmo com 10 pg (Figura 23). Estes resultados vêm confirmar os obtidos por Schneider *et al.* (2004), Hanson & Ballantyne (2005) e Ballantyne *et al.* (2007), que mostram que usando quantidades igualmente baixas, também obtêm o aumento do sucesso na detecção de alelos, quando comparado com análises sem WGA. Com 10 pg de DNA, a WGA detectou maior percentagem de alelos que o Ident34. Esta constatação pode ser justificada pelo baixo

número de réplicas da amplificação, em que o valor obtido com Ident34 seja mais baixo que o real.

4.2 Extracção de DNA

O método de extracção usado em amostras LCN demonstrou ser um factor relevante, que marca a diferença entre conseguir resultados fiáveis, resultados não fiáveis ou não se obter quaisquer resultados.

Foram, por isso, testados vários métodos de extracção, já usados por vários autores (Sinclair & McKechnie, 2000; van Oorschot *et al.*, 2003; Schiffner *et al.*, 2005; Castella *et al.*, 2006). Neste estudo, a quantidade de DNA extraída foi tida em consideração, mas não era o factor principal que se pretendia testar. A questão da quantidade e qualidade de DNA extraído em cada método estão bem debatidas na bibliografia. Na verdade, o nível de contaminações era o maior motivo de preocupação. Pretendia-se, por isso, um método que, para além de permitir recuperar o máximo de DNA do vestígio, não introduzisse contaminação nas amostras, tendo em consideração a análise extremamente sensível que se estava a realizar.

Os resultados obtidos com os vários métodos de extracção testados permitem perceber que, ao contrário do observado por Schiffner *et al.* (2005), o seu método de extracção, nas condições testadas, não era o melhor, em termos de quantidade de DNA extraído (Figura 24); no entanto, constatou-se que, em termos de contaminação, é um método muito eficaz. Na verdade, foram os métodos mais complexos que permitiram recuperar as maiores quantidades de DNA. O método de QIAamp/QIAshredder provou ser um bom método de extracção, corroborando os resultados de Sinclair & McKechnie (2000) e Castella *et al.* (2006). A par deste método, a extracção orgânica também permitiu obter bons resultados, em termos de quantidade de DNA recuperado (Figura 24).

Sublinha-se ainda que a quantidade de DNA das amostras usadas para testar os métodos de extracção é significativamente baixa e que, por isso, o método de quantificação, para estas quantidades, não é 100% reprodutível, podendo o erro ser considerável. Por isso, estes resultados de quantificação não devem ser tidos como valores absolutos.

A par da grande quantidade de DNA extraído pelos dois métodos referidos, verificou-se que o nível de contaminação era preocupante, quando se analisaram controlos negativos de extracção, e aumentando o número de ciclos da PCR (Ident34) (Figura 25). Acresce que com uma análise normal (Ident28) estes alelos contaminantes não foram detectados. Este facto poderá advir das inadequadas condições de trabalho e, também, pelo facto dos métodos de extracção comerciais, não se destinarem a condições de amplificação tão sensíveis, como poderá ser o caso do QIAshredder/QIAamp (Butler, 2006).

Em face do exposto, decidiu-se usar neste trabalho o método de extracção PC; pois como é o operador que prepara algumas soluções, a contaminação destas pode ser mais facilmente controlada e eliminada. Além disso, sempre que algum reagente estiver contaminado, há a

possibilidade de o renovar, sem a necessidade de comprar um novo *kit* completo de extracção.

Tendo em consideração os pontos visados, para a execução deste trabalho, foi necessário eliminar os factores de contaminação e, por isso, implementar algumas alterações no protocolo de extracção, nomeadamente, no protocolo de preparação do tampão de extracção. Estas alterações são as explanadas no ponto 2.2.5 do capítulo Material e Métodos e, entre outras, as que mais contribuíram para a melhoria dos resultados obtidos foram:

1. Preparar o tampão de extracção de forma a permitir uma melhor esterilização. O tampão de extracção depois de estar totalmente preparado, não pode ser autoclavado por ter SDS na sua composição; além disso, também não pode ser esterilizado por luz UV devido à degradação do EDTA (Chitra *et al.*, 2004). A filtração que se usa no quotidiano não permite uma esterilização ajustada às condições LCN, pelo que se teve de proceder de acordo com o descrito. Além disso, este tampão foi alíquotado e, uma vez aberto o eppendorf, mesmo que não se usasse todo, o restante era descartado.
2. A remoção da zaragatoa da amostra foi efectuada com a coluna QIAshredder, ao contrário do método de “los dos viales”. Verificou-se que este último método introduz contaminação, o que é espectável, uma vez que o eppendorf com a amostra é colocado dentro de outro limpo e o DNA que estiver à volta do primeiro, é introduzido no segundo.
3. Proceder apenas a extracções quando apenas o operador se encontrava no laboratório.
4. Efectuar as extracções em pequenos grupos de amostras para evitar a contaminação cruzada e, entre cada grupo de extracção, irradiar as bancadas com luz UV.
5. Todos os materiais devem ser irradiados com luz UV, mesmo os que têm garantia de esterilidade do fabricante.
6. Todos os materiais usados são exclusivos para estas amostras.

Tendo em consideração estas regras, a quantidade de alelos contaminantes detectados nos controlos negativos de extracção diminuiu consideravelmente em condições de grande sensibilidade, tendo sido apenas registadas algumas contaminações esporádicas negligenciáveis (Tabela 5). Este protocolo permite, assim, recuperar DNA com elevado grau de purificação e com nível de contaminação muito reduzido.

Durante a realização deste trabalho, o passo crítico de análise de amostras LCN, como as ID, foi a extracção do DNA. É neste passo que é necessário manipular mais vezes as amostras. Contudo, alguns passos tiveram que ser efectuados em locais onde não existiam as melhores condições para manipular este tipo de amostras. Por exemplo, a manipulação do fenol/clorofórmio-álcool isoamílico deve ser feita numa *hotte*, que no laboratório em questão é partilhada.

Apesar de se ter apenas referido os cuidados extremos que se deve ter durante a extracção das amostras, também na amplificação se deve ter em consideração a possibilidade de contaminação. Porém, no caso do laboratório onde se efectuou este trabalho, este passo era feito em boas condições, pois o uso de câmaras individuais com luz UV, para preparação das reacções, permitia descontaminar todo o material usado e, também, ter uma atmosfera

estéril durante a preparação da reacção da PCR. Daí que a nível de contaminação, esta foi geralmente superior nos controlos negativos de extracção do que nos de amplificação.

4.3 Análise genética de impressões digitais

Um dos objectivos dos estudos encetados com ID experimentais era permitir comparar vários métodos de análise de STR (aumento de ciclos, WGA e *nested*-PCR) e, também, diferentes marcadores (STR, Y-STR e miniSTR), para a análise genética de ID; e não tanto saber se era possível analisar as poucas células destes vestígios, pois tal facto já está mais que provado.

Para poder comparar os vários métodos era essencial ter várias amostras com: DNA suficiente que permitisse a aplicação dos vários testes em cada uma delas e, características genéticas das ID. Uma das formas mais usuais de conseguir estes objectivos é usar DNA padrão. Contudo, este apenas permite simular a baixa quantidade de DNA presente nas ID e não outras características como, por exemplo, a degradação do DNA por apoptose e, também, a presença de alguns inibidores da reacção que possam existir na pele, entre outros. Neste sentido, o ideal é trabalhar com DNA de ID.

É um facto que uma só ID não proporciona DNA suficiente para aplicar a bateria de testes que se pretendia. Para além disso, usar ID para uns testes e outras ID diferentes para outros testes, não garantia que as diferenças dos resultados apenas se devessem ao teste aplicado. Assim, a alternativa que se implementou foi juntar 3 ID numa única extracção e eluir com maior volume, aproximadamente o triplo do que se usaria para uma única ID (20 a 25 µl), permitindo ter amostras com todas as características genéticas das ID e, também, ter volume de DNA suficiente para aplicar todos os testes genéticos que se pretendia.

Por outro lado, outro dos objectivos era conseguir determinar se ocorria degradação significativa do material genético com o decorrer do tempo, para condições semelhantes às que podem ocorrer num edifício mais ou menos isolado, que pode ser o palco de um evento criminoso. Para isso, havia que tentar padronizar, o mais possível, as condições fisiológicas no momento da recolha da ID, para não haver grandes variações entre os vários dias, senão apenas o tempo de exposição às condições ambientais. Pensou-se então recolher todas as ID no mesmo momento do dia, e em que o trajecto do indivíduo, algumas horas antes da recolha, fosse sempre idêntico, para evitar variações provocadas por contactos anteriores, por transferência transversal de DNA, por possíveis alterações fisiológicas provocadas pela actividade física do dia-a-dia, entre outras. Desta forma, parece que a altura ideal para efectuar a colheita é de manhã, logo depois de acordar, tendo o indivíduo lavado as mãos antes de se deitar, limitando a possibilidade de transferência secundária e adventícia. Considera-se ainda que, em princípio, o seu comportamento e as condições fisiológicas durante o sono são semelhantes para os diferentes dias, não se descurando a hipótese de assim não ser.

O tempo de toque usado na experiência (3 segundos) foi um factor considerado não essencial, pois foi verificado que as células se perdem no primeiro contacto e que o tempo de toque não tem influência (Kisilevsky & Wickenheiser (1999)). Contudo, foi mantido sempre o mesmo tempo para eliminar mais um factor de variação.

A bibliografia disponível, relativa ao tema em questão, reporta quantidades de DNA abaixo dos 200 pg para uma ID (Ladd *et al.*, 1999; Alessandrini *et al.*, 2003). Neste estudo obteve-se um largo espectro de quantidades, tendo de se evidenciar que os valores obtidos se referem a concentrações. Observa-se, contudo, que em algumas amostras, a concentração obtida é extremamente elevada, superior, em alguns casos, a 500 pg/ μ l (Tabela 6). Ora estas concentrações não são comuns, principalmente tendo em consideração o elevado volume de eluição (67 μ l). Pode-se, portanto, deduzir que o método de recolha e extracção desenvolvido é muito eficaz. Por outro lado, também se pode supor que, pelo facto das ID terem sido colhidas após o individuo se levantar, poderá ter ocorrido uma situação ideal de produção de suor e/ou descamação da pele durante a noite, que poderá ter provocado a libertação de mais células por contacto no momento da colheita.

No entanto, parece que os valores das concentrações obtidos podem não ser fiáveis, pois tem-se verificado que este método de quantificação, no laboratório em questão, proporciona, em geral, valores superiores aos reais. Também se verifica que, para quantidades baixas de DNA, o erro na quantificação é elevado. Todavia, não houve a possibilidade de fazer réplicas da quantificação, para determinar com rigor estas possíveis variações. Estes valores devem, por isso, ser vistos como não absolutos.

Fazendo a comparação das concentrações obtidas, com o sucesso na detecção de alelos com Ident28, para cada dia e revelador (Figura 27), observa-se que em alguns casos não existe qualquer relação entre as duas. Considerando que foram usados 5 μ l de DNA na amplificação, pode-se considerar que 40 pg/ μ l será o limite inferior, abaixo do qual poderá não haver perfil completo a 28 ciclos (pois no total são 200 pg de DNA que se está a amplificar e foi verificado (Figura 15) que com esta quantidade e condições de amplificação é possível obter um perfil fiável). No entanto, observa-se que em algumas situações, mesmo com concentrações acima de 50 pg/ μ l, não se obtém perfil completo e, nalguns casos, com percentagem de perfil abaixo dos 20%. Observa-se, também, que a concentração mínima que permite obter o perfil completo (117 pg/ μ l) é bastante superior a 40pg/ μ l. Estes resultados fazem suspeitar que as concentrações de DNA obtidas poderão não corresponder à realidade.

O aumento do número de ciclos é, sem dúvida, a metodologia mais usada para conseguir aumentar a sensibilidade, de forma a detectar uma quantidade ínfima de DNA nuclear. Contudo, a detecção de alguns artefactos, como *allele dropin*, *allele dropout* e desequilíbrio heterozigótico, torna os electroforetogramas difíceis de interpretar. Neste sentido, o uso de protocolos diferentes tem vindo a ser testado. Entre eles a amplificação total do genoma e o *nested-PCR*.

Para a comparação das três metodologias testadas para aumentar a sensibilidade, foram analisadas as 15 ID não reveladas. Os resultados mostram, de uma forma resumida, que o aumento do número de ciclos continua a ser a melhor opção para a análise genética de ID.

O objectivo principal de aplicar a amplificação total do genoma a amostras LCN é o de permitir obter DNA suficiente para efectuar uma análise em condições normais, evitando os artefactos produzidos pelo aumento do número de ciclos da PCR. A amplificação de diluições sucessivas de DNA 9947A, com início a 100 pg até 10 pg, permite verificar que com o *kit* REPLI-g é possível a detecção de alelos, mesmo com pequenas quantidades de DNA, que não são observados na análise sem WGA (Figura 23). Contudo, o uso deste *kit* em amostras genéticas de ID, com quantidades igualmente baixas de DNA, mas em que o material genético se encontra parcialmente degradado, não permitiu a obtenção de resultados tão interessantes (Figura 52).

Efectivamente, das 15 amostras analisadas com WGA e depois com Ident28, detectou-se uma média de 15% dos alelos da amostra e uma mediana de 3,44, o que é muito baixo, quando comparado com uma mediana de 80% obtida com Ident34 (Figura 52). Comparando estes resultados com os obtidos apenas com a amplificação destas amostras com Ident28, isto é, sem pré-amplificação com REPLI-g, observa-se que os resultados são, no geral, idênticos, não havendo grandes diferenças em termos de sucesso na detecção de alelos (Figura 52). No entanto, Hanson & Ballantyne (2005), reportam melhores resultados quando utilizavam WGA do que analisando o DNA em condições normais, o que contradiz os resultados obtidos neste trabalho. Contudo, os autores apenas analisaram uma amostra, o que poderá ter sido a excepção à regra (pois como se verificou, em algumas amostras obtiveram-se melhores resultados com WGA que com apenas com Ident28). Além disso, não compararam os resultados com uma amplificação mais sensível (Ident34), pelo que não se pode concluir se a WGA proporcionaria melhores resultados do que o aumento do número de ciclos.

No entanto, parece que o método de extracção influencia os resultados obtidos com WGA. Foi verificado que a extracção PC é um dos métodos que traz mais desvantagens (Ballantyne *et al.*, 2007). A razão apontada para este facto é que este método não desnatura o DNA e a WGA necessita de DNA completamente desnaturado. Contudo, os mesmos autores observaram que um método de WGA com uma desnaturação química é muito eficiente (o que é o caso do REPLI-g), pelo que parece que neste trabalho o método de extracção não influenciou negativamente os resultados com WGA. No entanto, poderá colocar-se essa hipótese.

É de notar que a expectativa de se obterem melhores resultados não era grande, pois o manual de instruções deste *kit* recomenda uma quantidade de DNA molde de 1 ng e, também, que este seja de elevado peso molecular. No entanto, o DNA extraído de ID tem características exactamente contrárias ao recomendado; ou seja, pouca quantidade de DNA e de baixo peso molecular. Para além disso, outros estudos mostram que a WGA tem desvantagens, em termos de variação estocástica, em amostras LCN. Gill *et al.* (2005) fizeram a simulação do processo de amplificação de DNA com STR e verificam que a

variação estocástica é principalmente um efeito da selecção das moléculas de DNA pré-PCR. Isto significa que em amostras LCN, quando se inicia a reacção de PCR, alguns alelos já se encontram sub-representados. A confirmar-se esta hipótese, justifica-se que a WGA não traga vantagens relativamente à abordagem convencional para amostras LCN – aumento do número de ciclos.

Em relação ao *nested*-PCR, os resultados não mostram diferenças significativas em relação ao Ident34 ciclos, no que toca a sucesso na detecção de alelos, sendo que os quartis, de uma forma geral, são muito semelhantes (Figura 54). Em termos de contaminantes, não houve qualquer alteração (no geral) com o uso de *nested*-PCR. Em relação a produtos inespecíficos, também não ocorreram alterações, talvez pelo facto do *kit* Identifiler™ ter uma qualidade extremamente elevada, não produzindo normalmente este tipo de artefactos. Contudo, o *nested*-PCR tem a desvantagem de necessitar de dois pares de *primers* para cada *locus* e, por isso, neste momento haver necessidade de implementar novos *kits* para esse efeito. Aumentando o número de ciclos, a análise pode ser feita com os *kits* normalmente usados, apenas alterando o número de ciclos da PCR. Sendo assim, parece óbvio que aumentar o número de ciclos tem vantagens sobre qualquer um dos métodos alternativos estudados.

Os resultados obtidos com os diferentes marcadores mostram claramente que se conseguem obter perfis genéticos a partir de resíduos de ID deixadas por simples contacto com uma lâmina de vidro. Estes resultados vão claramente de encontro às observações descritas por outros autores, para análise genética de ID recuperadas de tecido, papel e outras superfícies (Wiegand & Kleiber, 2000; Zamir *et al.*, 2000; Balogh *et al.*, 2003; Petricevic *et al.*, 2006; Jasuja *et al.*, 2006).

Aumentar o número de ciclos provou, em todos os casos, ser uma estratégia que permite detectar alelos onde numa análise normal não se consegue. Considerando o *kit* Identifiler™, aumentar para 34 o número de ciclos permite, de acordo com os resultados, detectar uma maior quantidade de perfil do indivíduo, passando a mediana de 0% com 28 ciclos para 70% com 34 ciclos (Figura 29). Nestes resultados também se observa que, em algumas situações, as ID contêm células suficientes para permitir uma análise a 28 ciclos fiável, considerando-se, por isso, que nestas situações, ocorreu a deposição de uma elevada quantidade de células. Este facto poderá também indiciar que o método de recolha e extracção usado é bastante eficiente, permitindo recuperar grande parte do material genético existente na amostra.

Os resultados da análise com Ident34 são semelhantes aos descritos por outros autores, que referem percentagens de perfil na ordem de 80% (Balogh *et al.*, 2003). Os valores referidos de 70% podem ser um pouco mais baixos, pelo facto de se entrar em consideração com todas as amostras, incluindo as de ID reveladas, que fazem com que a mediana se desloque para valores mais baixos, como foi verificado. Considerando apenas as ID não reveladas, a mediana sobe para 80%, um valor igual ao obtido pelo referido autor.

Na literatura não está descrita a aplicação do *kit* Yfiler™ para a análise genética de ID. No entanto, a sua aplicação no estudo destes vestígios é justificada pelo facto de se saber que a maior parte dos crimes são cometidos por indivíduos do sexo masculino.

Apesar de se constatar em alguns estudos e, também, através da experiência do laboratório, que a análise do cromossoma Y usando os *kits* referidos é mais sensível do que a dos autossomas (utilizando o *kit* Identifiler™), para a aplicação do estudo destes STR na análise genética de ID (tal como para os autossomas) é, também, necessário aumentar a sensibilidade do método, como se verificou nos estudos de sensibilidade. Neste trabalho optou-se por usar 36 ciclos.

A análise a 36 ciclos provou oferecer melhores resultados que as condições normais (a 30 ciclos), não tendo esta diferença sido tão acentuada como no caso do Identifiler™ (Figura 29 e Figura 42). Considerando condições normais para ambos os *kits*, o Yfiler™ proporcionou maior sucesso do que o Identifiler™, confirmando, mais uma vez, que nestas condições, o Yfiler™ é mais sensível que o Identifiler™, proporcionando resultados em amostras em que, com o último *kit* não se obtém. No entanto, quando se aumenta o número de ciclos, enquanto que com Identifiler™ se obtém uma mediana de 70%, com o Yfiler™ a mediana é inferior, apenas de 30%. Verifica-se, também, que ao contrário do que se observou com o Identifiler™, em algumas amostras obtiveram-se piores resultados com Yfiler36 do que com Yfiler30 (Tabela 19). Estes resultados são explicados, em parte, pelo enorme contributo negativo dos *loci* com fragmentos de amplificação superiores a 200 pb que, como se verificou, ofereceram resultados bastante inferiores (Figura 43). Pode-se concluir que o Yfiler™ parece não ser tão robusto como o Identifiler™ para a análise deste tipo de amostras, pois também se verificou que as duas réplicas efectuadas com Yfiler36 diferem significativamente, mostrando que os resultados não são sempre reproduzíveis (Figura 42).

Os miniSTR provaram já proporcionarem uma grande capacidade na obtenção de resultados em amostras altamente degradadas. Contudo, a sua aplicação a amostras genéticas de ID ainda não se encontra documentada na bibliografia. A aplicação de miniSTR justifica-se pelo facto de se ter verificado que estes marcados são mais sensíveis que os STR e, também, por se saber que o DNA extraído de ID pode estar degradado em pequenos fragmentos, uma vez que experimentou fenómenos apoptóticos.

Neste trabalho, não só se desenvolveu dois multiplex de miniSTR, como se aplicou o conceito do aumento do número de ciclos a estes marcadores. Assim, obtêm-se duas novas abordagens integradas, que permitem a análise de amostras LCN altamente degradadas.

Também com os miniSTR se observou que, aumentando o número de ciclos, se consegue detectar um maior número de alelos. No entanto, verificou-se que existem diferenças significativas na sensibilidade entre o T01 e o heptaplex, sendo que com 36 ciclos o T01 detecta maior proporção de alelos (Figura 48 e Figura 49). Esta constatação pode advir do facto do T01 incluir um menor número de *loci*, sendo mais fácil de otimizar; ou então, porque os alelos têm todos tamanhos inferiores a 120 pb, enquanto o heptaplex inclui alguns alelos com tamanho superior a 170 pb, o que também poderá fazer a diferença.

Comparando o sucesso obtido com os miniSTR e com o *kit* Identifiler™, constata-se que em condições LCN, os miniSTR ofereceram melhores resultados que o Identifiler™. Ocorre um aumento de aproximadamente 20% na percentagem de alelos detectados (Figura 50). Os resultados com miniSTR foram, inclusivamente, melhores que os *loci* do Identifiler™ menores de 200 pb. Estes últimos resultados podem, também, decorrer do facto do número de ciclos usado para os miniSTR proporcionar maior sensibilidade do que o *kit* Identifiler™.

Estes resultados mostram que as ID são vestígios em que o DNA é mais facilmente analisado usando *loci* com fragmentos de amplificação mais pequenos. A análise com miniSTR e 36 ciclos foi, sem dúvida, o método que permitiu obter os melhores resultados em termos de proporção de alelos detectados. Estes marcadores, por terem fragmentos de amplificação mais pequenos, são mais facilmente amplificados.

É, no entanto, difícil a análise de um elevado número de *loci* miniSTR numa única reacção. Por isso, é difícil, neste momento, conseguir-se resultados com réplicas de um número razoável de *loci* miniSTR de amostras LCN, de forma a permitir a obtenção de um poder de discriminação suficientemente elevado.

Tendo em consideração a bibliografia disponível, o objectivo deste trabalho, no que toca a métodos de revelação, foi testar os reveladores mais usados em lofoscopia e, também, os mais diversificados em termos de procedimento de revelação, para se perceber se este factor é importante. Neste sentido, e seguindo a sugestão de Cordeiro (2006), estudou-se o impacto do cianoacrilato, do pó magnético e de pó branco (à base de bismuto). A justificação para estas escolhas assenta no facto do cianoacrilato ter sido descrito na bibliografia como um método que poderia preservar as células no vestígio e que menos influenciaria a recolha e análise de DNA (Wickenheiser, 2001). Contudo, na bibliografia, esta assumpção foi mais teórica que empírica, pelo que é interessante testar esta hipótese. Por outro lado, o pó branco à base de Bismuto, como tem aplicação mecânica com um pincel, pensou-se que poderia arrastar algumas células, levando a uma maior deficiência na análise genética. A revelação com pó magnético, por ser um método bastante usado, pareceu ser uma boa opção de estudo. Estes três métodos são dos mais usados em práticas lofoscópicas.

Os resultados mostram, de acordo com o esperado, que as ID não reveladas oferecem os melhores resultados na detecção de perfil, apresentando sempre uma mediana mais alta e, também, o quartil superior mais alto (Figura 30, Figura 46 e Figura 51). Repare-se, no entanto, que as diferenças de sucesso entre as amostras não reveladas e as amostras reveladas são mais significativas com o Yfiler™ que com o Identifiler™ (Tabela 10 e Tabela 22), podendo-se confirmar os resultados já discutidos de que o *kit* Yfiler™ parece não ser tão robusto como o Identifiler™, sendo mais sensível em condições adversas, como inibidores ou DNA degradado.

Contudo, a revelação com cianoacrilato permite obter resultados muito semelhantes aos que se obtêm a partir das amostras não reveladas, sendo que a mediana, para todos os marcadores, é muito semelhante à das ID não reveladas, não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$ para todos os marcadores). Inclusivamente, com Ident34 a mediana é ligeiramente superior nas amostras reveladas com cianoacrilato.

Apesar disso, nota-se em alguns casos, como na amplificação com Yfiler36, que a revelação com cianoacrilato tem um efeito negativo na análise. Comparando com os resultados da quantificação (em que se verifica que é recuperado menor quantidade de DNA com este revelador), percebe-se que existe algum factor desconhecido que influencia ligeiramente a recuperação de DNA. Poder-se-á especular no sentido de se admitir que algumas moléculas de DNA fiquem coladas ao revelador e que, quando este é eliminado pelo processo de extracção, arraste também algum DNA (ou células). Nestes resultados, o cianoacrilato não teve qualquer efeito inibidor da reacção da PCR mas, pelo contrário, segundo o modelo proposto por Wickenheiser (2002), o cianoacrilato deve preservar as células no vestígio até serem recolhidas no laboratório, pois este método de revelação apenas consiste em colocar uma fina camada de acrilato sobre as células, sem qualquer acção mecânica sobre estas.

A revelação com pincel, pelo contrário, mostrou ser a menos eficiente, oferecendo percentagens de perfil mais baixas, com a mediana, em geral, a atingir valores 30% inferiores que nas amostras não reveladas (Figura 30, Figura 46 e Figura 51). Este facto não parece ser devido a inibição da reacção da PCR pois, como foi referido, não se verificou qualquer acção inibitória por parte dos reveladores. Assim, esta diferença parece ser explicada apenas pelo facto de existir menor quantidade de células nos vestígios revelados com este método, o que resultou na menor quantidade de DNA extraído; esta constatação pode advir da aplicação mecânica do revelador (Lowe *et al.*, 2003), que poderá remover algumas células do vestígio.

A revelação com pó magnético mostrou ser intermédia entre o cianoacrilato e o pincel (Figura 30, Figura 46 e Figura 51). Este método de revelação pressupõe, também, uma aplicação mecânica, mas os “pêlos” do pincel são formados pelo próprio pó magnético (aplicação com um íman), pelo que a aplicação é mais suave que no caso do pincel, não removendo tantas células do vestígio. Isto explica uma diferença na mediana de 20% para as amostras não reveladas. Poder-se-á, também, suspeitar que algum DNA pudesse ficar aderente ao pó magnético (alguns métodos de extracção usam este mecanismo para a extracção do DNA – Qiagen® BioRobot EZ1), pois sabe-se que, em determinadas condições, ocorre interacção entre o DNA e as esferas magnéticas e, quando este é removido pelo método de extracção, algum DNA poderá ser arrastado.

Em face do exposto, parece que a análise genética de ID reveladas é possível, sendo que o método de revelação que se utiliza influencia consideravelmente os resultados. Esta circunstância parece dever-se, não à possibilidade de inibição da PCR por parte de algum revelador, mas antes ao processo de aplicação do revelador. Uma aplicação mecânica, em que haja a necessidade de contacto com o vestígio tem, certamente, efeitos mais negativos na análise genética. Pelo contrário, métodos de aplicação em que não se necessite de contactar com o vestígio, permitirão a obtenção de melhores resultados. Esta constatação vai de encontro aos resultados obtidos por Balogh *et al.* (2003) e por Lowe *et al.* (2003), que verificaram ocorrer diminuição do sucesso nas amostras reveladas. No entanto, no presente trabalho, a influência não foi tão negativa, sendo que a mediana mais baixa obtida com Ident34 (58% para a revelação com pincel) é muito superior à média obtida por Balogh *et al.*

(2003) (47%). Este facto poderá ser explicado por destes autores terem estudado reveladores diferentes dos deste trabalho (usaram ninidrina e iodina), podendo ser mais destrutivos da fracção celular. Dos três reveladores usados neste trabalho, sem dúvida que o cianoacrilato é o que permite obter os melhores resultados. Assim, este deve ser o método escolhido para a revelação de ID, nos casos em que se pretenda, posteriormente, proceder a uma análise genética.

Outro dos objectivos deste trabalho era verificar a degradação do DNA de ID ao longo do tempo. Através da análise dos resultados, verifica-se que nas condições do estudo, a degradação não é muito efectiva e parece não existir uma grande relação entre o número de dias de exposição e o sucesso da obtenção de um perfil, que se traduz pelo R^2 muito baixo das rectas de correlação (Figura 32). Isto permite concluir que, em condições idênticas às deste estudo (numa casa fechada, com alguma protecção), mesmo bastante tempo depois do crime, é possível recuperar e analisar DNA de ID. Por outro lado, esta experiência mostra, também, que é possível e provável recuperar material genético de vestígios lofoscópicos que nada têm a ver com o crime, que foram deixados no local bastante tempo antes deste ocorrer. É, por isso, necessário ponderação para avaliar todos os cenários possíveis e ter em atenção todas estas possibilidades, na altura de analisar amostras genéticas de ID.

No entanto, apesar de não haver uma forte correlação em relação ao ponto anterior, ocorreu uma variação significativa entre os diferentes dias. Observa-se que entre os diferentes dias existe uma grande variação na deposição de células (pela variação do sucesso da análise), havendo dias em que se consegue obter um bom perfil (mesmo com 28 ciclos) e outros em que já não se consegue detectar nenhum alelo. Este facto pode ser explicado pela existência de uma grande variação intra-individual, concluindo-se que possa ocorrer uma apreciável variação no perfil do dador de células epiteliais. Considerando esta hipótese, deve-se ter muita cautela quando se pretende determinar o perfil de dador (*shedder type*) de um indivíduo (para questões relacionadas com a probabilidade de transferência secundária de DNA). Assim, no momento do crime, um indivíduo poderá estar em condições fisiológicas que o levam a ser bom dador (podendo ter funcionado como dador por transferência secundária) e, no momento da determinação do perfil de dador (alguns dias depois do crime) ele poderá ser considerado como mau dador, ou *vice-versa*. Estes resultados não permitem tirar conclusões definitivas, mas apenas que se levante uma hipótese que deve ser tida em consideração; no entanto, mais estudos devem ser feitos neste sentido.

O aparecimento de alelos contaminantes está descrito como sendo um dos factores que pode levar a incorrectas interpretações de resultados de perfis LCN. Estes alelos não pertencentes ao perfil do indivíduo foram considerados como alelos contaminantes, por se entender que as fontes de transferência secundária e adventícia estavam severamente limitadas, devido ao desenho do estudo.

Neste trabalho, a detecção de alelos contaminantes foi observada em algumas amostras e com os três grupos de marcadores genéticos (STR, Y-STR e miniSTR). Os resultados mostram que a detecção de alelos contaminantes é directamente proporcional à sensibilidade do método (verificável pela proporção de alelos do perfil detectados). Por

exemplo, com o *kit* Yfiler™ com 30 ciclos detectou-se mais alelos contaminantes do que com o Ident28 (por ser mais sensível), sendo que a 36 ciclos se detectou mais do que a 30 ciclos, mas menos do que com o Identifiler™ a 34 ciclos (por ser menos sensível). Por sua vez, os miniSTR, com 36 ciclos, que se verificou terem elevada sensibilidade, detectam uma maior quantidade de alelos contaminantes do que os dois primeiros *kits* de STR.

O nível de contaminação determinado com o *kit* Identifiler™, usando 34 ciclos, foi, no global, de aproximadamente 8% de alelos contaminantes no total de alelos detectados. Este valor é superior ao determinado por Taberlet *et al.* (1996) que encontraram 5% de alelos contaminantes. Note-se, contudo, que os 8% determinados incluem todas as amostras, mesmo as reveladas. Apenas considerando as não reveladas, a percentagem de alelos contaminantes é de 5%, um valor igual ao obtido pelo referido autor. Em relação aos miniSTR, obteve-se, para as mesmas amostras não reveladas, um valor médio de 8,4%; ou seja, um valor superior ao encontrado com o *kit* Identifiler™. Deve-se, contudo, ter em consideração os *primers* usados para os miniSTR, pois poderão não estar suficientemente purificados para condições LCN. Esta poderá ser também uma explicação para o facto de se detectar mais alelos contaminantes esporádicos nos controlos negativos de amplificação com miniSTR36, do que com Ident34.

Ao contrário do que se previa, o nível de contaminação não variou significativamente entre os métodos de revelação. Esperava-se que a contaminação fosse superior nas amostras reveladas, pois a revelação foi feita no Laboratório da Polícia Técnica da Polícia Judiciária, usando o equipamento comum para esse efeito. Considerando que o pincel arranca células dos vestígios era de supor que, nas ID reveladas com este método, se detectasse DNA de outros vestígios revelados com este material. Este facto não foi verificado, possivelmente em parte, devido aos cuidados extremos que se teve na manipulação das amostras durante a revelação e, ainda, por se ter usado revelador que tinha sido poucas vezes utilizado, ocorrendo um factor de diluição das células de outros vestígios.

Contudo, considerando a percentagem de alelos contaminantes no número total de alelos detectados, verifica-se que existem diferenças, sendo que nas amostras reveladas obteve-se, em média, um maior nível de contaminação. Particularmente com os miniSTR as diferenças são mais acentuadas, em parte devido à elevada sensibilidade destes marcadores. Este facto não parece ser apenas devido à contaminação mas, também, ao sucesso na detecção de alelos correctos nas amostras reveladas ser menor do que nas amostras não reveladas, pelo que a percentagem relativa de alelos contaminantes é superior nestas últimas. Apesar disto, e não obstante as diferenças não serem estatisticamente significativas (com qualquer marcador), estes resultados permitem concluir que os métodos de revelação introduzem mais erro nos perfis, através de alelos contaminantes.

A partir dos resultados observados com miniSTR36, em termos de percentagem de perfil obtido e de contaminantes, parece que 36 ciclos é um número demasiado elevado para a sensibilidade que se pretende, pois detectou-se uma grande quantidade de alelos contaminantes com os dois multiplex. Quando se fez o teste de sensibilidade não se teve a noção deste problema, pois o DNA padrão é extremamente purificado e oferece sempre

melhores resultados. Por isso, sugere-se que seja feito um estudo mais aprofundado das características dos perfis obtidos com os diferentes números de ciclos e, determinar em seguida, com mais rigor, qual o que se deve ajustar à sensibilidade que se pretende. Contudo, 34 ciclos poderá ser uma boa solução.

Estes resultados evidenciam que quando se amplifica uma amostra em condições LCN, é necessário ter um cuidado extremo com contaminantes; quando se trata de miniSTR, que têm uma sensibilidade superior, esses cuidados devem ser ainda maiores pois, como se verificou, é mais fácil detectar qualquer alelo, inclusive contaminantes. Assim, estes artefactos são de ter em consideração, devido à facilidade com que se introduzem erros nos perfis.

É conhecido que as células da camada mais superficial da pele entram em estado apoptótico. Este fenómeno reflecte uma morte programada da célula; ou seja, a célula morre de uma forma controlada. Uma das fases deste processo caracteriza-se pela clivagem do DNA nuclear por uma endonuclease tipo S1 dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Esta degradação do DNA é característica e resulta em fragmentos de aproximadamente 200 pb. É, portanto, de admitir que, teoricamente, os *loci* com fragmentos de amplificação superiores a 200 pb tenham um menor sucesso de amplificação, pois para estes é necessário DNA molde com o tamanho mínimo do fragmento de amplificação que, teoricamente, não existe com muita frequência. Pelo contrário, *loci* com fragmentos de amplificação inferiores a 200 pb terão uma taxa de sucesso mais elevada. Esta assumpção teórica também se verifica empiricamente, tanto nos resultados da bibliografia, como através dos resultados obtidos neste trabalho.

Com os *kits* Identifiler™ e Yfiler™ verificaram-se diferenças significativas no sucesso entre os *loci* com fragmentos de amplificação superiores e inferiores a 200 pb e, sem dúvida, os menores de 200 pb apresentaram um sucesso significativamente superior (Figura 33 e Figura 43). A diferença com Ident34 foi, em mediana, de 10%, mas por vezes chegou a ser superior a 60% (Figura 45). Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Balogh *et al.* (2003), apesar de terem verificado diferenças mais significativas (20%). No entanto, este facto é justificado porque no presente estudo comparou-se os marcadores maiores e menores de 200 pb, enquanto no trabalho referido, a diferença obtida foi entre *loci* com tamanhos (pb) extremos. É, por isso, de esperar que se tenham obtido diferenças mais significativas. Estes resultados também corroboram os obtidos e, já discutidos, resultados dos miniSTR. Com Yfiler36, a diferença no sucesso entre *loci* maiores e menores de 200 pb é mais acentuada do que a verificada com Ident34 (mediana de quase 30%) (Figura 45). Observa-se, pois, que o *locus dropout* é muito acentuado nos *loci* maiores de 200 pb. Assim, comparando apenas os *loci* menores de 200 pb do Yfiler™ com o Identifiler™, verifica-se que o sucesso é bastante mais semelhante mas, mesmo assim, mais baixo (Figura 29 e Figura 43). Estes resultados, e os já discutidos para o *kit* Yfiler™, apontam para uma maior sensibilidade deste *kit* para condições mais adversas, como a degradação ou a presença de inibidores da PCR. O uso de *primers* que permitam obter fragmentos de amplificação mais pequenos, parecem produzir os melhores resultados. Por isso, e à semelhança do que se

verificou com os miniSTR autossómicos estudados, o desenvolvimento e aplicação de Y-miniSTR na análise genética de ID poderá ser uma mais valia.

Neste trabalho, também se verificou que perfis obtidos a partir de amostras LCN, aumentando a sensibilidade da PCR, são afectados drasticamente por artefactos resultantes de variações estocásticas, principalmente desequilíbrio heterozigótico, que quando muito acentuado, leva ao *allele dropout*. De facto, os artefactos resultantes das variações estocásticas parecem ser os que mais dificultam a interpretação dos perfis. Do total de análises feitas com Ident34, em 80% dos *loci* heterozigóticos foi constatada a existência de desequilíbrio heterozigótico e, em 24%, foi verificado *allele dropout* (Tabela 14)

Apesar do cálculo do Hb ser efectuado normalmente com o recurso à área dos picos (Whitaker *et al.*, 2001), decidiu-se fazer esse cálculo através das alturas dos mesmos. As razões para esta decisão assentam, principalmente, no facto de ser a altura que permite ao investigador considerar ou eliminar um pico como sendo um alelo correcto, sendo também na altura que se define o *peak threshold*. Assim, como é normalmente a altura dos picos (e não a área) que se usa para os critérios de eliminação de alelos, parece mais óbvio usar estes valores.

Parece ter ficado provado que o *allele dropout* e desequilíbrio heterozigótico são apenas o resultado de variações estocásticas e não são dependentes do tamanho (pb) dos alelos, já que não se verificaram diferenças entre os sistemas maiores e menores de 200 pb (Tabela 15 e Figura 38). Por outro lado, verificaram-se diferenças das amostras não reveladas para as amostras reveladas, sendo que as mais significativas se observam quando se compara qualquer método com a revelação com pincel, ou seja, o mesmo padrão registado em relação às diferenças entre a quantidade de DNA obtida (Tabela 7 e Tabela 13). Estas diferenças podem ser devidas apenas ao facto de nestas amostras se ter recuperado menor quantidade de DNA (e por isso se amplifica menos DNA), aumentando a variação estocástica.

Por se ter verificado que o perfil genético obtido usando 34 ciclos nunca foi pior que 28 ciclos (Tabela 8) e, também, por ser ter constatado que o aumento do número de ciclos não introduz artefactos estocásticos significativos em amostras com quantidade suficiente de DNA para permitir obter perfil total com Ident28 (Figura 37), pode-se dizer que a introdução destes artefactos, como o Hb e *allele dropout*, não é provocada directamente pelo número elevado de ciclos, mas antes por uma baixa quantidade de DNA (verificável pelo baixo sucesso da amplificação a 28 ciclos). Estes artefactos só são visíveis com um número mais elevado de ciclos, porque nestas condições, é possível detectar qualquer molécula de DNA, mesmo quando um dos alelos está sub-representado. Com 28 ciclos esta situação não ocorre, pois este número de ciclos foi estabelecido justamente para permitir apenas detectar DNA quando estão mais de 20 células representadas, sendo que a probabilidade de variações estocásticas com este número de células é baixa. Daí também que Gill *et al.*, 2005 tenham mostrado, por meio de simulação, que a fonte de artefactos provenientes da variação estocástica é a aleatoriedade na selecção de moléculas de DNA, quando este é pipetado para a reacção de PCR.

As diferenças observadas para o Hb entre alguns sistemas, particularmente o D19S433 e o D2S1338, podem ser explicadas não pelo tamanho dos fragmentos de amplificação, mas por diferentes sensibilidades dos *primers* para a amplificação. Estas diferenças não devem ser vistas como absolutas, pois este estudo não permite (nem é o seu objectivo) tirar conclusões fiáveis em relação a este ponto, uma vez que apenas se observou um indivíduo, não havendo uma amostragem significativa para efectuar um estudo estatisticamente válido das características de perfis LCN. Apenas se pode dizer que este tipo de artefactos se observou, mas sem se poder admitir a sua frequência como válida para todas as populações amostrais.

O desequilíbrio heterozigótico leva a que dois alelos do mesmo *locus* possam ter tamanhos muito distintos, sendo por vezes difícil saber se o mais pequeno é um alelo. Estes resultados mostram que existe a tendência para um aumento do desequilíbrio heterozigótico com a diminuição da eficiência da amplificação (observada pela altura dos picos). Tendo este facto em consideração, verifica-se que, separando a amostra em dois grupos, com os valores maiores e menores de 2500 rfu, para alelos superiores a esse tamanho, o desequilíbrio heterozigótico tende a ser menor, ocorrendo também uma frequência quase nula de *allele dropout*. Para alelos menores que esse tamanho, a probabilidade de Hb está distribuída de 0,05 a 1 e a frequência de *allele dropout* é elevada (Figura 36). Resultados semelhantes são, também, verificados por Whitaker *et al.* (2001). Estas constatações podem levar a que se considere que quanto mais baixo for o pico menos fiável é a sua interpretação como pico homozigótico. Observa-se, também, que para tamanhos abaixo de 2500 rfu os picos estão distribuídos de uma forma bastante uniforme entre 0 e 1, salvo uma pequena região entre 0 e, aproximadamente 0,05, existente devido a imperfeições na matriz, que torna aquela zona uma área complexa para permitir separar-se entre não aparecimento do pico e não detecção do pico (Figura 36). Isto significa que, para valores baixos de A_2 , metade dos picos têm um $Hb > 0,5$ e outra metade têm um $Hb < 0,5$. Para valores mais elevados de A_2 , a média de valores de Hb tende a deslocar-se para valores superiores. Estes resultados permitem concluir que quando se obtém um resultado homozigótico, mas em que o pico tem uma altura baixa (inferior a 2500 rfu), há que ter em consideração que poderá ter ocorrido *allele dropout* ou desequilíbrio heterozigótico acentuado. Quando esse pico tiver uma altura superior a 2500 rfu, pode-se considerar que o *allele dropout* e o desequilíbrio heterozigótico muito acentuado é mais improvável. Assim, nestes casos, mais facilmente se considera um sistema homozigótico com tal, do que no caso de um pico com altura inferior a 2500 rfu.

O *locus dropout* foi, também, um artefacto que ocorreu várias vezes nestas amostras. Ao contrário do *allele dropout*, o *locus dropout* ocorreu com maior frequência nos *loci* maiores de 200 pb, tanto para o Identifiler™ como para o Yfiler™. Este fenómeno era de esperar, uma vez que, como já se verificou, o sucesso foi superior nos *loci* com fragmentos de amplificação menores do que 200 pb em ambos os *kits*. É de notar que o *allele dropout* pode, também, ter a ver com a sensibilidade e qualidade dos *primers* e do local de hibridação que, em alguns sistemas, pode ser mais eficaz que noutros; este facto permite que esses sistemas sejam mais eficientes, podendo ser o caso do D21S11, que apresenta uma frequência de *allele dropout* muito baixa (Tabela 15). O mesmo, mas no sentido inverso, parece ocorrer com o

TH01, que apesar de ser um *locus* de baixo peso molecular, tem uma frequência de *locus dropout* (22,5%) superior à dos *loci* semelhantes (pb) (média de 15,6%), talvez pela baixa eficiência de amplificação neste *kit* (Tabela 15).

Para os sistemas homozigóticos (D5S818, D7S820 e D16S539) o sucesso é mais elevado do que para os outros sistemas, pelo simples facto de serem homozigóticos. A probabilidade de se observar o genótipo correcto (homozigotia) é superior à de se observar o genótipo correcto para um sistema heterozigótico; porque, nos sistemas homozigóticos, mesmo que ocorra *allele dropout*, o outro alelo é detectado, fornecendo o genótipo correcto. A probabilidade de se observar, pelo menos, um dos alelos (que vai resultar no perfil correcto num sistema homozigótico) é superior à de se observar os dois alelos necessários para se obter o perfil correcto num sistema heterozigótico.

O tamanho dos picos dos produtos *stutter* resulta, normalmente, da frequência com que ocorre o *enzyme slippage* e, também, do momento na PCR em que esse fenómeno ocorre. Numa situação normal, uma amostra com elevada quantidade de DNA como, por exemplo, numa população de 500 moléculas, se ocorrer um evento de formação de produtos *stutter*, vai resultar numa proporção de 1 molécula *stutter* para 500 moléculas normais. No caso de uma amostra LCN, em que se tem por vezes 5 moléculas de DNA molde, um fenómeno de *stutter* vai produzir um *stutter* numa proporção de 1 molécula *stutter* para 5 moléculas correctas, fazendo com que o tamanho dos *stutter* seja muito elevado, quando comparado com o do alelo correspondente.

Neste trabalho, e à semelhança do que acontece noutros artigos, a altura das bandas *stutter* em alguns casos atinge proporções bastante elevadas, tanto com miniSTR como com Identifiler™. Com Yfiler™ não se verificaram *stutters* significativas. A detecção de *stutters* elevados depende dos sistemas. No entanto, para o Identifiler™, pode-se afirmar que qualquer que seja o sistema, a distribuição não *outlier* da proporção relativa das bandas *stutter* não supera os 15%. No entanto, observa-se que, em alguns casos pontuais, essa proporção relativa assume valores muito superiores, podendo atingir mais de 80% do tamanho do pico correspondente (Figura 40).

À semelhança do que ocorreu com o *kit* Identifiler™, a formação de produtos *stutter* com altura superior ao normal, foi também observado em ambos os multiplex de miniSTR, tanto a 32 como a 36 ciclos. Interessante verificar que no T01, o D22S1045, foi aquele em que se observou um maior número de *stutter* e, também, os mais elevados, facto que é facilmente explicado por este *locus* ser um STR trimérico e, por isso, ter mais tendência para formar *stutters* (Butler, 2005). Pode-se, por isso, dizer que em termos de artefactos verifica-se que o comportamento dos miniSTR é idêntico ao dos STR, pois os primeiros são STR com fragmentos de amplificação mais pequenos, mas o polimorfismo é exactamente o mesmo.

Para estes *stutter* tão elevados é difícil perceber se são verdadeiros *stutter* ou se, pelo contrário, são alelos contaminantes que, por coincidência, têm uma unidade de repetição a menos do que o alelo correspondente. Neste sentido, estes alelos considerados *stutter* e, que têm um tamanho tão elevado, podem perfeitamente ser contaminantes e a sua formação não ter como origem o mesmo mecanismo dos produtos *stutter*. Contudo, alturas desta natureza

parecem raras, mas efectivamente *stutters* com tamanhos até 30% são observadas com alguma frequência em quase todos os sistemas. É bom lembrar que neste estudo, as hipóteses resumem-se apenas a determinar se é um *stutter* ou um alelo contaminante, mas num caso real, em que não se conhece o verdadeiro perfil da amostra, pode-se ainda colocar a hipótese de ser uma verdadeiro alelo com um desequilíbrio heterozigótico que, por vezes, pode ser acentuado (pois como já se verificou, se A_2 tiver um tamanho reduzido, a probabilidade de ocorrer desequilíbrio heterozigótico acentuado é elevada).

Estes resultados permitem concluir que a maior parte dos produtos *stutter* não oferecem problemas de interpretação, mas que esporadicamente são produzidos alguns que podem condicionar a interpretação dos resultados. O problema prende-se com o facto de, nessas situações, ser difícil saber se o pico é um produto *stutter*, um verdadeiro alelo ou, ainda, um alelo contaminante. Parece, contudo, que fazendo a duplicação dos resultados, esta dúvida pode ser clarificada, pois a probabilidade de haver a formação de um produto *stutter* com um tamanho considerável em dois replicados da mesma amostra é bastante menor do que num só replicado. No caso de se usarem três replicados, essa probabilidade é ainda menor.

Por forma a conseguir ultrapassar alguns dos artefactos observados em perfis LCN, Gill *et al.* (2000) implementaram a regra da duplicação, na qual se propõe que um alelo apenas pode ser reportado como verdadeiro quando for detectado, no mínimo, em dois replicados da mesma amostra. Devido à baixa frequência dos artefactos mais importantes (*stutters* elevadas, *allele dropout* e *allele dropin*), a probabilidade de estes ocorrerem em dois replicados no mesmo *locus* ou alelo é bastante mais baixa que num só replicado. Assim, usando replicados da mesma amostra, consegue-se eliminar alguns artefactos.

De facto, os resultados desta experiência para as amostras com três replicados, mostram que a frequência de erros cometidos por alelos contaminantes e *allele dropout* diminui quando se fazem três replicados (Tabela 17). Contudo, o *locus dropout* é mais elevado fazendo o consenso, porque apenas se reporta o genótipo para um determinado *locus* quando a certeza é elevada. Assim, verifica-se que quando se determina o consenso das amostras, a frequência de *loci* genotipados erradamente é significativamente mais baixa e que, pelo contrário, a frequência de *loci* tipados correctamente é mais elevada (Tabela 17).

Observa-se, também, que as contaminações são substancialmente reduzidas e que o *allele dropout*, apesar de ser menor quando se faz o consenso, continua com uma frequência elevada (Tabela 17). Confirma-se que o erro introduzido por contaminações esporádicas é quase totalmente eliminado com a regra do consenso, enquanto o erro introduzido pelo *allele dropout* não é tão facilmente eliminado, concluindo-se que o *allele dropout* é o artefacto mais importante a ter em consideração. Este facto pode ser explicado pela elevada frequência com que aparece nas amostras, ao contrário dos alelos contaminantes. Por este motivo, quando se reporta o genótipo de um sistema como homozigótico, há que considerar sempre a possibilidade da ocorrência de *allele dropout*, daí se colocar sempre o F' nestes sistemas.

É de notar que apenas se verificou um mesmo alelo contaminante em dois replicados, em três situações (1,25%). Este valor superior ao de Gill *et al.* (2000) poderá ser devido, não só

ao facto de se ter trabalhado em piores condições laboratoriais e terem sido usadas amostras de vestígios (e não diluições de DNA em boas condições de contaminação e degradação), mas também, porque aqueles autores apenas fizeram dois replicados e, neste trabalho, três, sendo que a probabilidade de se detectar o mesmo alelo contaminante em duas das três réplicas é superior a detectar-se apenas nas duas réplicas (o triplo).

De uma forma resumida, percebe-se que em perfis LCN não se pode pensar da mesma forma que para perfis normais, em que apenas um *mismatch* pode excluir um suspeito. Parece, contudo, que tendo em consideração um cenário semelhante ao usado neste trabalho (em que não se coloca a hipótese de transferência secundária ou adventícia) e seguindo a regra do consenso, a detecção de alelos diferentes dos do suspeito poderá indiciar exclusão (pois verificou-se que é pouco provável reportar um alelo contaminante pela regra do consenso). No entanto, a não detecção de alelos do suspeito não poderá permitir a sua exclusão, pois a probabilidade de *allele dropout* é considerável.

Estes resultados e, evidentemente, os obtidos na bibliografia, colocam a grande questão de se saber se perfis LCN poderão ser usados na pesquisa de suspeitos em bases de dados genéticos. Parece que este é um recurso que não deve ser usado, pois um perfil LCN pode não ser totalmente correcto (provocado pelos artefactos já discutidos). Usando estes perfis para pesquisa em bases de dados, poder-se-ia estar a relacionar com o crime um indivíduo que nada tem a ver com o mesmo, mas que por coincidência tem um perfil idêntico ao obtido da análise do vestígio.

5

Conclusões

1. A análise genética de ID provou possuir potencialidades para se conseguir resolver casos que, de outra forma, poderiam não ser conclusivos. Contudo, a capacidade de se usar técnicas com sensibilidade suficiente para a análise destas amostras, que permitam a obtenção de resultados totalmente fiáveis, parece ainda ser uma realidade não alcançada.
2. O método de extracção do DNA de ID que se utiliza é fundamental para se conseguir obter bons resultados na análise. O método de extracção orgânica, adaptado a estas amostras, revelou ser o mais eficiente dos métodos estudados. Contudo, este passo parece ser o mais susceptível à introdução de contaminação, pelo que deve ser efectuado em ambiente completamente estéril.
3. Comparando o aumento do número de ciclos com a WGA e o *nested*-PCR, conclui-se que o primeiro é o melhor método para incrementar a sensibilidade da análise.
4. O aumento do número de ciclos permitiu, em todos os casos, detectar maior quantidade de alelos do perfil. Com Identifiler™ a mediana dos resultados aumentou 70%.
5. A análise do cromossoma Y, usando o *kit* Yfiler™, revelou ser muito sensível a condições de degradação e inibidores. Os melhores resultados foram obtidos para os *loci* com fragmentos de amplificação inferiores a 200 pb. Por isso, poderá ser uma boa estratégia a aplicação de Y-miniSTR na análise genética de ID.
6. O DNA de ID encontra-se degradado, pelo que loci com fragmentos de amplificação menores do que 200 pb permitem obter mais informação. Assim, a aplicação de miniSTR amplificados com 36 ciclos, foi a que proporcionou as maiores percentagens de perfil detectado, com uma mediana de 90%.

7. Os perfis genéticos são muito afectados por vários artefactos, como o *allele dropout*, desequilíbrio heterozigótico, contaminações e produtos *stutter*. Quando se determina perfis de consenso, eliminam-se alguns artefactos e, conseqüentemente, obtêm-se resultados mais fiáveis. Contudo, a probabilidade de se detectar artefactos, particularmente *allele dropout*, é significativa, sendo possível reportar-se perfis errados caso não se analise correcta e pormenorizadamente os resultados.
8. O *allele dropout* parece ser o artefacto que mais pode contribuir para o insucesso de uma análise genética de ID em condições semelhantes às usadas neste trabalho. Acresce, ainda, as dificuldades inerentes à transferência secundária e adventícia, que podem trazer sérias dificuldades, e que não foram tidas em consideração neste estudo.
9. Existem variações intra-individuais notórias que conduzem à possibilidade de se obter perfis completos de determinadas ID, mesmo efectuando uma análise com um número de ciclos habitual. Todavia, poder-se-á colocar a hipótese que o perfil de dador (*shedder type*) de um indivíduo não seja constante.
10. Provou-se que é possível recuperar perfis de ID reveladas; mas, o método de revelação tem influência no sucesso. A revelação com cianoacrilato é o método que permite um maior sucesso, enquanto a revelação com pó branco (de aplicação com pincel) ofereceu os piores resultados. Se a revelação das ID for efectuada em boas condições e com cuidados extremos, o nível de contaminação introduzido poderá ser baixo.
11. Com as capacidades de LCN, outros tipos de vestígios podem ser estudados. Nestes incluem-se, naturalmente, vestígios de contacto da pele. Contudo, a análise de amostras LCN com aplicação pericial, só deve ser feita quando estiverem reunidas condições óptimas de trabalho, tanto laboratoriais, como de análise da cena do crime, pois a introdução de artefactos que possam conduzir a erros de interpretação dos resultados é bastante provável.

Bibliografia

- Abaz J, Walsh SJ, Curran JM, Moss DS, Cullen J, Bright JA, Crowe GA, Cockerton SL, Power TE (2002). Comparison of the variables affecting the recovery of DNA from common drinking containers. *Forensic Sci Int.* 126(3): 233-240
- Alessandrini F, Cecati M, Pesaresi M, Turchi C, Carle F, Tagliabracci A (2003). Fingerprints as evidence for a genetic profile: morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing. *J Forensic Sci.* 48(3):586-592
- Amorim A, Pereira L (2005). Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Sci Int.* 150: 17-21
- Applied Biosystems (2001a). AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Identifiler $^{\text{TM}}$ PCR amplification *kit* user's manual. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2001b). AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Yfiler $^{\text{TM}}$ PCR amplification *kit* user's manual. Foster City, CA
- Applied Biosystems (2003). Quantifiler $^{\text{TM}}$ Human DNA quantification *kit* user's manual. Foster City, CA
- Asamura H, Sakai H, Ota M, Fukushima H (2007). MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Sci Intl: Genetics.* 1: 56-61
- Ballantyne KN, van Oorschot RAH, Mitchell RJ (2007). Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. *Forensic Sci Int.* 166: 35-41
- Balogh MK, Burger J, Bender K, Schneider PM, Alt KW (2003). STR genotyping an mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Sci Int.* 137: 188-195
- Bar W, Kratzer A, Machler M, Schmid W (1998). Postmortme stability of DNA. *Forensic Sci Int.* 39(1): 59-70
- Bender K, Schneider PM (2005). Validation and casework testing of the BioPlex-11 for STR typing of telogen hair roots. *Forensic Sci Int.* 161: 52-59
- Budowle B, Bieber F, Eisenberg A (2005). Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. *Legal Med.* 7: 230-243
- Budowle B, Hobson DL, Smerick JB, Smith JAL (2001). Proceedings of the Twelfth International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega

- Corporation. Disponível em: <http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp12proc-/contents/budowle.pdf>
- Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W (1999). DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*. 20: 1722-1728
- Butler JM (2005). Forensic DNA Typing, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press
- Butler JM (2006). Introduction to LCN DNA testing issues. MAAFS LCN workshop. Disponível em <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>
- Butler JM, McCord BR (2006). STR biology, markers, and methods. AAFS 2006 Workshop #6. Seattle, WA. Disponível em www.cstl.nist.gov/div831/strbase//ppt/AAFS-2006_1_STR_Biology.pps
- Butler JM, Shen Y, McCord BR (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci*. 48(5): 1054-1064
- Capelli C, Tschentscher F, Pascali VL (2003). “Ancient” protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sci Int*. 131: 59-64
- Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Mangin P (2006). Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci Int*. 156: 70-73
- Chitra S, Paramasivan K, Sinha PK, Lal KB (2004). Ultrasonic treatment of liquid waste containing EDTA. *Journal of Cleaner Production* 12(4): 429-435
- Chung DT, Drabek J, Opel KL, Butler JM, McCord BR (2004). A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. *J Forensic Sci*. 49: 733-740
- Coble M (2005). Characterization and performance of new miniSTR loci for typing degraded samples. Comunicação na reunião da *International Society of Forensic Genetics* (Ponta Delgada, Açores, Portugal)
- Coble M, Hill B, Vallone P, Butler J (2006). Development, characterization and performance of new miniSTR loci for typing degraded samples. *Progress in Forensic Genetics 11*, Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, International Congress Series 1288, 504-506
- Coble MD, Butler JM (2005). Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. *J Forensic Sci*. 50(1): 43-53
- Cook R, Evett IW, Jackson G, Jones PJ, Lambert JA (1998). A hierarchy of propositions: deciding which level to address in casework. *Sci Justice*. 38: 231-239
- Cordeiro (2006). Laboratório da Polícia Técnica da Directoria do Porto da Polícia Judiciária. Comunicação Pessoal

Crime-lite™. Disponível em <http://www.fosterfreeman.com>

Curran JM, Gill P, Bill MR (2005). Interpretation of repeat measurement DNA evidence allowing for multiple contributors and population substructure. *Forensic Sci Int.* 148: 47-53

Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D (1986). Cell Biology. Scientific American, New York

Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD *et al.* (2005). Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci Int.* 164: 33-44

Drábek J, Chung DT, Butler JM, McCord BR (2004). Concordance study Between Miniplex Assays and a Commercial STR typing *kit*. *J Forensic Sci.* 49(4): 859-860

Edelmann J, Deichsel D, Hering S, Plate I, Szibor R (2002). Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Sci Int.* 129: 99-103

Elliot K, Hill DS, Lambert C, Burroughes TR, Gill P (2003). Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Sci Int.* 137: 28-36

Evetts IW, Gill P, Jackson G, Whitaker J, Champod C (2002). Interpreting small quantities of DNA: the hierarchy of propositions and the use of Bayesian networks. *J Forensic Sci.* 47(3): 520-530

Evetts IW, Jackson G, Lambert JA (2000). More on the hierarchy of propositions: exploring the distinction between explanations and propositions. *Sci Justice.* 40: 3-10

Findlay I, Taylor A, Quirke P, Frazier R, Urquhart A (1997). DNA fingerprinting from single cells. *Nature.* 389: 555-556

Gill P (2001). Application of low copy number DNA profiling. *Croat Medical J.* 42(3): 229-232

Gill P, Curran J, Elliot K (2005). A graphical simulation model of the entire DNA process associated with the analysis of short tandem repeat *loci*. *Nucleic Acids Res.* 33(2): 632-643

Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM (2006a). The evolution of DNA databases – Recommendations for new European *loci*. *Forensic Sci Int.* 156: 242-244

Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM (2006b). New multiplexes for Europe – Amendments and clarification of strategic development. *Forensic Sci Int.* doi: 10.1016/j.forsciint.2005.11.025

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G *et al.* (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet.* 6: 130-135

- Gill P, Kirkham A (2004). Development of a simulation model to assess the impact of contaminants in casework using STRs. *J Forensic Sci.* 49(3): 485-491
- Gill P, Kirkham A, Curran J (2007). *LoComatioN*: a software tool for the analysis of low copy number DNA profiles. *Forensic Sci Int.* 166: 128-138
- Gill P, Sparkes R, Pinchin R, Clayton TM, Whitaker JP, Buckleton J (1998). Interpreting simple STR mixtures using allele peak area. *Forensic Sci Int.* 91: 41-53
- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000). An investigation of the rigor interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int.* 112: 17-40
- Grubwieser P, Muhlmann R, Berger B (2006). A new "miniSTR-multiplex" displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *Int J Leg Med.* 120: 115-120
- Hanson EK, Ballantyne J (2005). Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA. *Anal Biochem.* 346: 246-257
- Hellman A, Rohleder U, Scmitter H, Witting M (2001). STR typing of human telogen hairs – a new approach. *Int J Legal Med.* 114: 269-273
- Internacional SNP Working group, Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S *et al.* (2001). Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they? *Nat Genet.* 27(4): 371-372
- Jasuja OP, Singh GD, Sodhi GS (2006). Development of latent fingerprints on compact disc and its effect on subsequent data recovery. *Forensic Sci Int.* 156: 237-241
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985). Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature.* 316: 76-79
- Kisilevsky AE, Wickenheiser RA (1999). DNA PCR profiling of skin cells transferred through handling. *Proceedings of the Annual Meeting of the Canadian Society of Forensic Science, Edmonton, Alberta.* pp. 17-20
- Ladd C, Adamowicz MS, Bourke MT, Scherczinger CA, Lee HC (1999). A systematic analysis of secondary DNA transfer. *J Forensic Sci.* 44(6): 1270-1272
- Leclair B, Sgueglia JB, Wojtowicz PC, Juston AC, Fregeau CJ, Fournery RM (2003). STR DNA typing: increased sensitivity and efficient sample consumption using reduced PCR reaction volumes. *J Forensic Sci.* 48(5): 1001-1013
- Lima GM (2004). Contribuição do estudo do DNA mitocondrial na resolução de casos forenses. Tese de Mestrado. ICBAS – Universidade do Porto
- Lowe A, Murray C, Richardson P, Wivell R, Gill P, Tully G, Whitaker J (2003). Use of low copy number DNA in forensic inference. *Int Congress Series.* 1239: 799-801

- Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002). The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int.* 129: 25-34
- Pancorbo MM (2006). Faculdade de Farmácia de Vitória, Universidade do País Basco. Comunicação pessoal
- Pang BCM, Cheung BKK (2007). Double swab technique for collecting touched evidence. *Leg Med.* doi:10.1016/j.legalmed.2006.12.003
- Park MJ, Lee HY, Chung U, Kang SC, Shin KJ (2007). Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons. *Int J Legal Med.* 121: 152-157
- Petricevic SF, Bright J, Cockerton SL (2006). DNA profiling of trace DNA recovered from bedding. *Forensic Sci Int.* 159(1): 21-26
- Phipps M, Petricevic S (2007). The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int.* doi:10.1016/j.forsciint.2006.07.010.
- Pinheiro MF (2004). Aplicação do estudo do DNA em criminalística. *Polícia e Justiça.* 3: 157-193
- Pinheiro MF, Cainé L, Pontes L, Abrantes D, Lima G, Pereira MJ, Rezende P (2005). Allele frequencies of sixteen STRs in the population of Northern Portugal. *Forensic Sci Int.* 148(2-3): 221-223
- Qiagen (2005). REPLI-g® Mini/Midi Handbook.
- Raven PH, Johnson GB (1986). Biology. Times Mirror/Mosby College Publishing, St. Louis. pp. 906
- Rutty GN, Hopwood A, Tucker V (2003). The effectiveness of protective clothing in the reduction of potential DNA contamination of the scene of crime. *Int J Legal Med.* 117: 170-174
- Saferstein R (2004). Criminalistics – An introduction to forensic science. Eight Edition. Pearson, Prentice Hall
- Schiffer LA, Bajda EJ, Prinz M, Sebestyen J, Shaler R, Caragine TA (2005). Optimization of a simple, automatable extraction method to recover sufficient DNA from low copy number DNA samples for generation of short tandem repeats profiles. *Croat Med J.* 46(4): 578-586
- Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B (1999). Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis.* 20: 1712-1712
- Schneider PM, Balogh K, Naveran N, Bogus M, Bender K, Lareu M, Carracedo A (2004). Whole genome amplification – the solution for a common problem in forensic casework? *Int Congress Series.* 1261: 24-26

- Sinclair K, McKechnie VM (2000). DNA extraction from stamps and envelope Flaps using QIAamp and QIAshredder. *J Forensic Sci.* 45(1): 229-230
- Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, Disepio D, Hughes MR (1994). *Proc Natl Acad Sci.* 91: 6181-6185
- Sobrino B, Brión M, Carracedo A (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int.* 154: 181-194
- Strom CM, Rechitky S (1998). Use of *nested* PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood. *J Forensic Sci.* 43: 696-700
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med.* 117: 67-74
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24: 3189-3194
- Teraki Y, Shiohara T (1999). Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol.* 67: 413-426
- Tsukada K, Takayanagi K, Asamura H, Ota M, Fukushima H (2002). Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. *Legal Medicine.* 4(4): 239-245
- Vallone P, Butlet J (2004). AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques.* 37: 226-231
- Van Hoofstat DE, Deforce DL, De Pauw I, Janssen K, Mestdagh M (1998). DNA typing of fingerprints and skin debris: sensitivity of capillary electrophoresis in forensic applications using multiplex PCR, in Proceedings of the 2nd European Symposium of Human Identification. pp. 131-137
- Van Oorschot RA, Jones MJ (1997). DNA fingerprints from fingerprints. *Nature.* 387: 767
- Van Oorschot RA, Weston RK, Jones MJ. Retrieval of DNA from touched objects, in Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002). The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int.* 129: 25-34
- Van Oorschot RAH, Phelan DG, Furlong S, Scarfo GM, Holding NL, Cummins MJ (2003). Are you collecting all the available DNA from touched objects?. *Int Congress Series.* 1239: 803-807
- Walsh PS, Erlich HA, Higuchi R. (1992). Preferential PCR amplification of alleles: Mechanisms and solutions. *PCR Meth Appl.* 1:241-250
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996). Sequence analysis and characterization of *stutter* products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* 24: 2807-2812

- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 10: 506-513
- Whitaker JP, Cotton EA, Gill P (2001). A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPF1STR® SGM Plus™ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. *Forensic Sci Int*. 123: 215-223
- Wickenheiser RA. (2002). Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci*. 47(3): 442-450
- Wiegand P, Berger B, Edelmann J, Parson W (2003). Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. *Int J Legal Med*. 117: 62-74
- Wiegand P, Kleiber M (2000). DNA typing of epithelial cells after strangulation. *Int J Legal Med*. 110(4): 181-183
- Wiegand P, Kleiber M (2001). Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int J Legal Med*. 114: 285-287
- Wiegand P, Trubner K, Kleiber M (2000). STR typing of biological stains on strangulation tools. *Progress in Forensic Genetics*. 8: 508-513
- Zamir A, Springer E, Glattstein B (2000). Fingerprints and DNA: STR typing of DNA extracted from adhesive tape after processing for fingerprints. *J Forensic Sci*. 45(3): 687-688