

VANESSA ALEXANDRA ALVES DINIS

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE UMA METODOLOGIA DE
QUANTIFICAÇÃO DIRETA DE DNA E A METODOLOGIA
PADRONIZADA NA ROTINA LABORATORIAL FORENSE**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientadora – Mestre Ana Margarida Ventura Teixeira Bento

Afiliação – Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

Coorientadora – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Afiliação – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

*“Success is not final, failure is not fatal:
it is the courage to continue that counts.”*

Winston Churchill

Agradecimentos

Perto do culminar duma das fases mais trabalhosas na minha formação académica é imprescindível agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a sua concretização.

À Mestre Ana Margarida Bento pela orientação, pela paciência (enorme paciência!) para ler e reler tudo o que escrevi, por todos os conhecimentos transmitidos e apoio prestado, pela amizade e motivação demonstradas durante a elaboração da minha tese.

À Doutora Ana Luísa Pereira pela motivação e entusiasmo contagiante que demonstrou no decorrer deste trabalho, pela sua disponibilidade no esclarecimento de todas as dúvidas que tive e por contribuir com uma nova visão e conhecimentos, o que permitiu enriquecer bastante esta dissertação.

À Professora Doutora Maria José Pinto da Costa pela disponibilidade, por todo o apoio e conhecimentos transmitidos durante estes dois anos de Mestrado.

À Dra. Maria João Anjos gostaria de agradecer a oportunidade dada de realizar esta dissertação no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP.

À Dra. Virgínia Lopes, Dr. Armando Serra, Mestre Pedro Brito, Doutora Vanessa Bogas, Mestre Marta Bento, Mestre Lisa Andrade, Mestre Filipa Balsa e restante equipa do SGBF-C, pela forma como me receberam, e por todos os conhecimentos teóricos e práticos transmitidos. Um agradecimento especial à Mestre Nair Gouveia por me ter acompanhado e ajudado durante a realização de algumas etapas da componente prática.

Aos meus amigos, peço sobretudo desculpa pelos cafés, jantares e reuniões às quais faltei. Obrigada por terem sempre disponível uma palavra encorajadora e acreditarem em mim.

Ao Duda por nunca me deixar desanimar, por toda a amizade, apoio e compreensão incessante.

Por fim, quero agradecer à minha família. Especialmente aos meus pais e Avó Lia, sem os quais nunca teria sido possível alcançar este feito. Obrigada por todo o apoio e incentivo.

A todos, o meu muito obrigado.

Lista de Abreviaturas

% – Percentagem

µL – Microlitro

AB – Applied Biosystems

Alvo LA – *Large Autosomal Target*

Alvo SA – *Small Autosomal Target*

C_T – *Cycle Threshold*

CTRL (+) – Controlo positivo da reação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTT – Ditionotritol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FRET - Transferência de energia de fluorescência (*Fluorescence resonance energy transfer*)

ID – Índice de degradação (*Degradation Index*)

IPC – Controlo Interno da PCR (*Internal PCR Control*)

Kit GlobalFiler[®] – *Kit GlobalFiler[®] PCR Amplification*

Kit PowerQuant[™] – *Kit PowerQuant[™] System (PQ)*

Kit PrepFiler – *Kit PrepFiler Express[™] Forensic DNA Extraction*

Kit Quantifiler[®] Trio – *Kit Quantifiler[®] Trio DNA Quantification (QT)*

L – Litro

M – Molar (mol/L)

M:F – Proporção DNA masculino:DNA feminino

mm – Milímetro

ng – Nanograma

nm - Nanometro

NTC – *No Template Control*

°C – Graus

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pg - Picograma

Q – Molécula *quencher*

qPCR - PCR em tempo real

R – Fluorocromo *reporter*

RFU – Unidades relativas de fluorescência

RPM – Rotações por minuto

SGBF-C – Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*

Std. – *Standard*

STRs – *Short Tandem Repeats*

Taq - *Thermus aquaticus*

TE – Tris-EDTA

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UV – Ultravioleta

VNTRs – *Variable Number of Tandem Repeats*

σ – Desvio padrão

A obtenção do perfil genético de uma amostra biológica pode ser efetuada através do estudo do DNA nuclear com recurso aos STRs. Num laboratório forense, o fluxo de trabalho no âmbito da criminalística biológica envolve a seleção de amostras consideradas suspeitas, a extração/purificação, a quantificação do DNA e a posterior amplificação dos STRs. Sendo a reação de PCR fortemente afetada pela quantidade de DNA adicionado à reação é fulcral saber a quantidade de DNA presente numa amostra, de modo a adicionar à reação de amplificação o *input* ideal de DNA.

A quantificação direta consiste numa metodologia de PCR em tempo real na qual é colocado no poço de reação um *punch* de 0,5 mm de uma amostra biológica sem que esta tenha sido previamente submetida a uma etapa de extração.

Deste modo, o principal objetivo deste estudo consistiu em avaliar a viabilidade da implementação de uma metodologia de quantificação direta de DNA no fluxo de trabalho da rotina laboratorial forense. Para isso, foram realizadas manchas de sangue, saliva e sêmen em diversos suportes (cartão FTA[®], ganga, algodão e lâmina de vidro). O fluído biológico presente no cartão FTA[®] (amostra de referência) foi diretamente quantificado, enquanto os fluídos presentes nos restantes suportes foram, previamente à quantificação direta, humedecidos e de seguida transferidos para tiras de limpeza (amostras problema). Cada amostra diretamente quantificada teve uma réplica submetida a um método de extração antes da sua quantificação.

De acordo com os resultados, verificou-se que as amostras diretamente quantificadas foram pontualmente suscetíveis a efeitos de inibição e/ou apresentaram níveis de degradação variáveis. Contudo, estes resultados não afetaram a qualidade dos perfis genéticos, pelo que foi possível obter um perfil completo em 23 das 28 amostras amplificadas.

Todas as amostras de referência diretamente quantificadas apresentaram concentrações de DNA acima de 0,3 ng/*punch*, sendo, portanto, expectável que apresentassem um perfil genético completo. Em relação às amostras problema, verificou-se uma maior variabilidade nos resultados. As tiras de limpeza realizadas a partir dos suportes não porosos (lâminas) foram, de todas as amostras problema, as que exibiram concentrações superiores de DNA. Relativamente aos suportes porosos, as amostras de sêmen apresentaram concentrações mais elevadas de DNA, enquanto as tiras de limpeza diretamente quantificadas das amostras de saliva e de sangue em ganga apresentaram

concentrações ligeiramente superiores às de algodão. As tiras de limpeza extraídas a partir das amostras de sangue e saliva em algodão apresentaram concentrações superiores de DNA.

Tendo como referência os resultados de quantificação de amostras submetidas à metodologia de quantificação direta foi possível determinar o *input* ótimo de DNA para a subsequente amplificação direta dessas mesmas amostras. Assim sendo, a combinação destas duas metodologias permite a obtenção de um fluxo de trabalho mais simples, com resultados mais rápidos e processos menos dispendiosos.

Palavras-chave: quantificação direta de DNA; amplificação direta por PCR; rotina laboratorial forense; PCR em tempo real.

The acquisition of the genetic profile from a biological sample can be performed through the study of nuclear DNA using STR markers. In a forensic laboratory, the workflow concerning biological criminalistics involves the selection of suspicious samples, the extraction/purification, the quantification of DNA and subsequent amplification of STRs. Being the PCR reaction strongly affected by the amount of DNA added to the reaction is crucial to know the amount of DNA present in a sample, in order to add the optimal input of DNA to the amplification reaction.

Direct quantification consists in a real-time PCR method in which it is placed in the reaction well one punch of 0.5 mm from a biological sample without it having previously been subjected to an extraction step.

Therefore, the main objective of this study was to evaluate the feasibility of implementing a methodology of direct quantification of DNA in the routine workflow of a forensic laboratory. For this, blood, saliva and semen stains were performed on various supports (FTA[®] card, denim, cotton and glass slide). The biological fluid present in the FTA[®] card (reference sample) was directly quantified, while the fluids present in the remaining supports were, prior to direct quantification, moistened and then transferred to cleaning strips (evidence sample). Each directly quantified sample had a replica subjected to an extraction method before quantification.

According to the results, it was found that directly quantified samples are occasionally susceptible to inhibition effects and/or exhibit variable levels of degradation. However, these results did not affect the quality of genetic profiles, so it was possible to obtain a complete profile on 23 of the 28 amplified samples.

All reference samples directly quantified exhibit DNA concentrations above 0.3 ng/punch and are therefore expected to present a complete genetic profile. Regarding the evidence samples, there was found more variability in the results. The cleaning strips held from non-porous supports (slides) were, of all evidence samples, the ones that exhibited higher concentrations of DNA. In relation to porous supports, semen samples had higher concentrations of DNA, while the cleaning strip directly quantified from samples of saliva and blood on denim had slightly higher concentrations than those on cotton. Extracted cleaning strips of blood and saliva samples on cotton had higher concentrations of DNA.

Having as reference the results of quantification of samples subjected to direct quantification methodology it was possible to determine the optimal input for the subsequent

direct amplification of these same samples. Therefore, the combination of these two methods allows to obtain a simpler workflow with faster results and less costly procedures.

Keywords: direct DNA quantitation; direct PCR amplification; forensic workflow; real-time PCR.

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Aplicações do DNA em Genética Forense	1
1.2. Extração de DNA.....	5
1.3. Quantificação de DNA	7
1.3.1. Metodologia de quantificação - PCR em tempo real (qPCR)	9
1.3.2. Tecnologia <i>TaqMan</i> ®	10
1.3.3. Quantificação direta de DNA	13
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Normas laboratoriais.....	23
3.2. Seleção e elaboração das amostras em estudo.....	24
3.2.1. Amostras de referência.....	24
3.2.2. Amostras simuladas	25
3.2.2.1. Amostras de mistura.....	27
3.2.3. Transferência do material biológico	27
3.3. Procedimentos laboratoriais	28
3.3.1. Extração de DNA	28
3.3.1.1. Extração de DNA pelo método do <i>Chelex</i> ®	29
3.3.1.2. Extração automática de DNA pelo <i>Automate Express Forensic DNA Extraction System</i> com recurso ao <i>kit PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction</i>	30
3.3.2. Quantificação de DNA.....	31
3.3.2.1. Quantificação de DNA com recurso ao <i>kit Quantifiler® Trio DNA Quantification</i>	31
3.3.2.2. Quantificação de DNA com recurso ao <i>kit PowerQuant™ System</i>	35

3.3.2.3. Análise dos resultados de quantificação	38
3.3.3. Metodologia de amplificação – <i>Kit GlobalFiler® PCR Amplification</i>	40
3.3.3.1. Análise dos produtos amplificados	41
4. Resultados e Discussão	45
4.1. Exatidão e/ou Precisão.....	45
4.1.1. Exatidão dos <i>standards</i> e controlos positivos – <i>kit Quantifiler® Trio</i>	45
4.1.2. Exatidão e Precisão dos <i>standards</i> e controlos positivos – <i>kit PowerQuant™</i>	48
4.2. Efeito do <i>punch</i> de 0,5 mm no nível de fluorescência da linha basal.....	52
4.3. Repercussões da alteração das configurações da linha basal nos resultados da qPCR para o <i>kit Quantifiler® Trio</i>	55
4.4. Resultados de quantificação de DNA de amostras de referência	62
4.4.1. Amostras de sangue, saliva e sémen quantificadas com o <i>kit Quantifiler® Trio</i>	63
4.4.2. Amostras de sangue, saliva e sémen quantificadas com o <i>kit PowerQuant™</i>	67
4.5. Resultados de quantificação de DNA de amostras simuladas	71
4.6. Transferência do material biológico dos suportes porosos para as tiras de limpeza	77
4.7. Amostras de mistura M:F	78
4.8. Perfis genéticos obtidos com o <i>kit</i> de amplificação <i>GlobalFiler®</i>	79
5. Conclusão	91
6. Referências Bibliográficas	95
Anexos	100

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo do percurso laboratorial das perícias normalmente realizadas nos laboratórios forenses.....	4
Figura 2. Esquema representativo das metodologias utilizadas na extração de DNA.	6
Figura 3. Representação do resultado da amplificação de um marcador heterozigótico, na presença de uma amostra com: (a) excesso de DNA; (b) pouco DNA; (c) concentração de DNA ideal.	8
Figura 4. Ilustração dos métodos de monitorização de fluorescência.	10
Figura 5. Representação esquemática da tecnologia <i>TaqMan</i> [®] , durante as fases de polimerização, extensão de primers e hidrólise da sonda.	11
Figura 6. Detecção do produto da qPCR e as suas fases.....	12
Figura 7. Curva de calibração obtida a partir de diferentes amostras com concentrações conhecidas de DNA (a,b,c,d,e).	13
Figura 8. Ilustração da metodologia padronizada de quantificação de DNA <i>versus</i> a metodologia de quantificação direta de DNA.	14
Figura 9. Espectros de emissão dos fluorocromos utilizados dos <i>kits</i> estudados na PCR em tempo real.....	15
Figura 10. Exemplo da elaboração das manchas: (a) em cartão FTA [®] <i>Indicating</i> e (b) em ganga, algodão e lâminas de vidro.	25
Figura 11. Observação e confirmação microscópica da presença de células do epitélio bucal intacto.....	26
Figura 12. Objeto utilizado para transferir o material biológico dos diversos suportes para a tira de limpeza.	28
Figura 13. Preparação das diluições seriadas, a partir de uma solução stock de 100ng/μL e do tampão de diluição <i>Quantifiler</i> [®] <i>THP DNA Dilution Buffer</i>	33

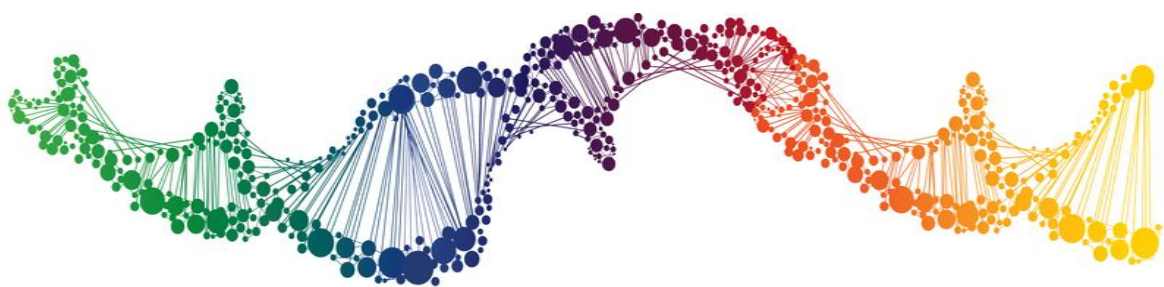
Figura 14. Preparação das diluições em série a partir da solução <i>PowerQuant™ Male gDNA Standard</i>	37
Figura 15. Aba do software <i>HID Real-Time PCR</i> que permite realizar alterações nas definições do <i>threshold</i> e intervalo de linha basal.....	39
Figura 16. Curvas de calibração obtidas no ensaio de quantificação dos <i>standards</i> e respetivos coeficientes de determinação (R^2).	45
Figura 17. Valores das médias dos C_T para cada <i>Standard</i> (STD) relativamente ao alvo SA com recurso ao kit <i>Quantifiler® Trio</i>	47
Figura 18. Curvas de calibração obtidas para as quatro corridas de quantificação dos <i>standards</i> e respetivos coeficientes de determinação (R^2).	49
Figura 19. Valores das médias dos C_T para cada <i>Standard</i> (STD) para o alvo autossómico com recurso ao kit <i>PowerQuant™</i>	50
Figura 20. Intensidade de fluorescência obtida a partir dos diferentes <i>reporters</i> durante a reação de qPCR nas seguintes condições: (a) <i>Quantifiler® Trio</i> - NTC sem <i>punch</i> ; (b) <i>Quantifiler® Trio</i> - NTC com <i>punch</i> de 0,5 mm; (c) <i>PowerQuant™</i> - NTC sem <i>punch</i> ; (d) <i>PowerQuant™</i> - NTC com <i>punch</i> de 0,5 mm.....	53
Figura 21. Gráfico <i>Raw Data</i> de reações NTC com e sem <i>punch</i> realizadas com os kits <i>Quantifiler® Trio</i> e <i>PowerQuant™</i>	54
Figura 22. Curvas de calibração obtidas no ensaio com um <i>punch</i> de 0,5 mm no poço de reação.	55
Figura 23. Resultados obtidos da quantificação das amostras extraídas de sangue em cartão FTA® (<i>kit QT</i>).	63
Figura 24. Resultados obtidos da quantificação direta das amostras de sangue em cartão FTA® (<i>kit QT</i>).	64
Figura 25. <i>Amplification Plots</i> das amostras diretamente quantificadas: (a) Sg.02; (b) Sg.06.....	65
Figura 26. Resultados obtidos da quantificação das amostras extraídas de saliva e sémen em cartão FTA® (<i>kit QT</i>).	66

Figura 27. Resultados obtidos da quantificação direta das amostras de saliva e sémen em cartão FTA® (<i>kit</i> QT).....	66
Figura 28. Resultados obtidos da quantificação das amostras extraídas de sangue em cartão FTA® (<i>kit</i> PQ).	68
Figura 29. Resultados obtidos da quantificação direta das amostras de sangue em cartão FTA® (<i>kit</i> PQ).	68
Figura 30. Resultados obtidos da quantificação das amostras extraídas de saliva e sémen em cartão FTA® (<i>kit</i> PQ).	70
Figura 31. Resultados obtidos da quantificação direta das amostras de saliva e sémen em cartão FTA® (<i>kit</i> PQ).	70
Figura 32. Resultados de quantificação dos tecidos extraídos de algodão e ganga nos quais foram depositados sangue (Sg), saliva (Sl) e sémen.	72
Figura 33. Resultados da quantificação das tiras de limpeza extraídas dos tecidos de algodão e ganga nos quais foram depositados sangue (Sg), saliva (Sl) e sémen.....	73
Figura 34. Resultados da quantificação direta das tiras de limpeza dos tecidos de algodão e ganga nos quais foram depositados sangue (Sg), saliva (Sl) e sémen.	73
Figura 35. Quantificação das tiras de limpeza extraídas das lâminas de vidro nas quais foram depositadas sangue (Sg) e saliva (Sl).....	75
Figura 36. Quantificação direta das tiras de limpeza das lâminas de vidro nas quais foram depositadas sangue (Sg) e saliva (Sl).....	75
Figura 37. Perfil genético da amostra SI.08_Algodão diretamente quantificada (a) injetada durante 10 segundos (A25); (b) reinjetada durante 40 segundos (A26).	82
Figura 38. Perfil genético da amostra SI.01_Ganga diretamente quantificada (a) injetada durante 10 segundos (A21); (b) reinjetada durante 40 segundos (A22).	82
Figura 39. Perfil genético das amostras de Sémen: (a) diretamente quantificada (A5); (b) tira de limpeza extraída (A2).	84

Índice de Tabelas

Tabela 1. Natureza das manchas e soluções de limpeza utilizadas e os respectivos volumes.	27
Tabela 2. Alvos do <i>kit Quantifiler® Trio</i>	32
Tabela 3. Componentes e volumes utilizados em cada reação de quantificação com recurso ao <i>kit Quantifiler® Trio</i>	34
Tabela 4. Alvos do <i>kit PowerQuant™</i>	36
Tabela 5. Componentes e volumes utilizados para cada reação de quantificação com recurso ao <i>kit PowerQuant™</i>	38
Tabela 6. Volumes necessários para cada reação de amplificação.	40
Tabela 7. Número de <i>punches</i> adicionados à reação de amplificação com base no resultado de quantificação.	41
Tabela 8. Programa de amplificação do <i>kit GlobalFiler®</i>	41
Tabela 9. Concentrações de DNA obtidas com o <i>kit Quantifiler® Trio</i> para cada um <i>standards</i> e respetivas médias, desvios padrão, coeficientes de variação, bem como diferença entre a concentração obtida <i>versus</i> concentração esperada.	46
Tabela 10. Concentrações obtidas com o <i>kit Quantifiler® Trio</i> para os três controlos positivos.	48
Tabela 11. Concentrações de DNA obtidas com o <i>kit PowerQuant™</i> para cada um dos <i>standards</i> e respetivas médias, desvios padrão, coeficientes de variação e diferença entre concentração obtida <i>versus</i> concentração esperada.	50
Tabela 12. Concentrações obtidas com o <i>kit PowerQuant™</i> para os três controlos positivos.	51
Tabela 13. Concentrações esperadas <i>versus</i> concentrações de DNA obtidas com o <i>kit Quantifiler® Trio</i> para os alvos SA e Y.	57
Tabela 14. Concentração de DNA total para cada Intervalo de linha basal estudado e respetiva diferença entra concentração obtida <i>versus</i> concentração esperada.	60

Tabela 15. Concentrações esperadas <i>versus</i> concentrações de DNA obtidas com o <i>kit Quantifiler® Trio</i> para os alvos SA, LA e Y após a alteração das configurações da linha basal.	60
Tabela 16. Índice de degradação (ID) obtido nos diferentes <i>standards</i> para quantificações sem punch e com um <i>punch</i> para os intervalos de linha basal de 3-15 e 11-18.	62
Tabela 17. Percentagem de DNA transferido dos diferentes tecidos para as respectivas tiras de limpeza.	77
Tabela 18. Resultados de quantificação esperados <i>versus</i> obtidos com a metodologia de quantificação direta nas diferentes proporções M:F.	78
Tabela 19. Condições de quantificação e amplificação das amostras singulares.	80
Tabela 20. Resultados da amplificação de todas as amostras singulares segundo os marcadores presentes no <i>kit GlobalFiler®</i>	85
Tabela 21. Condições de quantificação e amplificação das amostras de mistura M:F.	86



Introdução

1.1. Aplicações do DNA em Genética Forense

O estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA) tem permitido o desenvolvimento de grandes avanços científicos na área da Genética Forense.

Decorria o ano de 1986 quando Kary Mullis descreveu pela primeira vez a técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – **PCR**), a qual viria a revolucionar a investigação forense [1]. Esta técnica permite amplificar milhões de vezes uma molécula de DNA, pelo que a sua utilização na rotina laboratorial forense permite assegurar a identificação genética de um maior número de amostras biológicas, as quais contêm por vezes quantidades diminutas de DNA e/ou encontram-se degradadas [1, 2].

O DNA encontra-se presente em todas as células nucleadas de um organismo, sendo que o genoma humano engloba toda a informação genética contida no interior do núcleo e das mitocôndrias, tratando-se, respetivamente, do DNA nuclear e do DNA mitocondrial. O DNA nuclear é o mais comumente utilizado nas perícias forenses, sendo composto por 46 cromossomas autossómicos e 2 cromossomas sexuais [3, 4].

Os cromossomas são constituídos por regiões codificantes e não codificantes. As regiões codificantes, também denominadas genes, transmitem à célula a informação necessária para produzir proteínas. O restante DNA genómico corresponde às regiões não codificantes, as quais apresentam uma função biológica desconhecida e são constituídas por sequências repetitivas de DNA altamente polimórficas, as quais permitem estabelecer a discriminação genética individual [4, 5].

Na realidade, presume-se que cerca de 99,7% do genoma seja igual de indivíduo para indivíduo encontrando-se diferenças unicamente numa porção de 0,3% [5, 6]. A comunidade científica acredita que essa pequena diferença é o que nos torna indivíduos geneticamente únicos, com exceção dos gémeos homozigóticos. Estudos recentemente realizados afirmam que, apesar de não ser possível encontrar nos “gémeos verdadeiros” diferenças na tipagem de marcadores *short tandem repeats* (STRs), estes podem apresentar desigualdades em *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), bem como em porções do DNA mitocondrial [7, 8].

Os polimorfismos genéticos podem ser definidos como variações no DNA existentes nos indivíduos de uma população cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1% dessa população. Os polimorfismos podem ser divididos em polimorfismos de sequência (ex. SNPs), os quais resultam da alteração de uma única base nucleotídica, ou em polimorfismos de comprimento (ex. STRs), os quais apresentam repetições em tandem, de uma determinada sequência de nucleótidos, podendo variar no número de repetições.

As repetições em tandem são classificadas em minissatélite e microssatélite, de acordo com o tamanho da unidade de repetição, bem como o tamanho da sequência de repetição. Os minissatélites, também designados *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs), contêm sequências de repetição que variam entre 400 pares de bases (pb) a 1000 pb, com um tamanho de 8 a 100 pb por unidade de repetição. Os microssatélites, também conhecidos como STRs, são constituídos por unidades de repetição de 2 a 7 pb, sendo que as repetições variam entre 100 a 400 pb [3, 4].

As regiões hipervariáveis do genoma proporcionam a discriminação entre os indivíduos de uma população, uma vez que o número de vezes que a sequência se repete origina formas alternativas denominadas alelos, as quais são variáveis de indivíduo para indivíduo [4, 5]. A designação *locus* (plural: *loci*) refere-se à posição cromossômica ou à localização de um gene ou de um marcador genético. Neste sentido, o genótipo é definido pelos alelos presentes num dado *locus* de cromossomas homólogos e a informação genética de todos os *loci* analisados corresponde à tipagem do perfil genético de DNA. Este pode ser obtido a partir de qualquer amostra biológica (sangue, saliva, sêmen, entre outras) de um indivíduo.

Assim sendo, a Genética Forense é o ramo da genética que recorre ao estudo da molécula de DNA para analisar e interpretar evidências biológicas no âmbito jurídico. No âmbito forense, o estudo do DNA ocorre exclusivamente nas regiões não codificantes, sendo os STRs com unidades de repetição tetranucleotídicas os marcadores genéticos de eleição para fins de identificação humana. Isto deve-se às inúmeras vantagens que apresentam, nomeadamente devido à sua abundância no genoma humano, elevado poder discriminativo, pequena dimensão em comparação com os VNTRs e pela diminuição da existência de artefactos (por ex. picos *stutter*) que dificultam a interpretação de resultados, especialmente em situações com material genético de mistura de diferentes indivíduos [3, 9, 10].

Os marcadores genéticos podem ser estudados nos autossomas e/ou nos cromossomas sexuais, sendo os primeiros os que proporcionam maior poder de discriminação, uma vez que nos autossomas ocorre troca aleatória de material genético durante a meiose (recombinação genética), dando origem a maior variabilidade genética. Os marcadores do cromossoma Y possuem um menor poder de discriminação, uma vez que são herdados em bloco por via paterna, ou seja, todos os indivíduos pertencentes à mesma linhagem paterna possuem a mesma informação genética no cromossoma Y (exceto devido a efeitos mutacionais). Contudo, apesar desta característica, o estudo do cromossoma Y tem-se revelado de grande importância nas perícias de criminalística biológica, especialmente nos crimes sexuais, permitindo em alguns casos determinar o perfil masculino em misturas de DNA masculino com DNA feminino quando este último se encontra em excesso, sendo amplificada somente a componente masculina.

Como já foi dito, a principal meta de um laboratório de Genética Forense consiste em obter um perfil genético a partir de uma dada amostra. Para isso, a generalidade dos laboratórios forenses utiliza os STRs de forma a obterem um perfil genético a partir de amostras biológicas relacionadas principalmente com perícias no âmbito do parentesco biológico, da criminalística biológica ou da identificação genética individual.

Nas perícias no âmbito da criminalística biológica a análise do DNA implica a comparação entre duas amostras, uma amostra problema sob a forma de evidência biológica encontrada na cena do crime e/ou recolhida da vítima e uma amostra de referência habitualmente colhida a um suspeito. Deste modo, a interpretação dos resultados de qualquer perícia baseia-se na comparação de perfis genéticos, sendo os possíveis resultados: uma inclusão/correspondência, uma exclusão ou um resultado inconclusivo. Um resultado inconclusivo pode ser observado em amostras com perfis de DNA parciais ou muito complexos devido a DNA degradado, em pouca quantidade ou em misturas desproporcionadas. De forma a se obterem resultados mais precisos e reduzir a possibilidade de uma correspondência aleatória são sempre examinados múltiplos *loci*.

As perícias no âmbito da criminalística biológica acarretam uma grande responsabilidade pois podem conduzir à identificação de um suspeito/arguido ou ilibar um inocente [11]. Por vezes a quantidade de DNA pode variar consideravelmente entre diferentes amostras, o que poderá eventualmente comprometer a obtenção do perfil genético [5]. Isto ocorre principalmente em situações nas quais o material genético é exíguo e encontra-se frequentemente degradado, podendo conduzir a uma identificação parcial ou mesmo nula. De forma a minimizar estas circunstâncias e para se conseguir recuperar um maior número de alelos de uma amostra forense, esta deve ser corretamente

processada. Nesse sentido, é fulcral o correto desempenho de todas as etapas da análise forense (Figura 1).

Nos três tipos de perícias supramencionadas são colhidas amostras biológicas e/ou é recebido material biológico. Este deve ser armazenado e preservado corretamente para posteriormente se proceder com a extração do DNA das células, e de seguida determinar a quantidade de DNA através de uma metodologia de quantificação. Após estas etapas o DNA é amplificado por PCR, seguindo-se a separação e detecção dos fragmentos por um processo denominado eletroforese capilar [3, 12]. Por fim, os eletroferogramas são interpretados, definindo-se assim o perfil genético da amostra após o percurso laboratorial apropriado para cada amostra (Figura 1).

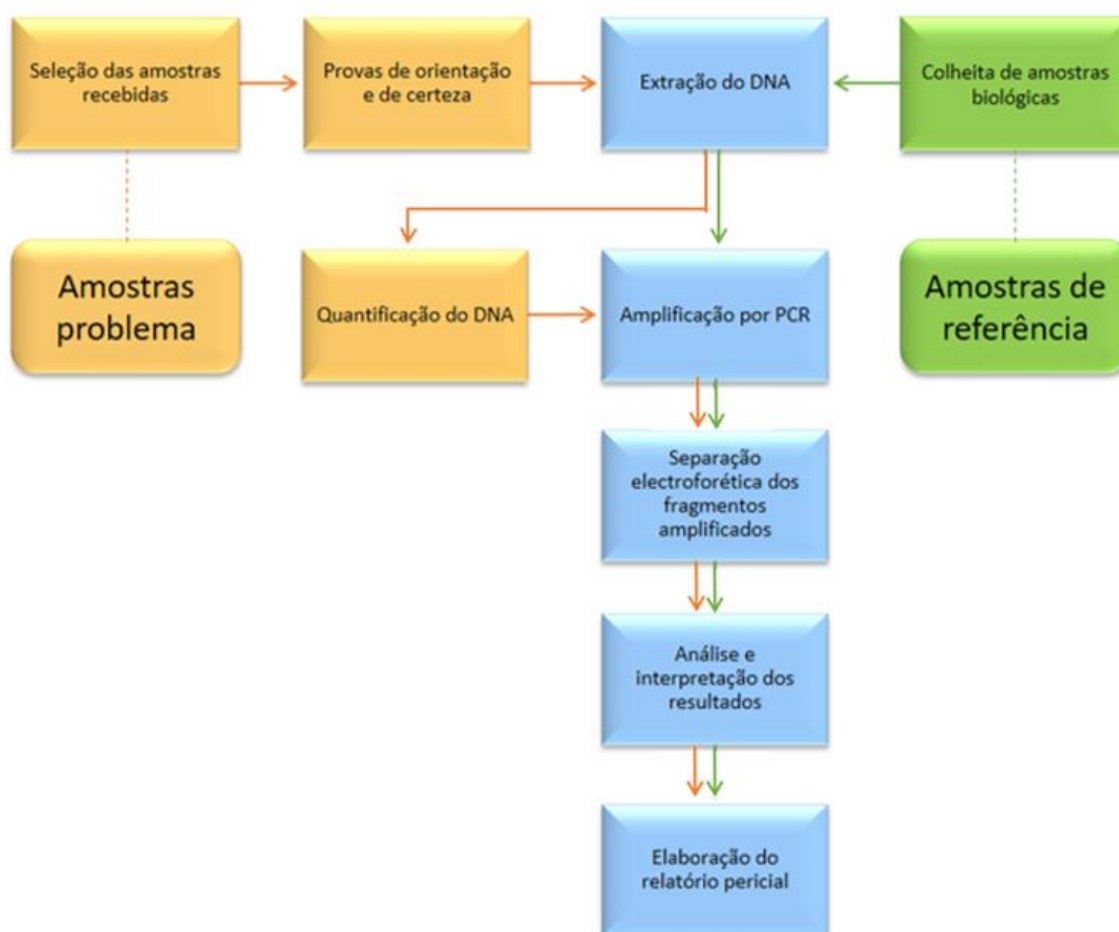


Figura 1. Esquema representativo do percurso laboratorial das amostras problema e das amostras de referência na rotina forense.

O trajeto a azul é comum no processamento das amostras problema e das amostras de referência.

1.2. Extração de DNA

Habitualmente, as amostras processadas em genética forense contêm inúmeras substâncias para além de DNA, nomeadamente componentes proteicos que dificultam as subsequentes etapas de estudo do DNA. Assim sendo, por norma, as moléculas de DNA são separadas do restante material celular, com recurso a métodos de extração, antes da realização de outros ensaios [3].

A extração de DNA tem como principais objetivos remover eventuais impurezas, além de inibidores da PCR, bem como extrair DNA em quantidade suficiente de forma a se conseguir obter um perfil genético [13]. Existem diversos métodos disponíveis para a extração de DNA, pelo que a escolha depende de inúmeros fatores, particularmente o tipo de amostra, o suporte onde se encontra e a quantidade de material biológico que se pressupõem estar presente.

A maioria dos procedimentos de extração de DNA compreende a lise celular, seguida da desnaturação das proteínas bem como a separação do DNA dos restantes componentes celulares e, por fim, uma última etapa que isola o DNA das proteínas desnaturadas e de outros componentes celulares [5]. Atualmente, algumas das metodologias de extração de DNA utilizadas nos laboratórios de genética forense são: a extração em fase sólida, a extração por *Chelex* e a extração a partir de uma matriz sólida (Figura 2).

A extração por *Chelex* possibilita a obtenção de uma quantidade razoável de DNA, de uma forma simples e rápida, sendo que, ao contrário de outras metodologias de extração, como por exemplo o *Prep-n-Go*, permite a posterior quantificação de amostras de referência. Porém, este método é incapaz de remover de forma eficaz vários inibidores da PCR [14, 15, 16].

Para a extração de amostras problema têm vindo a ser desenvolvidos inúmeros *kits* comerciais com base na extração de DNA com recurso a uma fase sólida, que permite a sua purificação. Estes *kits* permitem remover a maioria dos inibidores, ao mesmo tempo que concentram a amostra, pelo que é possível obter um perfil genético com uma menor quantidade de amostra [17].

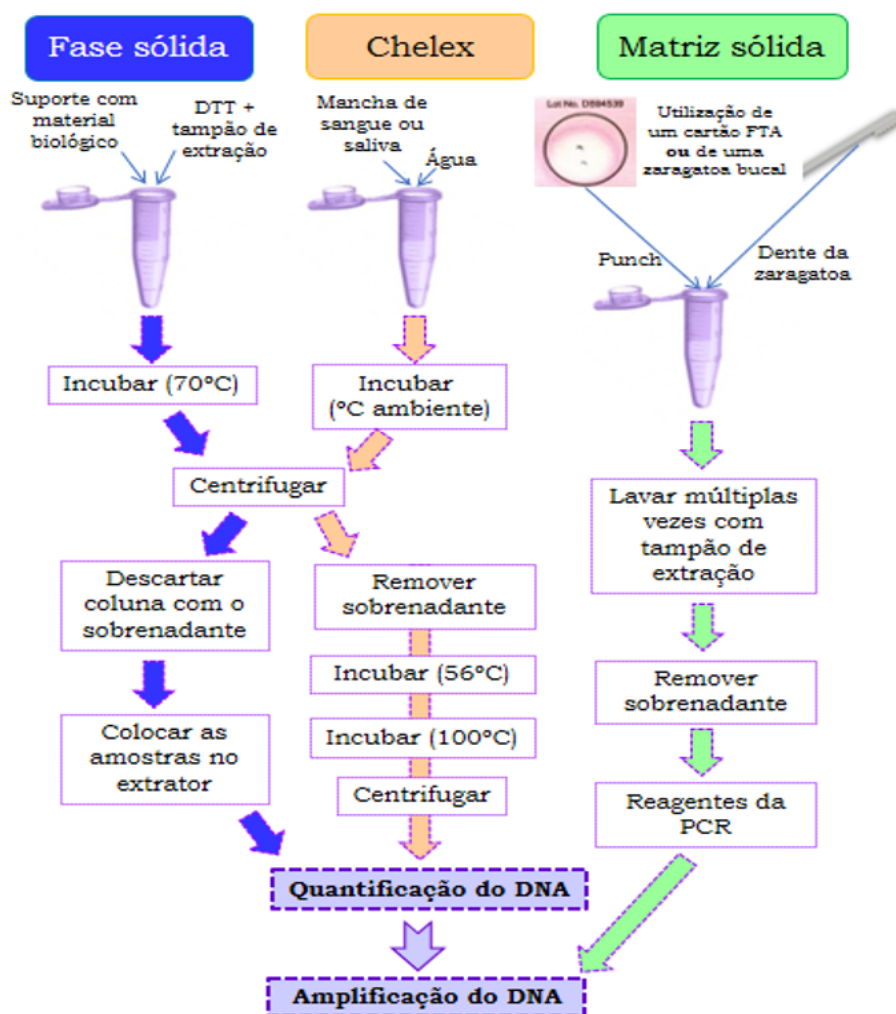


Figura 2. Esquema representativo de algumas das metodologias utilizadas na extração de DNA.

O percurso da extração em fase sólida tem por base o procedimento realizado com recurso ao kit *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction*.

O processo de extração é potencialmente a etapa onde a amostra de DNA é mais suscetível à contaminação [3]. Nesse sentido, independentemente da metodologia empregue, todas as amostras devem ser cuidadosamente manipuladas para evitar contaminações cruzadas ou a introdução de DNA exógeno. É também por esta razão que os laboratórios normalmente optam por processar as amostras de referência num local diferente das amostras problema.

Recentemente, têm vindo a ser desenvolvidos *kits* de amplificação, designados de “*direct*”, que obviem a fase de extração do DNA. Neste caso, as amostras biológicas deverão ser, preferencialmente, colhidas em cartões FTA®, os quais contêm substâncias químicas que promovem a lise celular, a desnaturação das proteínas e protegem os ácidos nucleicos das nucleases, de processos oxidativos, bem como de danos provocados pela

luz UV [18]. Os cartões FTA[®] têm sido habitualmente utilizados para armazenar manchas de sangue e de saliva (células do epitélio bucal).

Adicionalmente, os *kits* “*direct*” também proporcionam uma maior tolerância aos inibidores comuns e um aumento de sensibilidade, que possibilita a obtenção de perfis genéticos completos a partir de quantidades muito exíguas de DNA. Estes *kits* também possuem a robustez necessária para a caracterização genética de amostras degradadas, através da inclusão de *loci* miniSTR [11]. Os miniSTRs são polimorfismos de DNA cujos produtos de amplificação possuem tamanhos inferiores a 150 pb. Amostras muito degradadas ou com um número reduzido de moléculas de DNA, ao serem amplificadas com recurso ao estudo de miniSTRs podem originar perfis completos devido ao menor tamanho dos fragmentos amplificados [19].

Outra variante, comercializada pela Whatman, são os cartões FTA[®] *Indicating* (*Indicating FTA[®] Micro Card*), os quais possuem na sua composição um corante inerte que muda de rosa para branco quando a amostra é aplicada. São recomendados para utilização com amostras incolores, como células epiteliais bucais ou saliva, as quais são colhidas com recurso a uma zaragatoa esponjosa que é de seguida pressionada contra um cartão FTA[®] *Indicating*, havendo desta forma transferência do material genético colhido.

1.3. Quantificação de DNA

A quantificação de DNA permite determinar a quantidade de DNA presente numa amostra, sendo um procedimento recomendado por inúmeras entidades internacionais, tal como a *European Network of Forensic Science Institutes* [20].

A quantificação de DNA é essencial para garantir a qualidade dos ensaios, principalmente em casos com amostras biológicas degradadas ou com baixo número de cópias de DNA [21, 22]. Permite, igualmente, decidir qual o melhor ensaio e *kit* comercial a ser utilizado posteriormente, como também obter informações acerca do estado de degradação e/ou da presença de inibidores na amostra [21, 23]. Infelizmente, apesar de todos os avanços já alcançados na área da investigação forense, o estudo do DNA ainda apresenta algumas limitações que incluem as dificuldades na obtenção de resultados quando o material genético é exíguo ou se encontra excessivamente degradado. A degradação do DNA pode ocorrer devido inúmeros fatores ambientais, tais como altas temperaturas, a ação de nucleases, humidade e tempo de duração da exposição a estes

fatores, sendo a degradação das amostras um dos maiores obstáculos na análise e obtenção de perfis genéticos num laboratório forense. Também é frequente a presença de inibidores da técnica de PCR, entre os quais a melanina dos cabelos, a ureia, o grupo heme da hematina, e o índigo (tinta têxtil utilizada em certos tipos de tecido, nomeadamente ganga), podendo estes serem facilmente extraídos juntamente com o DNA da amostra. Os inibidores podem interferir com a amplificação quando: 1) se ligam aos nucleótidos impedindo a replicação da cadeia de DNA molde; 2) se ligam ao DNA molde; ou 3) inibem a ação da DNA polimerase por ligação dos inibidores ao local de ação da polimerase [3, 24, 25]. Assim sendo, a avaliação do estado de degradação do DNA e a determinação da presença de inibidores numa amostra são importantes para a escolha da metodologia a utilizar.

A determinação quantitativa de DNA é relevante para a grande maioria dos ensaios que utilizam a técnica de PCR, devido ao estreito intervalo de concentração de DNA no qual estes ensaios apresentam melhores resultados. O intervalo ótimo de concentração, por norma, situa-se entre os 0,5 a 2,0 ng de DNA [5, 26, 27]. O excesso de DNA numa amostra poderá saturar a reação, fazendo com que apareçam artefactos da PCR, nomeadamente produtos *stutter*, os quais podem dificultar a análise do perfil (Figura 3a) [3]. Já em baixa quantidade, poderá acarretar a perda de um dos alelos quando o indivíduo é heterozigótico (*allele drop-out*) devido ao efeito estocástico, o que originará uma falsa homozigotia (Figura 3b), ou mesmo a não amplificação dos mesmos (*locus drop-out*) [5, 28]. Se a amostra não contiver a concentração de DNA ideal para a amplificação, esta quantidade deve ser ajustada antes de ser amplificada (Figura 3c). Caso a amostra tenha quantidade superior à necessária, então a amostra deverá ser diluída; caso a amostra tenha quantidade de DNA inferior, deverá ser concentrada. Por estas razões, é importante estimar a concentração da amostra antes de efetuar a sua amplificação.

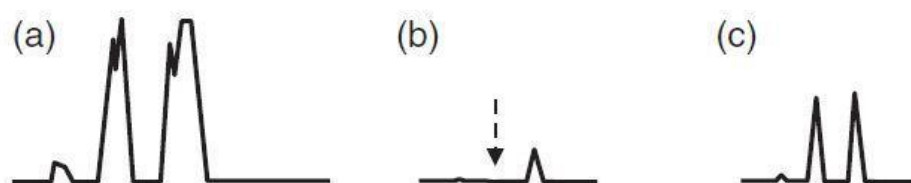


Figura 3. Representação do resultado da amplificação de um marcador heterozigótico, na presença de uma amostra com: (a) excesso de DNA; (b) pouco DNA; (c) concentração de DNA ideal. (Adaptada de Butler [3]).

Por outro lado, a partir da amplificação do gene da amelogenina (AMG) é possível determinar o sexo do indivíduo [29]. Esta informação é importante em casos em que exista uma mistura de DNA masculino e feminino, presente por exemplo, em casos de agressão sexual.

Adicionalmente, o conhecimento prévio da quantidade de DNA existente numa amostra, concretamente a proporção dos contribuintes em caso de mistura, bem como a presença de inibidores, pode permitir a escolha de um método de extração mais adequado; por exemplo, no caso de se tratar de uma mistura dar-se-ia preferência a uma nova extração por um método diferencial, já caso se verifique a presença de inibidores optar-se-ia por efetuar uma nova purificação da amostra.

Deverá também ter-se em consideração que uma amostra que não apresente bons resultados terá que ser reanalisada, ou seja, terá de ser novamente realizado todo o processo, desde a extração até à obtenção de novos resultados, o que implicará ao laboratório mais custos monetários, bem como tempo despendido.

1.3.1. Metodologia de quantificação - PCR em tempo real (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-Time Polymerase Chain Reaction* – **qPCR**) foi desenvolvida por Higuchi, apresentando algumas vantagens em relação à PCR convencional, nomeadamente o menor risco de contaminação verificado, pois os sistemas utilizados são fechados não exigindo manipulação do conteúdo de reação após a conclusão da PCR [30]. Para além de avaliar quantitativamente o DNA presente numa amostra, esta técnica permite ainda inferir sobre a qualidade dele.

Atualmente, a PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador, com um sistema ótico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com *software* exclusivo que recolhe os dados e analisa a reação. Durante a reação, o DNA amplificado é quantificado em tempo real, à medida que se acumula, a cada ciclo de amplificação, devido à introdução de fluorocromos ou de sondas fluorescentes. A monitorização da fluorescência permite quantificar o produto formado [31].

A monitorização da fluorescência pode ser realizada com recurso a métodos diretos e indiretos. Métodos diretos correspondem a sistemas nos quais a fluorescência

resulta da ligação de uma molécula fluorescente ao produto amplificado ou da incorporação direta de uma sonda fluorescente que irá interferir nesse produto. O fluorocromo *SYBR Green* corresponde a um método direto (Figura 4). Nesta situação, a ligação do fluorocromo ao DNA de cadeia dupla origina a fluorescência. A monitorização com o sistema *SYBR Green* tem a vantagem de ser aplicável a qualquer produto de PCR sem a necessidade de desenhar uma sonda específica. No entanto isto pode originar falta de especificidade, resultando numa quantificação irreal [32]. Já os métodos indiretos recorrem a sondas que detetam os produtos amplificados. Estas sondas de hibridização podem ser desenhadas de forma a emitirem fluorescência somente quando se encontram ligadas a um gene de interesse específico. Exemplo de um método indireto é a tecnologia *TaqMan*[®] (Figura 4), uma das sondas de hibridização mais comumente utilizadas [32].

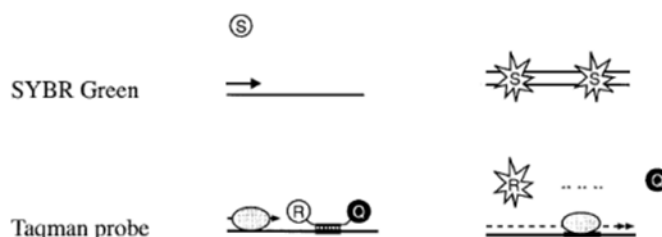


Figura 4. Ilustração dos métodos de monitorização de fluorescência.

Sistemas que utiliza um fluoróforo como o SYBR Green (S) ou uma sonda *TaqMan*[®] que possui um fluorocromo *reporter* (R) e um *quencher* (Q) (Adaptada de Walker [32]).

1.3.2. Tecnologia *TaqMan*[®]

A tecnologia *TaqMan*[®] é baseada na deteção da atividade exonucleotídica 5' - 3' da *Taq* DNA polimerase [33]. Foi demonstrado que essa atividade poderia ser explorada como um método indireto, o qual permite aceder à quantidade de material genético amplificado com recurso a sondas fluorescentes específicas, eliminando deste modo a necessidade de execução de uma eletroforese (necessária após a PCR convencional) [34].

Nesta tecnologia são utilizados dois *primers* específicos para determinadas sequências de DNA e uma sonda *TaqMan*[®] homóloga à região do fragmento de DNA entre os *primers forward* e *reverse*. Esta sonda tem acoplada, na extremidade 5', um fluorocromo *reporter* capaz de proporcionar uma monitorização da reação em tempo real e, na extremidade 3', um *quencher*. O fluorocromo é uma molécula que emite luz a um dado

comprimento de onda depois de absorver luz noutro comprimento de onda, enquanto um *quencher* é uma molécula que aceita energia de um fluorocromo na forma de luz e dissipa a energia sob a forma de luz ou de calor [35]. Quando a sonda está intacta, a emissão proveniente do fluorocromo *reporter* é suprimida devido à proximidade física que existe entre este e o *quencher*, ou seja, não existe deteção da fluorescência devido à transferência de energia *Förster* (*Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer - FRET*) do *reporter* para o *quencher* [36, 37]. Ao longo da reação, a sonda hibridiza com a sua sequência específica (entre *primers*), e é encontrada pela enzima *Taq* DNA polimerase que a hidrolisa pela sua atividade exonucleotídica 5' - 3'. Esta hidrólise separa a molécula *quencher* do fluorocromo *reporter*, o qual irá, por sua vez, emitir um sinal fluorescente que será posteriormente detetado. A hidrólise da sonda ocorre em proporção da amplificação da sequência de DNA alvo e, conseqüentemente, resulta no aumento do sinal de fluorescência (Figura 5).

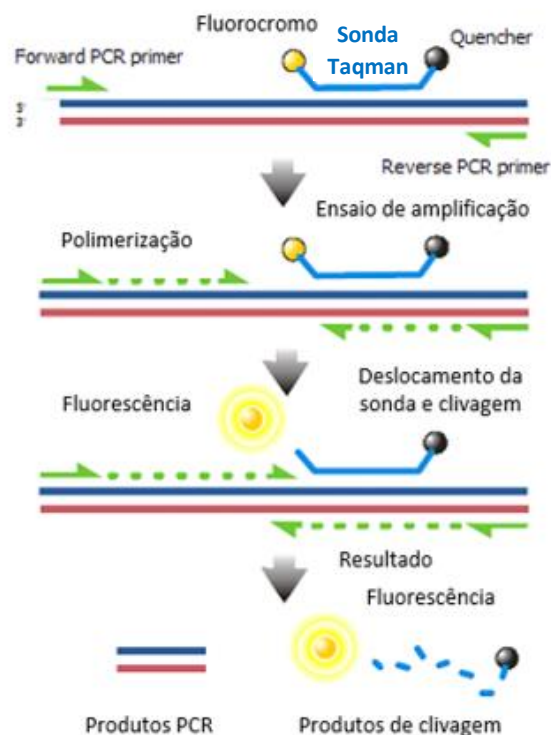


Figura 5. Representação esquemática da tecnologia *TaqMan*®, durante as fases de polimerização, extensão de *primers* e hidrólise da sonda (Adaptada de Wittwer [38]).

A metodologia de qPCR segue o princípio geral de uma PCR, apresentando as suas três fases características: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária, ou *plateau* [31]. Neste sistema, as fases são totalmente

automatizadas, ocorrem ciclicamente e em tempo real [35]. Estas fases podem ser observadas num gráfico de fluorescência *versus* o número de ciclos da PCR (Figura 6). Recomenda-se que a reação seja estudada na fase exponencial, onde conjectura-se que esta tenha uma eficiência de aproximadamente 100% (isto corresponde à obtenção do dobro das moléculas a cada ciclo), sendo assim possível determinar o número de moléculas de DNA da sequência amplificada que estavam originalmente presentes na amostra inicial [31].

Durante a PCR, o sinal de fluorescência aumenta até um ponto onde pode ser detetado, ultrapassando o limiar de deteção, denominado como *Cycle Threshold* ou C_T . O C_T pode então ser definido como o número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável. Trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detetada ultrapassa o limiar da fase exponencial, conhecido na literatura como *threshold*, definido arbitrariamente pelo *software* do equipamento em função da linha basal [31, 35, 38]. Quantos menos ciclos forem precisos para o *software* conseguir detetar a fluorescência, maior é o número de moléculas iniciais introduzidas na reação de amplificação de PCR.

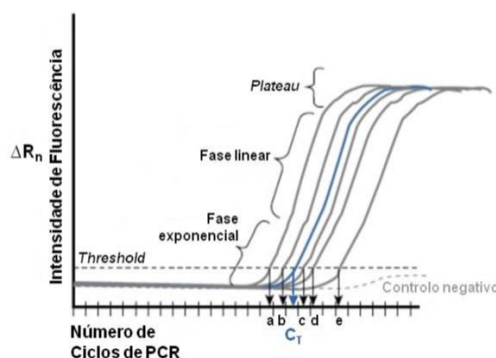


Figura 6. Deteção do produto da qPCR e as suas fases: o *software* constrói gráficos com os dados obtidos da intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos de PCR (Adaptado de Butler [5]).

Um algoritmo computadorizado compara o nível de fluorescência do fluorocromo *reporter* (R) com a emissão do *quencher* (Q), o qual apresenta pouca variação a cada ciclo de PCR durante a fase de amplificação, o que resulta num valor de ΔR_n (R/Q). Assim, ao longo da reação, a emissão de compostos fluorescentes gera um sinal de fluorescência (R_n) que aumenta em proporção direta com a quantidade de produto amplificado [31, 35]. O valor de ΔR_n traduz a quantidade de sonda de hibridização que foi degradada. O *software* constrói então uma função exponencial em função dos últimos três valores de ΔR_n de cada

ciclo de extensão. Um limiar de emissão de fluorescência relativa é definido na linha basal do ΔR_n durante os primeiros 10 a 15 ciclos. O algoritmo calcula o ciclo no qual cada amplificação atinge um limiar significativo (C_T). Existe, assim, uma relação matemática exata inversa entre o número de moléculas de DNA iniciais na reação e o valor de C_T , que é a base para os cálculos na qPCR [21, 38].

Para se conseguir atribuir a concentração de uma amostra desconhecida a partir do seu valor de C_T , é necessário criar uma curva de calibração a partir de amostras com concentração conhecida. Esta curva apresenta uma relação linear, com declive negativo, entre o valor do C_T e o logaritmo da concentração de DNA. O ponto de interseção da curva de calibração com a linha de “*threshold*” indica o valor de C_T (Figura 6). Assim sendo, desde que exista precisão e consistência nos C_T de amostra para amostra de concentração conhecida, o valor de C_T de qualquer amostra de concentração desconhecida pode ser comparado a essa curva de calibração e facilmente calculada a sua concentração (Figura 7).

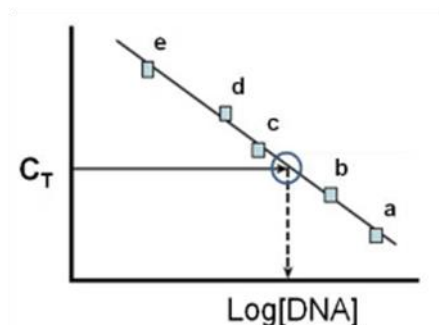


Figura 7. Curva de calibração obtida a partir de diferentes amostras com concentrações conhecidas de DNA (a,b,c,d,e). Numa escala logarítmica os C_T correspondem à concentração inicial de moléculas (Adaptada de Butler [5]).

Paralelamente, os *kits* de quantificação contêm na sua composição um fluorocromo que funciona como uma referência passiva normalizando os sinais fluorescentes do *reporter*. A normalização é necessária para corrigir as flutuações causadas por alterações na concentração ou volume devido a eventuais erros de pipetagem. Os *kits* possuem, igualmente, um controlo interno da PCR (IPC) que permite verificar a eficiência da *Taq* DNA Polimerase, da química dos diferentes componentes da mistura, do correto funcionamento do instrumento, bem como verificar a presença de inibidores na amostra.

1.3.3. Quantificação direta de DNA

O termo quantificação direta refere-se a uma metodologia de PCR em tempo real que utiliza os equipamentos habituais porém com a diferença de no poço da reação se colocar um suporte sólido (por exemplo um *punch* de cartão FTA[®]), que contém material biológico. A amostra biológica pode ser diretamente colocada (no caso das amostras de referência) ou pode ser transferida de um suporte para o cartão após ser humedecida, dando origem àquilo que doravante vai ser denominada como tira de limpeza (Figura 8).

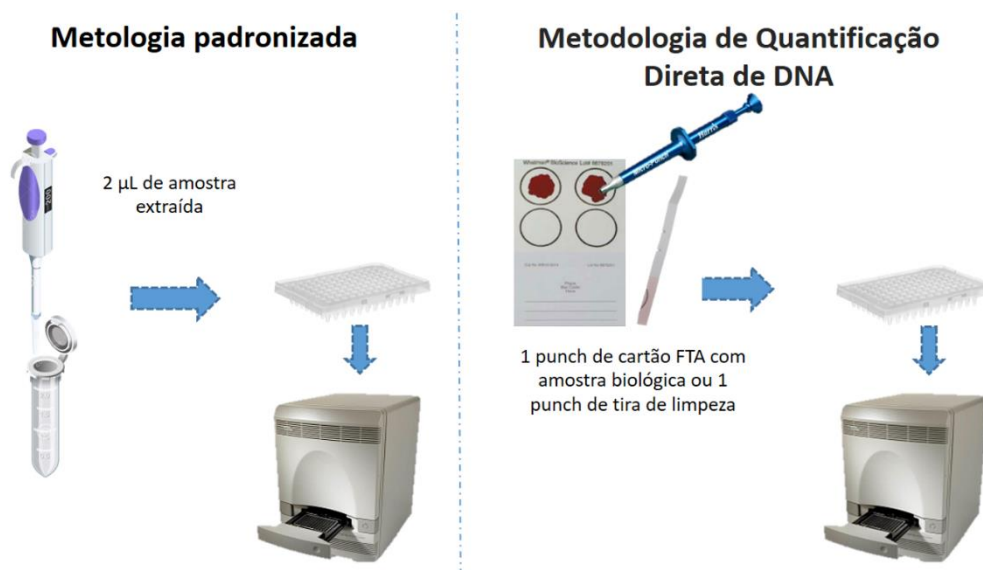


Figura 8. Ilustração da metodologia padronizada de quantificação de DNA *versus* a metodologia de quantificação direta de DNA.

Esta metodologia é pouco utilizada no fluxo de trabalho forense pois alguns estudos apontam que a presença do papel aumenta os níveis de fluorescência da linha basal [fase onde a intensidade do sinal do produto amplificado ainda não ultrapassa a intensidade encontrada no *background*], principalmente devido à utilização de sondas MGB[®] [40, 41, 42]. Este fenómeno, segundo Liu, ocorre em espectros de emissão com comprimentos de onda inferiores a 586 nm (Figura 9) [42].

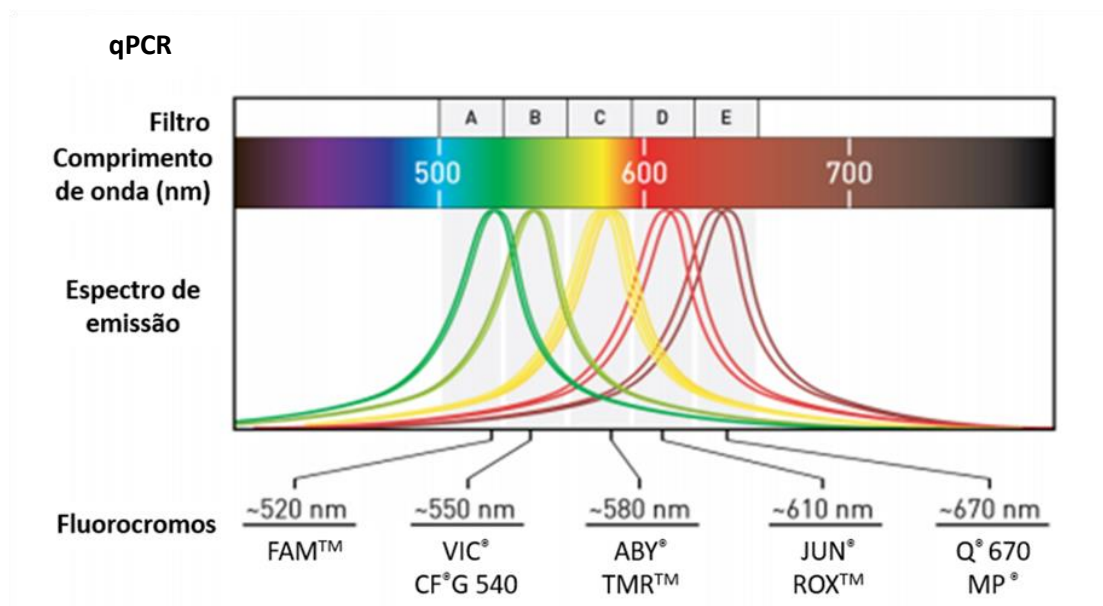
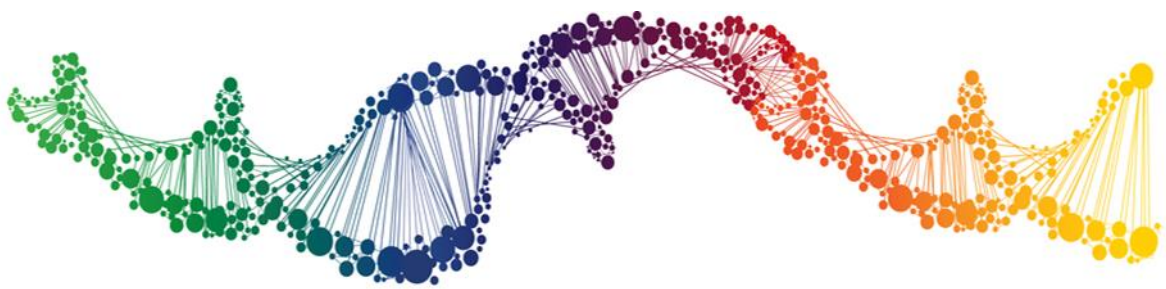


Figura 9. Espectros de emissão dos fluorocromos utilizados dos kits estudados na PCR em tempo real.

A metodologia de quantificação direta procura obviar a etapa de extração do DNA tentando assim suprimir perdas de DNA. Devido ao facto de as amostras forenses terem, por norma, DNA em quantidade diminuta, este tem que ser utilizado de forma a garantir que exista amostra suficiente para permitir a repetição da análise se necessário. Deste modo, uma metodologia que requeira a utilização de somente 0,5mm de um cartão FTA®/tira de limpeza tem potencialidade para ser um recurso de triagem/avaliação inicial, permitindo saber *a priori* informações acerca da quantidade de DNA, sexo e degradação da amostra. Tendo como referência os resultados de quantificação de amostras submetidas à metodologia de quantificação direta é possível, posteriormente, determinar o *input* ótimo para a amplificação direta dessas mesmas amostras. Assim sendo, a combinação destas duas metodologias permitirá a obtenção de um fluxo de trabalho mais simples, com resultados mais rápidos e processos menos dispendiosos.



Objetivos

2. Objetivos

A quantificação permite assegurar que a quantidade e qualidade de DNA presente numa amostra é ideal para as subseqüentes etapas laboratoriais, que o DNA extraído é especificamente humano e que se utiliza o *input* ótimo de DNA na etapa de amplificação, de forma a se obter um perfil genético.

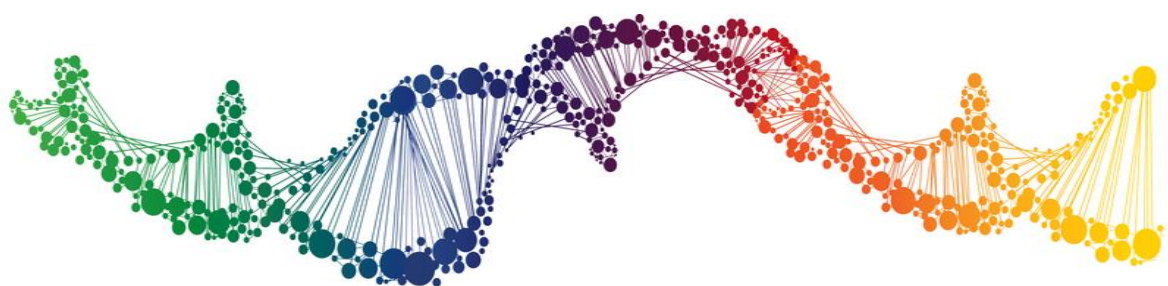
2.1. Objetivo geral

O principal objetivo deste estudo consiste em testar a viabilidade da implementação de uma metodologia de quantificação direta de DNA por PCR em tempo real a partir de amostras biológicas forenses em comparação à metodologia comumente utilizada no fluxo de trabalho no âmbito da criminalística biológica, a qual requer, previamente à quantificação, uma extração/purificação do DNA.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a precisão e/ou exatidão dos kits *Quantifiler® Trio* e *PowerQuant™*, através do estudo de *standards* e de controlos positivos;
- Avaliar se existe alteração nos níveis de fluorescência da linha basal na metodologia de quantificação direta de DNA com recurso à utilização de sondas MGB® e de *punchs* de 0,5 mm de cartões FTA®;
- Avaliar as diferenças nos resultados de quantificação de amostras extraídas *versus* amostras não extraídas (diretamente quantificadas);
- Determinar qual o kit de quantificação (se o *Quantifiler® Trio* ou o *PowerQuant™*) mais eficaz para amostras de referência, e de seguida, prosseguir o estudo das amostras simuladas com aquele que obtivesse resultados mais robustos;
- Verificar se é possível transferir material biológico dos diferentes suportes para as tiras de limpeza e posteriormente quantificá-las diretamente;
- Determinar qual o material de suporte (ganga, algodão ou vidro) que proporciona melhores resultados na metodologia de quantificação direta de DNA;
- Avaliar a capacidade do kit *PowerQuant™* na deteção de diferentes proporções de DNA masculino *versus* DNA feminino em misturas efetuadas a partir de amostras com concentrações conhecidas;

- Correlacionar os resultados de quantificação com a qualidade dos perfis genéticos obtidos com o *kit* de amplificação *GlobalFiler*®.



Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Normas laboratoriais

A análise laboratorial de amostras forenses pressupõe a utilização de um conjunto de medidas preventivas de forma a evitar contaminações indesejadas que possam afetar os resultados, pelo que estas medidas devem estar presentes em todas as etapas da rotina laboratorial forense, desde a colheita das amostras até à obtenção de um perfil genético.

Assim sendo, as principais medidas de prevenção de contaminação incluem:

- A utilização, de forma adequada, de equipamento de proteção individual, nomeadamente bata, luvas e máscara descartáveis, não devendo ser permitida a circulação entre salas diferentes com a roupa de trabalho que está a ser utilizada noutra sala nem o transporte de materiais e/ou equipamentos;
- Áreas de pré e pós-PCR localizadas em espaços físicos separados;
- A descontaminação da sala, bancada de trabalho, workstations, materiais e/ou equipamentos com recurso à luz ultravioleta (UV) durante 10 a 20 minutos, antes e depois de qualquer procedimento laboratorial;
- Uma separação temporal e espacial dos circuitos da extração e amplificação das amostras problema das amostras de referência;

Para além de medidas de prevenção, devem ser adotadas medidas que possibilitem a deteção de contaminações como sendo a inclusão de controlos negativos, também designados por reações NTC (*No Template Control*) em todos os procedimentos laboratoriais, a monitorização regular de superfícies e equipamentos e a manutenção de uma base de dados de eliminação com os perfis genéticos das pessoas que circulam no laboratório.

Por se tratarem de amostras forenses para as quais é obrigatória a manutenção da cadeia de custódia, devem ser registados todos os procedimentos realizados, bem como todos os reagentes, consumíveis e equipamentos, o que permite realizar, a qualquer momento, a rastreabilidade das amostras.

3.2. Seleção e elaboração das amostras em estudo

As amostras forenses podem ser divididas em dois tipos: em amostras de referência ou seguras que correspondem a amostras identificadas e com quantidade de DNA razoável; e em amostras problema ou de vestígios que se referem a amostras com origem desconhecida e muitas vezes com reduzida quantidade de DNA.

No quotidiano laboratorial forense, a colheita de amostras de referência usualmente implica a recolha em cartão FTA® de uma mancha de sangue e/ou uma raspagem do epitélio bucal com recurso a uma zaragatoa. As amostras problema podem encontrar-se representadas em diversos fluídos biológicos e suportes, pelo que devem ser previamente quantificadas de modo a determinar se existe DNA em quantidade suficiente para a subsequente amplificação por PCR.

3.2.1. Amostras de referência

Inicialmente os fluídos biológicos utilizados neste trabalho foram sangue e saliva, pelo que foram colhidas amostras de referência a 8 indivíduos após a obtenção do consentimento informado, livre e esclarecido para participação no estudo. A cada indivíduo foi colhida uma mancha de sangue em cartão FTA® *Indicating – Indicating FTA® Mini Card* (Whatman, Clifton, NJ) por punção capilar digital com recurso a uma lanceta (Figura 10a), bem como saliva (células epiteliais bucais) recolhida com uma zaragatoa *FLOQ* (Copan Diagnostics, Inc., Murrieta, CA). O material biológico presente na zaragatoa foi de seguida transferido, por contacto, para um círculo do cartão FTA® *Indicating* (Figura 10a).

É de realçar que todas as amostras colhidas foram anonimizadas de forma irreversível.

Posteriormente, foram ainda utilizadas amostras de sémen cedidas pelo Centro de Preservação da Fertilidade do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, amostras essas que foram entregues já anonimizadas. Na preparação da mancha deste fluído biológico, após a sua ressuspensão, retirou-se uma gota do tubo *falcon* e colocou-se num cartão FTA® com recurso a uma pipeta de Pasteur.

3.2.2. Amostras simuladas

De forma a simular situações problema próximas às observadas na prática forense (amostras problema), foi colocado sangue, sémen e saliva em suportes absorventes e não absorventes (Figura 10b).

Como suportes absorventes foram utilizados tecidos de ganga corada com índigo azul, constituída por 97% de algodão e 3% de *sependex*, e tecidos 100% algodão. Estes tecidos foram escolhidos pois surgem frequentemente em casos de perícias criminais no SGBF-C. Antes de se realizarem as manchas, os tecidos foram descontaminados durante 15 minutos com luz UV para minimizar o risco de uma possível contaminação com DNA exógeno.

Como suportes não absorventes foram usadas lâminas de microscópio previamente imersas numa solução de lixívia a 3% durante 1 hora, as quais foram posteriormente lavadas com água destilada e deixadas a secar à temperatura ambiente. Após estes passos, as lâminas foram ainda expostas 15 minutos à luz UV.

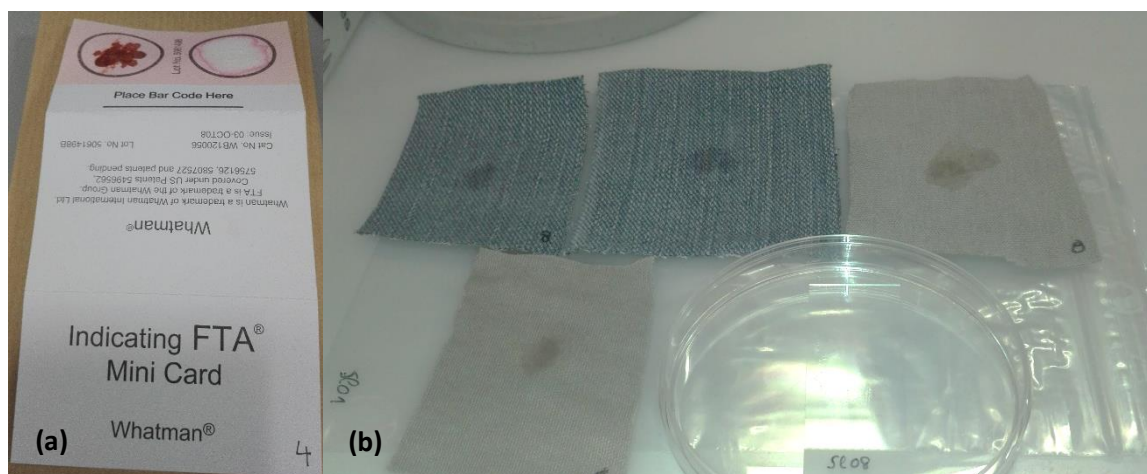


Figura 10. Exemplo da elaboração das manchas: (a) em cartão FTA® Indicating e (b) em ganga, algodão e lâminas de vidro.

Depois dos suportes terem sido descontaminados procedeu-se à deposição dos fluídos biológicos. O sangue foi colhido por punção capilar digital e diretamente colocado em todos os suportes. Para a elaboração da amostra de sémen, retirou-se uma gota do tubo *falcon*, optando-se por realizar a mancha somente no tecido de algodão.

Para a realização das manchas de saliva foram previamente preparadas suspensões de células epiteliais, as quais foram obtidas a partir de zaragatoas bucais

provenientes de dois indivíduos, um do sexo masculino e outro do sexo feminino. Nesse sentido, realizaram-se esfregaços bucais com recurso a zaragatoas. As cabeças das zaragatoas foram cortadas e colocadas em tubos tipo *ependorf* contendo uma solução de 400 μL de Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) sendo posteriormente agitadas no termomixer a 900 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Após este passo, as zaragatoas foram transferidas para *spin baskets* e de seguida centrifugadas (1 minuto a 14000 rpm) de forma a libertarem alguma amostra que pudessem ainda ter disponível. De seguida, o volume em cada tubo foi ajustado para 500 μL com Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) [43].

Após o procedimento, as suspensões de células epiteliais foram separadas em alíquotas, tendo sido realizadas lâminas para confirmar microscopicamente a presença de epitélio intacto (Figura 11).

Na elaboração das manchas biológicas nos diferentes suportes dispensou-se: 30 μL nas lâminas de vidro; 40 μL nos recortes de algodão e 60 μL nos de ganga. As alíquotas foram armazenadas no congelador a -20°C .

Inicialmente colocou-se o mesmo volume (30 μL) em todos os suportes, porém verificou-se que devido às propriedades e constituintes inerentes dos mesmos, a impregnação do fluido no suporte e consequentemente a formação e consistência de uma mancha variou bastante, pelo que optou-se pela utilização de diferentes volumes.

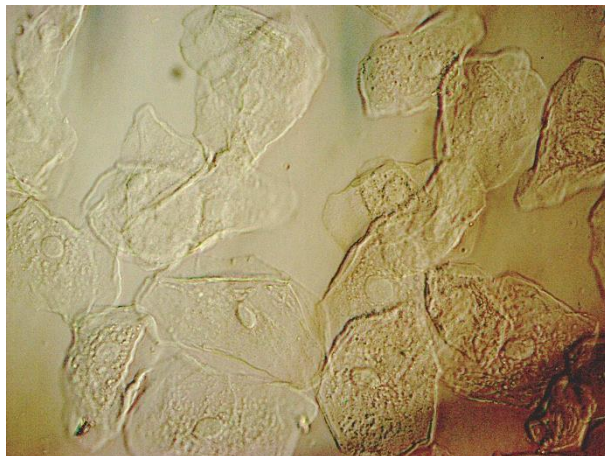


Figura 11. Observação e confirmação microscópica da presença de células do epitélio bucal intacto.

3.2.3. Amostras de mistura

Na prática forense é frequente a ocorrência de amostras com mais de um contribuinte. Assim, para verificar a capacidade do *kit PowerQuant™* (Promega) em discriminar dois contribuintes em diferentes proporções de DNA masculino:DNA feminino (M:F) com a técnica de quantificação direta, utilizaram-se duas alíquotas com suspensões de células epiteliais de concentração conhecida, uma masculina e uma feminina. A partir destas elaboraram-se diferentes misturas, definindo como contribuinte minoritário a fração masculina nas seguintes proporções: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, e 1:100. Em todas as proporções a concentração da amostra feminina foi constante, ao passo que a concentração da amostra masculina diminuiu progressivamente, tentando assim mimetizar misturas reais forenses nas quais o contribuinte minoritário é na maioria das vezes masculino. Pipetaram-se 20 µL das alíquotas das misturas realizadas, os quais foram colocados em cartões FTA® *Indicating*.

3.2.4. Transferência do material biológico

As manchas de sangue, saliva e sémen presentes nos diferentes suportes foram deixadas a secar durante, pelo menos, 48 horas. De seguida, procedeu-se à transferência do material biológico dos suportes para tiras de limpeza. Para esse efeito, as manchas foram humedecidas segundo o exposto na Tabela 1.

Tabela 1. Natureza das manchas e soluções de limpeza utilizadas e os respetivos volumes.

	Algodão	Ganga	Lâmina 1	Lâmina 2
Amostra 01 - sangue	20 µL água	30 µL água	15 µL água	15 µL LB
Amostra 01 - saliva	20 µL água	30 µL água	15 µL água	-
Amostra 08 - saliva	20 µL LB	30 µL LB	15 µL LB	-
Sémen	20 µL LB	-	-	-

Nota: água = água nucleasse free. LB = *Lysis Buffer* (*kit PrepFiler*, AB).

Depois de humedecidos as manchas, o material biológico foi transferido com recurso ao objeto da Figura 12 para uma tira de limpeza (realizada a partir de um cartão FTA®) com 0,8 cm de largura.



Figura 12. Objeto utilizado para transferir o material biológico dos diversos suportes para a tira de limpeza.

Com este procedimento pretendeu-se verificar se é possível a transferência de material biológico dos diferentes suportes para as tiras de limpeza e posteriormente quantificá-las diretamente.

3.3. Procedimentos laboratoriais

A escolha dos procedimentos laboratoriais utilizados na componente prática desta dissertação teve como pressuposto as metodologias disponíveis no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (SGBF-C), bem como a literatura que tem vindo a ser desenvolvida na área da genética forense.

3.3.1. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas a partir de manchas de sangue, de saliva e de sémen presentes em 4 tipos de suporte: cartão FTA[®], ganga, algodão e lâmina de vidro.

O método de extração com a resina quelante *Chelex* foi selecionado por se tratar da metodologia para amostras de referência mais rápida, com menos custos e por permitir, após a extração das amostras, a posterior quantificação das mesmas. Já o *kit* de extração

PrepFiler é a metodologia de excelência no SGBF-C para amostras problemas nos mais diversos suportes.

3.3.1.1. Extração de DNA pelo método do *Chelex*[®]

A técnica de extração por *Chelex*[®] 100 (Bio-Rad, Hercules, CA) recorre a elevadas temperaturas que, em conjugação com forças físicas, promove a rutura das células, com a consequente libertação do DNA bem como a desnaturação das proteínas. O *Chelex*[®] é uma resina quelante composta por copolímeros de estireno divinilbenzeno contendo iões iminodiacetato emparelhados, que se liga a iões metálicos polivalentes, como é o caso do magnésio. Os iões de magnésio são atraídos, ligando-se à resina. Estes iões são necessários à ação de nucleases, que degradam o DNA. Ao remover o magnésio da reação as nucleases ficam inativas, pelo que as moléculas de DNA são protegidas.

Este procedimento foi aplicado a amostras de referência de manchas de sangue ou de saliva em cartão FTA[®]. A extração de DNA pelo método de *Chelex*[®] 100 (Bio-Rad) realizou-se conforme o protocolo descrito por Walsh e colaboradores em 1991 [14].

Foram cortados dois *punches* de 25 mm das manchas de sangue e de saliva com recurso a um alicate “*paper punch single hole*” para o respetivo tubo tipo *eppendorf*. Entre cada amostra o alicate foi limpo realizando 2 ou 3 *punches* no papel de mancha limpo. Foi adicionado 1 ml de água *nuclease free* a cada tubo, os quais foram incubados à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos e centrifugados a 14000rpm durante 3 minutos. Com o auxílio de pipetas Pasteur retirou-se o sobrenadante, deixando cerca de 30 µL nos tubos das extrações de sangue e cerca de 50 µL nas extrações de saliva.

Aos tubos das extrações das manchas de sangue foi adicionado 170 µL de *Chelex* a 5% previamente preparado e 150 µL nas extrações de saliva, verificando sempre se existem esferas de resina na ponta. Os tubos foram colocados no banho de aquecimento a 56°C, durante 30 minutos. Posteriormente, estes foram agitados no *vortex*, a alta velocidade, durante 5 a 10 segundos. A tampa dos tubos tipo *eppendorf* foi furada com o auxílio de uma agulha para seguidamente os sujeitar a uma ebulição utilizando um termoagitador a 110°C durante 8 minutos. Os tubos foram novamente agitados no *vortex* e centrifugados, a 14000 rpm, durante 3 minutos. Por fim, as amostras extraídas foram armazenadas no congelador, a uma temperatura de -20°C ± 10°C.

Para controlo de qualidade interna, foi preparado um controlo negativo para cada lote de extração. Para preparar o controlo negativo adicionou-se 2 *punches* do papel de mancha limpo utilizado para a limpeza do alicate usando igualmente o alicate empregue durante o procedimento.

3.3.1.2. Extração automática de DNA pelo *Automate Express Forensic DNA Extraction System* com recurso ao kit *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction*

O kit de extração *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction*, comercializado pela Applied Biosystems (AB), engloba-se nas metodologias de extração de DNA com recurso a uma fase sólida, permitindo a purificação do DNA. Devido ao facto de o pH do meio ser ácido as moléculas de DNA ligam-se, reversivelmente, às partículas magnéticas. Com recurso a um suporte magnético, as partículas em suspensão são arrastadas na direcção do suporte, deixando os inibidores e outros contaminantes na solução. Estes contaminantes são então eliminados durante múltiplas lavagens purificando desta forma o DNA. Por fim, a adição de um tampão de eluição aumenta o pH da solução permitindo que o DNA seja eluído e recuperado após a sua purificação.

Este método é normalmente aplicado em amostras problema nos mais variados suportes. Para este trabalho em concreto, a extração de DNA de manchas de sangue, de saliva e de sêmen foi realizada com recurso ao *kit PrepFiler* de acordo com as recomendações do fabricante, descritas no manual do utilizador [44].

Em cada amostra foi realizado um corte/*punch* até 25cm² e estes foram colocados nas colunas *PrepFiler Lysep* (AB) já inseridas nos respetivos *sample tubes*. Foram adicionados 500 µL de *Lysis Buffer* (*kit PrepFiler* - AB) e 5 µL de DTT (1M) a cada amostra, de forma a ficarem completamente submersas. Seguiu-se um passo de incubação, a 70°C durante 40 minutos com uma agitação de 750 rpm. Após este, foram centrifugadas durante 2 minutos a 10000 rpm.

Para controlo de qualidade interna, foi preparado um controlo negativo e um controlo positivo para cada lote de extração. Ao controlo negativo só foram adicionados os reagentes, sendo que ao controlo positivo ainda se adicionou 1 corte/*punch* até 25cm² de uma amostra de referência de sangue em cartão FTA®.

Após a lise foi realizada a purificação no equipamento *Automate Express* (AB) com o protocolo *PrepFiler Express*. No final da corrida, as amostras foram armazenadas num congelador a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

3.3.2. Quantificação de DNA

Relativamente aos métodos de quantificação, o *kit Quantifiler® Trio* foi escolhido por ser aquele mais usado na rotina laboratorial forense e por já terem sido realizados inúmeros estudos que atestam a fiabilidade dos seus resultados, enquanto o *kit PowerQuant™* é recente no mercado, pelo que se considerou relevante a realização de um estudo exploratório das suas potencialidades, limitações e aplicabilidade na genética forense, mais concretamente na quantificação direta de DNA.

3.3.2.1. Quantificação de DNA com recurso ao *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification*

A Applied Biosystems comercializa o *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification*, baseado na tecnologia *TaqMan®* aliada a um método quantitativo e qualitativo de DNA por PCR em tempo real. Este *kit* utiliza o equipamento *7500 real-time PCR System* (AB) em associação com o *software* de análise de resultados *HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2*, permitindo determinar a quantidade de DNA em amostras forenses, bem como analisar a integridade, através da determinação do índice de degradação [45].

O *kit Quantifiler® Trio* utiliza alvos genómicos com uma variabilidade mínima entre diferentes indivíduos e grupos populacionais, de forma a maximizar a consistência dos resultados da quantificação. Os alvos usados apresentam locais de ligação da sonda e *primers* conservados no interior do genoma [45].

Este *kit* deteta três alvos distintos, dois alvos no DNA autossómico, um designado *Small Autosomal Target* (SA) e outro por *Large Autosomal Target* (LA), e um alvo no cromossoma Y (Tabela 2) [45]. De forma a aumentar a sensibilidade de deteção de DNA, mesmo em baixas concentrações, o *kit Quantifiler® Trio* apresenta um sistema multicópia em *loci*-alvo, composto por múltiplas cópias dispersas em vários cromossomas autossómicos (caso se trate dos alvos SA e LA), ou múltiplas cópias no cromossoma Y [45].

Deste modo, os alvos presentes no ensaio *Quantifiler® Trio* apresentam as seguintes funções:

- *Alvo Small Autosomal (SA)*: O alvo SA permite determinar a concentração total de DNA genómico humano. O fragmento menor (80 pares de bases) está alinhado com os *loci* miniSTR, sendo mais eficaz a detetar amostras de DNA degradadas.
- *Alvo Large Autossomal (LA)*: O alvo LA é usado principalmente como um indicador da degradação das amostras, através do cálculo da razão entre a concentração do alvo SA e a concentração do alvo LA. Devido ao seu maior tamanho, o alvo LA é mais suscetível à degradação, pelo que a sua quantidade encontra-se diminuída em amostras degradadas, o que traduz-se num aumento do Índice de Degradação (ID).
- *Alvo no cromossoma Y (Y)*: Este alvo permite a quantificação da componente masculina em amostras de DNA genómico, sendo útil na avaliação de amostras com mistura de componentes masculino:feminino.

O kit *Quantifiler® Trio* é ainda composto por um Controlo Interno da PCR (*Internal PCR Control – IPC*) encontrando-se presente em todas as reações. O IPC contém um molde (fragmento) de DNA sintético, que é também quantificado e fornece uma confirmação positiva de como todos os componentes do sistema estão a funcionar corretamente (Tabela 2). Este controlo interno permite validar os resultados negativos, sendo também capaz de indicar se uma amostra contém inibidores da PCR.

Por fim, este *kit* utiliza como referência passiva o fluorocromo *Mustange Purple* (MP). Os fluorocromos *reporters* e respetivas moléculas *quencher* que as sondas *TaqMan®* apresentam para cada alvo encontram-se discriminadas na Tabela 2.

Tabela 2. Alvos do kit *Quantifiler® Trio* (Adaptado do manual de utilizador do kit *Quantifiler® Trio* [45]).

Alvo	Tamanho sequência	Reporter	Quencher
Alvo autossómico (SA)	80 pares de bases	VIC®	MGB®
Alvo autossómico (LA)	214 pares de bases	ABY®	QSY®
Alvo masculino (Y)	75 pares de bases	FAM™	MGB®
IPC	130 pares de bases	JUN®	QSY®

Nota: MGB® = *Minor Groove Binder*.

Assim sendo, é expectável que este *kit* consiga avaliar simultaneamente a quantidade e qualidade de uma dada amostra, o que possibilitará prever *a priori* qual será o impacto de um determinado nível de degradação na obtenção de um perfil genético. Este *kit* tem sido validado na prática forense [46, 47, 48], mostrando ser uma ferramenta útil para a otimização de procedimentos.

A quantificação de DNA de manchas de sangue, saliva e sêmen em cartão FTA® foi realizada com o *kit Quantifiler® Trio* de acordo com as recomendações do fabricante descritas no manual do utilizador [45]. Preparou-se a curva de calibração, para a qual se realizaram 5 diluições sucessivas do *standard Quantifiler® THP DNA (kit QT)* (uma solução *stock* cuja concentração é de 100ng/μL) com as seguintes concentrações: 50; 5; 0.5; 0.05; e 0.005 ng/μL. Estas diluições foram realizadas com o tampão *Quantifiler® THP DNA Dilution Buffer (kit QT)*, de acordo com a Figura 13. Cada um dos *standards* foi estudado em duplicado, de modo a aumentar a precisão da curva de calibração.

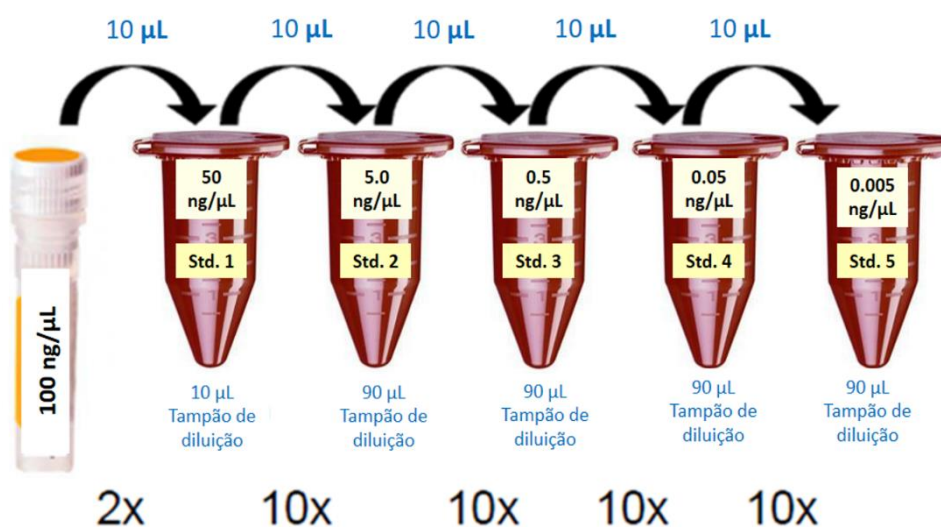


Figura 13. Preparação das diluições seriadas, a partir de uma solução stock de 100ng/μL e do tampão de diluição *Quantifiler® THP DNA Dilution Buffer (kit QT)*.

Os reagentes necessários para a mistura de reação foram vortexados e de seguida brevemente centrifugados antes da sua utilização. A mistura de reação foi preparada de acordo com a Tabela 3. Assim sendo, foram dispensados 18 μL da mistura em cada poço da placa e adicionados 2 μL de cada amostra/controlo (positivo e negativo) no respetivo poço, de acordo com o esquema da placa inicialmente definido no *software* de análise *HID Real-Time PCR Analysis Software*, perfazendo assim um volume final de 20 μL por poço. Cada amostra foi quantificada em duplicado e os resultados posteriormente obtidos

resultam da média das concentrações obtidas para cada alvo.

A quantificação das amostras não extraídas foi realizada com a colocação de 1 *punch* de 0,5 mm da amostra no poço da reação e o volume foi completado com 2 μ L de *Low TE* (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) (Tabela 3). Estas amostras foram quantificadas em triplicado.

Tabela 3. Componentes e volumes utilizados em cada reação de quantificação com recurso ao *kit Quantifiler® Trio*.

Componentes	Volume por amostra (μ L)
<i>PCR Reaction Mix (kit QT)</i>	10
<i>Primer Mix (kit QT)</i>	8
DNA/Std./CTRL(+)/NTC* Ou 1 <i>Punch</i> + <i>Low TE</i> (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)	2
Volume final reação	20

* Nota: Na reação NTC foram adicionados 2 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). CTRL(+) = controlo positivo.

Como controlo adicional da reação de quantificação foram adicionados três controlos positivos de concentrações diferentes (0.1, 10 e 40 ng/ μ L) a cada corrida de quantificação.

Após a preparação da placa, esta foi selada com uma película transparente com um aplicador a fim de evitar qualquer rugosidade que possa interferir com a deteção da fluorescência. Finalmente, centrifugou-se a placa para retirar eventuais bolhas e, em seguida, introduziu-se no equipamento *7500 Real-Time PCR System*. A corrida de quantificação processa-se em 3 fases: desnaturação inicial durante 2 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de hibridação durante 9 segundos a 95°C e extensão durante 30 segundos a 60°C.

Terminada a corrida de quantificação, os resultados foram analisados com recurso ao *software* de análise, o qual gerou as curvas de calibração e calculou a quantidade de DNA presente em cada amostra.

3.3.2.2. Quantificação de DNA com recurso ao kit PowerQuant™ System

O kit PowerQuant™ System, comercializado pela Promega, alia a tecnologia de PCR em tempo real com a utilização de sondas de hidrólise com base num sistema multicópia, com sequências alvo em múltiplas cópias dispersas nos cromossomas. Este kit utiliza uma tecnologia idêntica à do kit Quantifiler® Trio, visto que também recorre à tecnologia TaqMan® com recurso ao equipamento 7500 real-time PCR System juntamente com o software de análise de resultados HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2. As principais diferenças residem nos alvos utilizados (Tabela 4), nomeadamente nos fluorocromos *reporter* e no facto de as sondas pertencerem ao grupo Minor Groove Binder (MGB®). MGB® refere-se a uma sonda que se liga de uma forma não intercalar ao sulco menor (minor Groove), tendo uma afinidade específica para DNA em cadeia dupla. Esta sonda incorpora uma molécula *quencher* não fluorescente (*Non Fluorescent Quencher* – NFQ) que praticamente elimina toda a fluorescência de fundo, comum a *quenchers* fluorescentes, o que proporciona uma melhor relação sinal-ruído e aumenta a sensibilidade do ensaio.

Os alvos presentes no ensaio PowerQuant™ apresentam as seguintes funções:

- Alvo autossómico: Este alvo permite determinar a concentração de DNA genómico humano. Devido ao seu tamanho, o alvo autossómico é robusto aos inibidores e menos suscetível de ser afetado pela degradação do que outros alvos com sequências de amplificação mais longas.

- Alvo de degradação: O sistema deteta a presença de um fragmento amplificado maior (294 pb) proveniente de uma região diferente porém localizada no mesmo *locus* que o alvo autossómico. Este alvo, tal como o nome indica, avalia o nível de degradação das amostras através do cálculo da razão entre a concentração do alvo autossómico e a concentração do alvo de degradação.

$$\text{Nível degradação} = \frac{\text{Concentração do alvo autossómico (ng/}\mu\text{L)}}{\text{Concentração do alvo de degradação (ng/}\mu\text{L)}}$$

Devido ao seu tamanho, o fragmento de 294 pb é mais suscetível à degradação e à presença de inibidores.

- Alvo no cromossoma Y (Masculino): A utilização de dois *loci* multicópia minimiza o eventual efeito que a variação de um dado marcador genético possa ter no número de cópias em caso de misturas, para além de aumentar a sensibilidade de deteção de DNA masculino.

Tal como o *kit* anteriormente mencionado, o *PowerQuant™* é constituído por um Controlo Interno da PCR (IPC) que se encontra presente em todas as reações. Os alvos autossómicos/cromossoma Y e o alvo IPC amplificam em paralelo em todas as reações [49]. Deste modo, a análise da amplificação dos dois sistemas permite averiguar a existência de amostras com DNA genómico (quando existe uma amplificação correta do IPC mas não há uma amplificação de DNA genómico) e indicar a presença de inibidores da reação de PCR (quando nenhuma amplificação é bem sucedida). Este *kit* utiliza como referência passiva o fluorocromo ROX. Os fluorocromos *reporters* e respetivas moléculas *quencher* que as sondas *TaqMan®* apresentam para cada alvo encontram-se destrinchadas na Tabela 4.

Tabela 4. Alvos do *kit PowerQuant™* (Adaptado do manual de utilizador do *kit PowerQuant™* [49]).

Alvo	Tamanho sequência	Reporter	Quencher
Alvo autossómico	84 pares de bases	FAM™	MGB®
Alvo de degradação	294 pares de bases	Q® 670	MGB®
Alvo masculino	81 e 136 pares de bases	CF®G 540	MGB®
IPC	435 pares de bases	TMR®	MGB®

Notas: MGB® = Minor Groove Binder; Q® 670= Quasar® 670; CF® G540 = CAL Fluor® Gold 540; TRM® = Tetramethylrhodamine.

A quantificação de DNA de manchas de sangue, saliva e sêmen em diversos suportes foi realizada com o *kit PowerQuant™* de acordo com as recomendações do fabricante descritas no manual do utilizador [49].

Primeiramente, preparou-se a curva de calibração, para a qual se realizaram 4 diluições seriadas a partir do *standard PowerQuant™ Male gDNA (kit PQ)* com as seguintes concentrações: 50; 2; 0.8; e 0.0032 ng/μL. Estas diluições foram efetuadas com o tampão de diluição *PowerQuant™ Dilution Buffer (kit PQ)*, de acordo com a Figura 14.

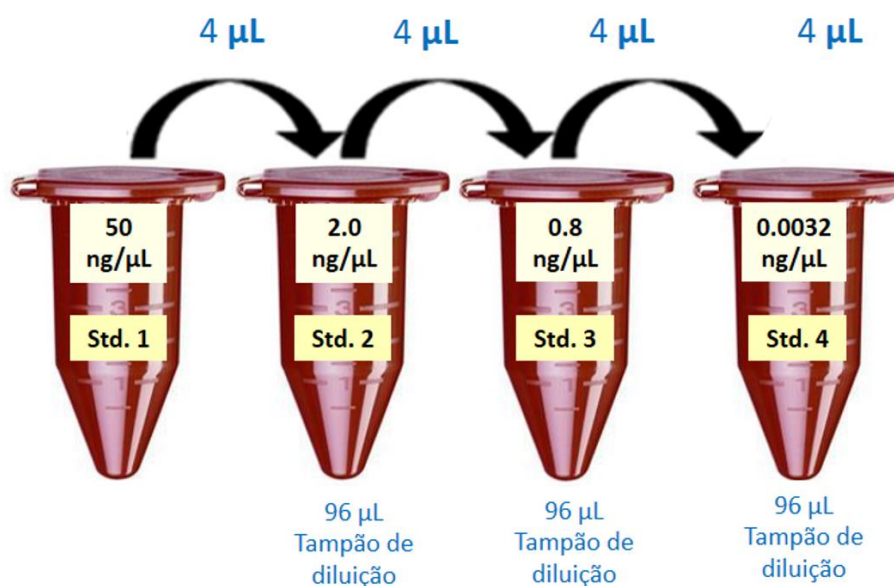


Figura 14. Preparação das diluições em série a partir da solução *PowerQuant™ Male gDNA Standard* (kit PQ) com uma concentração inicial de 50 ng/μL.

Após a diluição, os reagentes necessários para a mistura de reação foram vortexados antes da sua utilização. A mistura de reação foi preparada segundo a Tabela 5. De seguida, foram dispensados 18 μL da mistura em cada poço da placa e adicionados 2 μL de cada amostra/controlo no poço correspondente, de acordo com o esquema da placa inicialmente definido no *software* de análise dos resultados *HID Real-Time PCR Analysis Software*, perfazendo um volume final de 20 μL por poço. Os *standards* foram aplicados em duplicado.

Tal como no *kit Quantifiler® Trio*, nas amostras não extraídas, a sua quantificação foi realizada com a colocação de 1 *punch* de 0,5 mm da amostra no poço da reação e o volume foi completado com 2 μL de *Low TE* (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) (Tabela 5).

Ambas as amostras, extraídas e diretamente quantificadas, foram quantificadas em duplicado e os resultados obtidos resultaram da média das concentrações para cada alvo.

Tabela 5. Componentes e volumes utilizados para cada reação de quantificação com recurso ao kit *PowerQuant™*.

Componentes	Volume por amostra (μL)
<i>Master Mix (kit PQ)</i>	10
<i>Primer/Probe/IPC Mix (kit PQ)</i>	1
<i>Water, Amplification Grade (kit PQ)</i>	7
DNA/Std./CTRL(+)/NTC*	2
Ou 1 <i>Punch + Low TE</i> (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)	
Volume final reação	20

*Nota: Na reação NTC foram adicionados 2 μL de *Low TE* (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). CTRL(+) = controlo positivo.

Após a preparação da placa, esta foi selada com uma película transparente com um aplicador, a fim de evitar qualquer rugosidade que possa interferir com a deteção da fluorescência. Finalmente, centrifugou-se a placa para retirar eventuais bolhas e, em seguida, introduziu-se no equipamento *7500 Real-Time PCR*. A corrida de quantificação processa-se em 3 fases: desnaturação inicial durante 2 minutos a 98°C seguida de 39 ciclos de hibridação durante 15 segundos a 98°C e extensão durante 35 segundos a 62°C.

3.3.2.3. Análise dos resultados de quantificação

Como já foi anteriormente referido, tanto no *kit Quantifiler® Trio* quanto no *kit PowerQuant™*, os dados são recolhidos e analisados pelo software *HID Real-Time PCR*. Este programa fornece diversos parâmetros de análise da corrida de qPCR destacando os resultados individuais de cada amostra [50]. O *software* apresenta vários modelos (*templates*) customizados consoante o *kit* de quantificação empregue [51]. Em cada modelo, as propriedades e condições experimentais são definidas como padrão, pelo que, antes de se iniciar o ensaio de quantificação, é somente necessário introduzir o nome da amostra no poço pretendido [50]. Após a corrida, os resultados são exibidos em diferentes formatos de gráficos/tabelas, os quais fornecem diferentes informações do ensaio realizado. Destes realçam-se os seguintes:

- *Raw Data* – Neste gráfico pode-se observar os dados de fluorescência em bruto a cada ciclo para os diferentes filtros, numerados de 1 a 5. No *kit Quantifiler® Trio* o filtro 1 pertence ao fluorocromo repórter FAM™, o filtro 2 ao VIC®, o 3 ao ABY®, o 4 ao JUN® e o

5 ao MP® [45]. O kit *PowerQuant™* apresenta no filtro 1 o fluorocromo FAM™, no 2 o CF®G 540, no 3 o TMR®, no 4 o CXR® e no 5 o Q® 670 [49].

- *Multicomponent Data* – Este gráfico dá informações acerca da intensidade da fluorescência para cada fluorocromo *reporter* a cada ciclo.

- *Amplification Data* – Os dados obtidos neste gráfico são recolhidos durante a fase de amplificação. Os resultados podem ser apresentados em duas escalas, na logarítmica (*log-view*) ou na linear (*linear view*), sendo que ambas podem ser utilizadas para alterar as configurações do *threshold*. Para alterar as definições da linha basal, a escala logarítmica é a mais indicada pois permite visualizar com mais detalhe o *background noise*, possibilitando determinar o intervalo de linha basal a ser utilizado. Estas alterações podem ser realizadas na aba apresentada na Figura 15. Após isto, o *software* irá analisar novamente a corrida pelo que serão obtidos novos resultados.

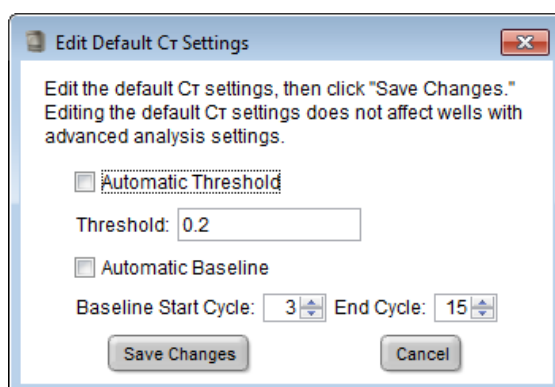


Figura 15. Aba do *software HID Real-Time PCR* que permite realizar alterações nas definições do *threshold* e intervalo de linha basal (Manual de utilizador do kit *Quantifiler® Trio* [45]).

Após as alterações das configurações, caso estas sejam realizadas, procede-se com a exportação dos resultados, os quais são apresentados sob a forma de uma tabela, da qual se pode retirar os dados mais relevantes para a análise a ser posteriormente realizada. Para além disso, o *software* de análise ainda disponibiliza as equações das curvas de calibração para os diferentes alvos (análise feita automaticamente pelo *software*).

Nas quantificações de DNA realizadas com o kit *Quantifiler® Trio*, utiliza-se uma folha de cálculo sob a forma de ficheiro *excel* criada pelo SGBF-C, na qual se inserem os valores dados pelas curvas de calibração para os alvos SA (*Human*), LA (*Large*) e Y (fração masculina presente na amostra), nomeadamente os respetivos declives, ordenadas na

origem, R^2 e *thresholds*. Este procedimento é sempre realizado aquando da abertura de um novo lote do *kit*. Após este passo, introduz-se para cada amostra os C_T obtidos para cada alvo. De seguida, a folha de cálculo realiza uma conversão (por comparação com os valores das curvas de calibração) dos C_T *Human*, *Y* e *Large* para a respetiva concentração de DNA total, DNA masculino, a respetiva razão M:F e por último o nível de degradação da amostra.

Já nas quantificações realizadas com recurso ao *kit PowerQuant™* são exportados todos os dados presentes na tabela apresentada pelo *software HID Real-Time PCR* sendo estes submetidos a uma *worksheet* em formato *excel* denominada *PowerQuant™ Analysis Tool*, fornecida pela Promega aquando da aquisição do *kit* através do seu site. Esta folha de cálculo permite obter inúmeros parâmetros da corrida de qPCR nomeadamente as curvas de calibração, a concentração de DNA total e DNA masculino, o rácio M:F, o nível de degradação, dando ainda informação acerca da normalização de cada amostra, isto é, se é necessário realizar uma diluição/concentração da amostra de forma a ter a concentração ideal para a etapa de amplificação dos STRs e qual o volume de amostra/diluyente a ser adicionado à reação.

3.3.3. Metodologia de amplificação – *Kit GlobalFiler® PCR Amplification*

O *kit* de amplificação *GlobalFiler® PCR Amplification* apresenta um grande poder de discriminação conferido pela deteção de 24 marcadores genéticos sendo por esse motivo, o *kit* escolhido para amplificar as amostras em estudo.

A amplificação de DNA foi realizada segundo as especificações do fornecedor do *kit* [52].

Primeiramente, foi preparada uma mistura de reação como descrita na Tabela 6, sendo que foram distribuídos 10 μ L da mistura em cada tubo de PCR *thin-wall* de 0.2 ml, previamente marcados com a identificação da amostra.

Tabela 6. Volumes necessários para cada reação de amplificação.

Componentes	Volume (μ L)
<i>GlobalFiler™ Master Mix (kit GlobalFiler®)</i>	7,5
<i>GlobalFiler™ Primer Set (kit GlobalFiler®)</i>	2,5

Com base nos resultados de quantificação, foi definido o volume de amostra a ser adicionado à reação de amplificação de modo a se obter um *input* ótimo de 1 ng, sendo que o *kit* permite adicionar até 15 µL de DNA. O volume foi ajustado a 25 µL, sempre que necessário, com tampão *Low TE* (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0).

Nas amostras não extraídas, realizou-se uma amplificação direta, isto é, adicionou-se um número variável de *punches* de uma amostra, como indicado na Tabela 7. A determinação do número de *punches* necessários para a reação de amplificação foi baseada em estudos realizados por Liu [40, 41, 53]. Independentemente do número de *punches*, o volume de *Low TE* (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) adicionado à reação foi sempre 15 µL, perfazendo um volume final de 25 µL.

Tabela 7. Número de *punches* adicionados à reação de amplificação com base no resultado de quantificação.

Resultado de quantificação (pg/ <i>punch</i>)	Nº de <i>punches</i> de 0,5 mm utilizados
≈ 200	3
350 a 425	2
≥ 425	1

Após a preparação das reações, as amostras foram colocadas no termociclador *Veriti® 96-well Thermal Cycler* (AB), no qual ocorreu a amplificação por PCR. A configuração do programa de amplificação encontra-se descrita na Tabela 8.

Tabela 8. Programa de amplificação do *kit GlobalFiler®* [52].

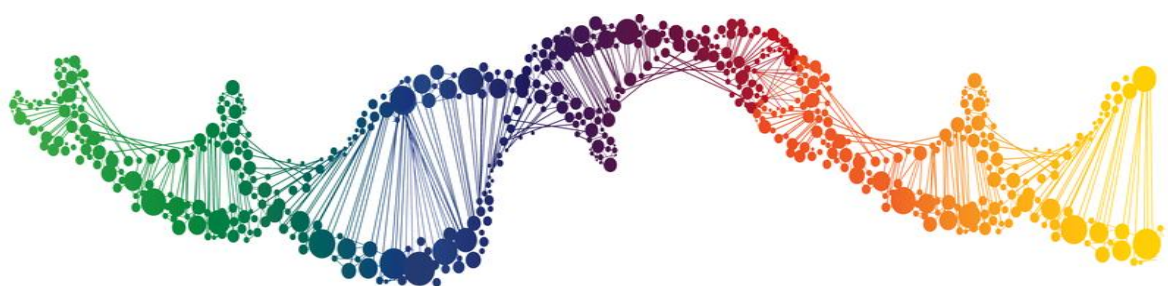
29 ciclos				
Incubação inicial	Desnaturação	Annealing/Extensão	Extensão final	Hold
95°C	94°C	59°C	60°C	4°C
1 minuto	10 segundos	90 segundos	10 minutos	∞

3.3.3.1. Análise dos produtos amplificados

Foi adicionado 1 µL de produto amplificado a 9,5 µL de *HI-Di Formamide* (AB) e 0,5 µL de LIZ-600 (AB) e desnaturado 3 minutos a 95°C.

A separação eletroforética foi realizada num sequenciador automático 3500 *Genetic Analyser* (AB) com polímero POP4 e matriz de 6 cores J6.

Após a eletroforese capilar, os resultados obtidos foram analisados com o *software GeneMapper ID-X v1.4* com limite analítico de 100 unidades relativas de fluorescência (RFU), obtendo-se, assim, os perfis genéticos [54].



Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Exatidão e/ou Precisão

A avaliação da exatidão dos resultados de quantificação foi realizada através do estudo dos valores de C_T e da quantificação do DNA total para cada *standard* utilizado na elaboração da curva de calibração, bem como da análise dos controles positivos de 0.1, 10 e 40 ng/ μ L. A avaliação da precisão foi somente realizada para o *kit PowerQuant™*, no qual foram estudados os resultados de quantificação de cada *standard* em dias e ensaios diferentes. Nenhum dos ensaios realizados na avaliação destes parâmetros conteve um *punch* no poço de reação.

4.1.1. Exatidão dos *standards* e controles positivos – *kit Quantifiler® Trio*

Realizaram-se diluições sucessivas a partir da solução *Quantifiler® THP DNA Standard* (*kit QT*), obtendo-se cinco *standards* (quantificados em duplicado) com concentrações de 50, 5, 0.5, 0.05 e 0.005 ng/ μ L. Na Figura 16 pode-se observar as curvas de calibração obtidas para os alvos SA, LA e Y.

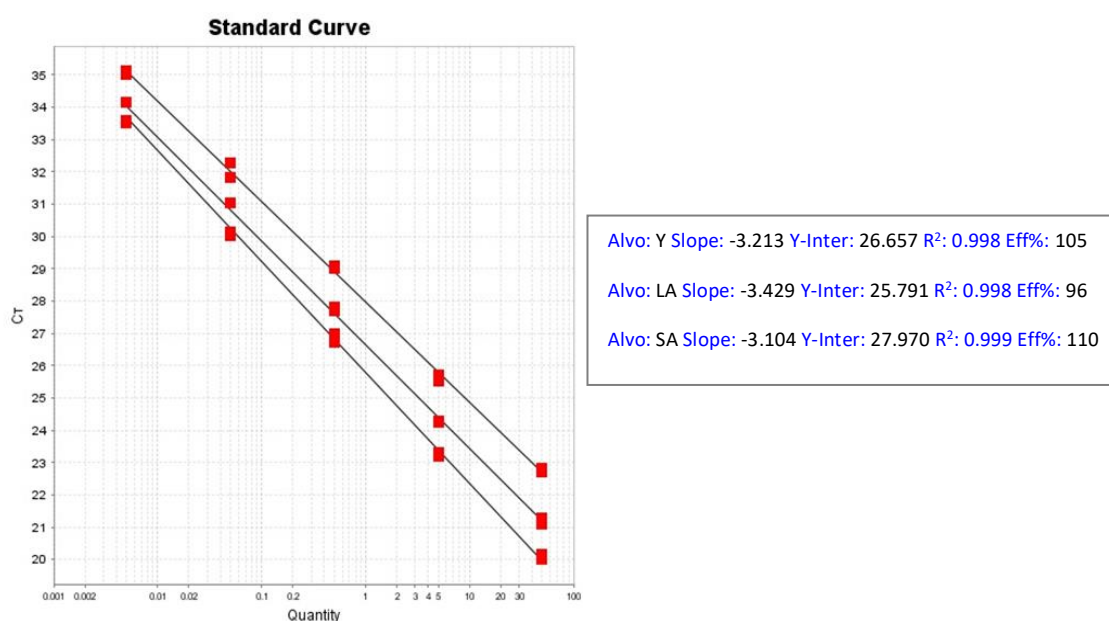


Figura 16. Curvas de calibração obtidas no ensaio de quantificação dos *standards* e respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Slope corresponde ao valor do declive da curva; Y-Inter ao valor da ordenada na origem; e Eff% diz respeito à percentagem de eficiência da reação.

Através da análise das curvas de calibração, pode-se observar que todas apresentam uma relação linear com declive negativo, evidenciando uma relação inversamente proporcional entre os valores de C_T e a quantidade de DNA dos *standards*.

O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida usada para avaliar o ajuste da curva de calibração em relação aos valores observados. O R^2 varia entre 0 e 1, sendo que, neste caso, constata-se que todos os alvos apresentam um valor superior a 0.99, o que demonstra uma estreita proximidade entre a linha de regressão linear e os valores de C_T para cada *standard*.

Os valores de quantificação e respetivos C_T com recurso ao *kit Quantifiler® Trio*, bem como as respetivas médias, desvios padrão, coeficientes de variação (CV) e diferença entre concentração obtida e esperada para cada um dos cinco *standards* encontram-se discriminados na Tabela 9 e Figura 17.

Apenas foram registados os valores de C_T obtidos para o alvo SA, uma vez que este alvo corresponde à quantificação do DNA total.

Tabela 9. Concentrações de DNA obtidas com o *kit Quantifiler® Trio* para cada um *standards* e respetivas médias, desvios padrão, coeficientes de variação, bem como diferença entre a concentração obtida *versus* concentração esperada.

Concentração esperada (ng/μL)	Média das concentrações obtidas (ng/μL)	σ	CV (%)	Diferença entre a concentração obtida e esperada (%)
50	59,738	5,30	8,87	19,48
5	6,323	0,51	8,12	26,45
0,5	0,449	0,04	8,42	-10,13
0,05	0,050	0,01	19,18	-0,97
0,005	0,0057	0,001	10,01	14,72

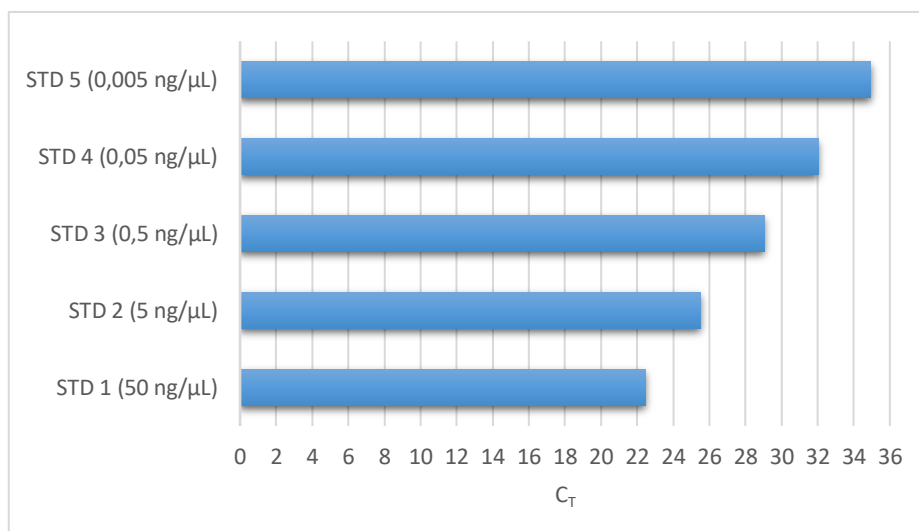


Figura 17. Valores das médias dos C_T para cada Standard (STD) relativamente ao alvo SA com recurso ao kit Quantifiler® Trio.

Verifica-se que, à medida que diminui a concentração de DNA dos *standards*, maior é o valor de C_T . Para a diluição com a concentração mais elevada, 50 ng/μL, o valor de C_T está um pouco acima dos 22, enquanto o valor de C_T para a concentração mais baixa, 0.005 ng/μL, é aproximadamente 35. Tal como expectável, estes resultados corroboram que os valores de C_T são inversamente proporcionais à concentração de DNA dos *standards*.

Pode-se observar a existência de pequenas variações nas concentrações obtidas e, por sua vez, nos valores médios de C_T de cada *standard*, as quais se traduzem em baixos desvios padrão.

Através da comparação dos coeficientes de variação dos *standards*, verifica-se que os valores de concentração superiores a 0.5 ng/μL apresentam um CV mais baixo (<9%) apresentando uma maior homogeneidade. Relativamente aos restantes *standards*, eles possuem um coeficiente de variação ligeiramente superior (10 e 19%), sendo que essa variabilidade pode ser devido à presença de uma baixa concentração de DNA nessas diluições.

Em relação às diferenças entre as concentrações esperadas e obtidas, os *standards* 3 e 4 (0.5 e 0.05 ng/μL) são os que têm concentrações mais próximas do respetivo valor de concentração teórico esperado, apresentando uma subestimação na quantificação ao passo que, as concentrações obtidas para os restantes *standards* estão mais afastadas das esperadas e apresentam uma sobrestimação dos resultados entre 15 a 27%.

Em relação ao estudo realizado com os controlos positivos, a comparação com os valores de concentração teóricos esperados foi realizada com os valores de concentração obtidos para o alvo SA. Foram obtidos três valores de concentração para cada controlo, com exceção do controlo de 40 ng/μL, o qual foi quantificado em duplicado. As concentrações obtidas para os três controlos positivos estão detalhadas na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações obtidas com o kit *Quantifiler® Trio* para os três controlos positivos.

Concentração esperada	Concentrações obtidas (ng/μL)			Média (ng/μL)	Desvio de calibração (σ)	CV (%)	Diferença entre concentrações obtidas <i>versus</i> esperada (%)
0,1 ng/μL	0,087	0,100	0,141	0,109	0,028	25,71	9,20
10 ng/μL	9,048	10,824	10,838	10,237	1,030	10,06	2,37
40 ng/μL	54,093	46,953	---	50,523	5,049	9,99	26,31

Analisando as concentrações obtidas para cada controlo positivo, é possível observar que o controlo de 40 ng/μL encontra-se mais afastado da respetiva concentração teoricamente esperada ao passo que, as concentrações obtidas para o controlo de 0.1 ng/μL e 10 ng/μL estão mais próximas das esperadas.

Verifica-se também um aumento do valor do coeficiente de variação (CV) com a diminuição da concentração dos controlos. Desta forma, constata-se uma menor homogeneidade e, portanto, maior variabilidade nos resultados obtidos para os controlos com concentrações inferiores, facto comprovado pelo respetivo coeficiente de variação (CV=25,71%). Já os controlos com concentrações de 10 ng/μL e 40 ng/μL apresentam coeficientes de variação mais baixos (CV<10%), o que se traduz numa maior homogeneidade dos resultados.

A exatidão do kit *Quantifiler® Trio* é, deste modo, comprovada através da concordância dos resultados obtidos no ensaio realizado e as concentrações de referência, convencionalmente tidas como verdadeiras.

4.1.2. Exatidão e Precisão dos *standards* e controlos positivos – kit *PowerQuant™*

Devido à escassez de artigos científicos de validação do kit *PowerQuant™*, considerou-se relevante aprofundar o seu estudo inicial, pelo que, para além da avaliação da exatidão, também foi estudada a precisão dos *standards*. Este parâmetro não foi

avaliado no *kit Quantifiler® Trio* pois já foram realizadas inúmeras validações deste *kit*, nomeadamente no laboratório onde decorreu a componente prática desta dissertação [46].

Em cada ensaio de quantificação foram realizadas diluições seriadas a partir do reagente *PowerQuant™ Male gDNA (kit PQ)*, obtendo-se quatro *standards* com as concentrações de 50, 2, 0.08 e 0.0032 ng/μL. No total realizaram-se quatro ensaios de quantificação, sendo que cada *standard* foi quantificado em duplicado. Para traçar as curvas de calibração de cada corrida utilizaram-se as equações dadas para o alvo autossómico, uma vez que este alvo corresponde à quantificação do DNA total. Para avaliar a precisão foram analisadas quatro corridas de quantificação realizadas em dias diferentes.

As curvas de calibração obtidas para cada uma das corridas de quantificação estão representadas na Figura 18.

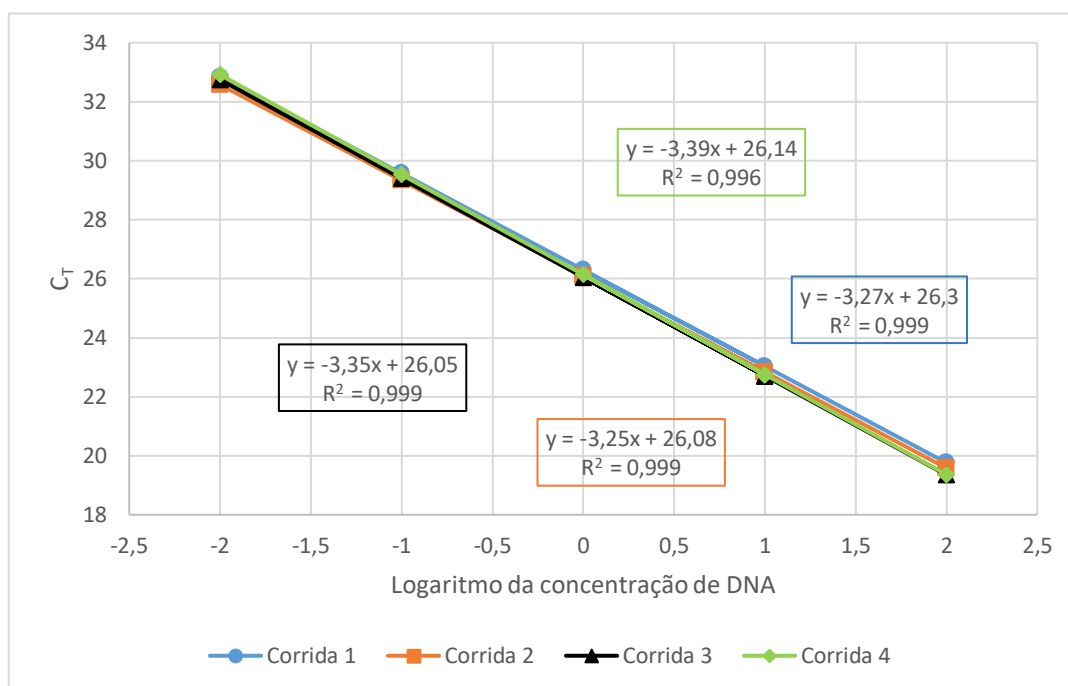


Figura 18. Curvas de calibração obtidas para as quatro corridas de quantificação dos *standards* e respetivos coeficientes de determinação (R^2).

Fórmula da equação linear: $y=mx+b$ em que: m corresponde ao valor do declive e b ao valor da ordenada na origem.

Todas as curvas de calibração demonstram uma relação linear com declive negativo, traduzindo a relação inversamente proporcional entre os valores de C_T e o logaritmo da concentração de DNA dos *standards*. É possível observar que as curvas de

calibração são paralelas umas às outras, o que denota a similaridade existente nas curvas de calibração realizadas.

Observa-se um coeficiente superior a 0.99 em todas as curvas de calibração, o que traduz uma estreita proximidade entre a linha de regressão linear e os valores de C_T de cada *standard*.

Os valores de quantificação e respetivos C_T com recurso ao *kit PowerQuant™*, bem como as respetivas médias, desvio padrão, coeficiente de variação (CV) e diferença entre concentração obtida e esperada para os cinco *standards* encontram-se discriminados nas Tabela 11 e Figura 19.

Tabela 11. Concentrações de DNA obtidas com o *kit PowerQuant™* para cada um dos *standards* e respetivas médias, desvios padrão, coeficientes de variação e diferença entre concentração obtida *versus* concentração esperada.

Concentração esperada (ng/μL)	Concentrações obtidas nos ensaios				Total			
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Média das concentrações obtidas (ng/μL)	Σ	CV (%)	Diferença ¹ (%)
50	49,57	46,80	48,20	51,47	49,010	7,53	15,37	-1,98
2	2,15	2,07	2,19	2,12	2,133	0,15	6,98	6,63
0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,073	0,01	12,18	-8,43
0,0032	0,0031	0,0027	0,0033	0,0020	0,0027	0,0006	23,64	-15,71

¹ diferença entre a média das concentrações obtidas *versus* a concentração esperada.

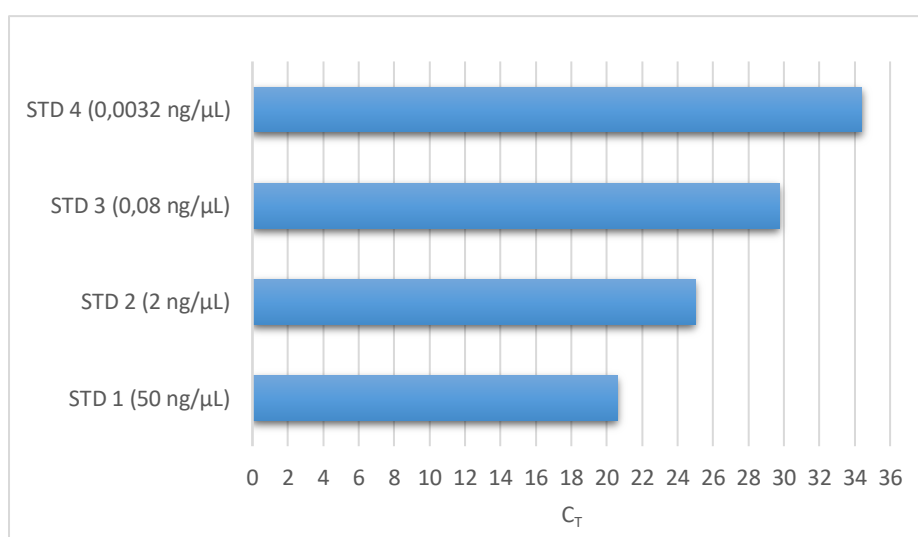


Figura 19. Valores das médias dos C_T para cada *Standard* (STD) para o alvo autossômico com recurso ao *kit PowerQuant™*.

No *kit PowerQuant™*, tal como no *kit* anteriormente descrito, verifica-se uma relação inversamente proporcional entre os valores de C_T e as concentrações de DNA dos *standards*, ou seja, à medida que diminui a concentração de DNA dos *standards*, maior é o valor de C_T . Para a diluição com a concentração mais elevada, 50 ng/μL, o valor de C_T ronda os 20, enquanto o valor de C_T para a concentração mais baixa, 0.0032 ng/μL, é aproximadamente 34.

Em relação aos coeficientes de variação, com exceção dos *standards* 1 e 5, denota-se uma variabilidade crescente com a diminuição da concentração de DNA, a qual pode ser explicada pelo efeito estocástico nas amostras com uma quantidade muito pequena de DNA nuclear. Porém, ao mesmo tempo, ocorre uma menor dispersão dos resultados relativamente à concentração média para cada *standard*, visível pela diminuição do valor do desvio padrão à medida que decresce a concentração de DNA.

Em relação às diferenças entre as concentrações esperadas e obtidas, o *standard* 1, com uma concentração de 50 ng/μL, é o que apresenta uma concentração mais próxima do respetivo valor de concentração teórico esperado, com uma subestimação de -2%. Em oposição, o *standard* 4 com uma subestimação de -16% é o que apresenta uma maior disparidade entre a concentração obtida e a esperada.

Para os controlos positivos, mais uma vez, a comparação com os valores de concentração teóricos esperados foi realizada com os valores de concentração obtidos para o alvo autossómico. Foram obtidos três valores de concentração para cada controlo, com exceção do controlo de 40 ng/μL, o qual foi quantificado em duplicado. As concentrações obtidas para os três controlos positivos estão detalhadas na Tabela 12.

Tabela 12. Concentrações obtidas com o *kit PowerQuant™* para os três controlos positivos.

Concentração esperada	Concentrações obtidas (ng/μL)			Média (ng/μL)	Desvio padrão (σ)	CV (%)	Diferença entre concentrações obtidas versus esperada (%)
0,1 ng/μL	0,139	0,154	0,110	0,134	0,022	16,43	34,32
10 ng/μL	6,582	4,664	8,375	6,540	1,856	28,38	-34,60
40 ng/μL	44,329	46,752	---	45,541	1,713	3,76	13,85

Observa-se, nos controlos de 0.1 e 40 ng/μL, um baixo coeficiente de variação, de 16% e 4% respetivamente, o que traduz uma maior homogeneidade dos resultados obtidos. Para o controlo de 0.1 ng/μL verifica-se ainda um baixo desvio padrão, o que

implica uma maior uniformidade das concentrações obtidas. Já o controlo de 10 ng/μL apresenta uma menor uniformidade ($\sigma=1,9$), uma baixa homogeneidade (CV=28%) e, portanto, uma grande variabilidade dos resultados. Estas variações podem estar presentes devido a erros de pipetagem, que originam com que mais ou menos DNA estivesse disponível numa dada pipetagem.

Apesar das variações encontradas nas concentrações do controlo positivo de 10 ng/μL, é possível comprovar a exatidão dos resultados obtidos para os *standards* e controlos positivos com o *kit PowerQuant™*.

É também possível confirmar a precisão e reprodutibilidade do *kit PowerQuant™* através das concentrações obtidas para cada *standard* nos quatro ensaios de quantificação, realizados em dias diferentes.

Comparando as concentrações obtidas para os controlos positivos com o *kit Quantifiler® Trio* com as do *kit PowerQuant™*, observa-se que com o último *kit*, os valores obtidos estão mais próximos do teoricamente esperado para o controlo positivo de 40 ng/μL. Já em relação aos dois outros controlos, estes encontram-se mais afastados do valor esperado.

4.2. Efeito do *punch* de 0,5 mm no nível de fluorescência da linha basal

Com recurso aos *kits Quantifiler® Trio* e *PowerQuant™* estudou-se, em reações NTC (*no template control*), o possível efeito de um *punch* de 0,5 mm de um cartão FTA® no nível de fluorescência da linha basal de cada fluorocromo *reporter*. Essa experiência, demonstrada na Figura 20, pode ser observada num gráfico *multicomponent plot* o qual permite visualizar a intensidade de fluorescência a cada ciclo de PCR.

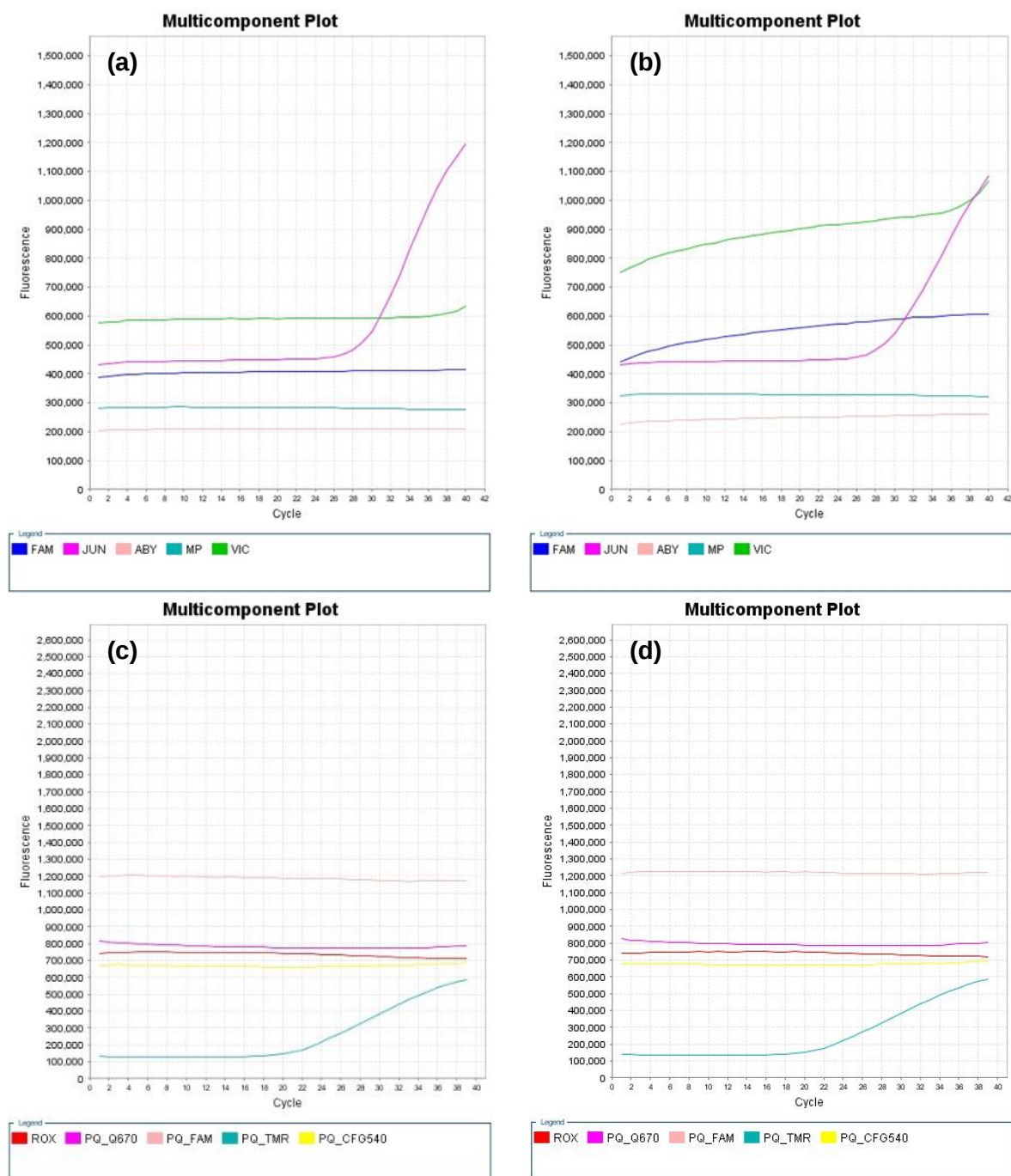


Figura 20. Intensidade de fluorescência obtida a partir dos diferentes reporters durante a reação de qPCR nas seguintes condições: (a) *Quantifiler® Trio* - NTC sem *punch*; (b) *Quantifiler® Trio* - NTC com *punch* de 0,5 mm; (c) *PowerQuant™* - NTC sem *punch*; (d) *PowerQuant™* - NTC com *punch* de 0,5 mm.

Com base nos *multicomponent plots* observa-se que, para o kit *Quantifiler® Trio*, a presença de um *punch* de 0,5 mm no poço da reação eleva o nível de fluorescência basal nos fluorocromos FAM™ e VIC®. Observa-se ainda o aumento gradual do sinal de fluorescência basal de ciclo para ciclo. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento do

background noise de cada poço, o que originou o aumento do nível de fluorescência da linha basal de toda a placa. Quanto aos outros *reporters* (ABY®, JUN® e MP®) a adição de um *punch* não apresenta diferenças significativas na intensidade da fluorescência basal.

Nos *multicomponent plots* obtidos para o *PowerQuant™* é possível observar que nenhum dos fluorocromos sofre alterações no nível de fluorescência basal devido à presença de um *punch* de 0,5 mm. Esta informação vem contrariar anteriores estudos que apontavam a utilização de sondas MGB®, bem como fluorocromos com espectros de emissão abaixo dos 586 nm, como prováveis causas para a alteração dos níveis de fluorescência visualizados na metodologia de quantificação direta [42].

Observa-se também que comparando as reações NTC sem *punch* de ambos os *kits*, a intensidade da fluorescência emitida pelos *reporters* do *kit PowerQuant™* é superior aos do *kit Quantifiler® Trio*, pelo que, por este motivo, os primeiros podem ser menos afetados com a presença do *punch*.

Com o intuito de estudar a origem das alterações no nível de fluorescência, procedeu-se com a análise do gráfico *raw data* das reações NTC anteriormente apresentadas na Figura 20. O gráfico *raw data* resultante das reações NTC com e sem um *punch* de 0,5 mm no poço da reação pode ser observado na Figura 21.

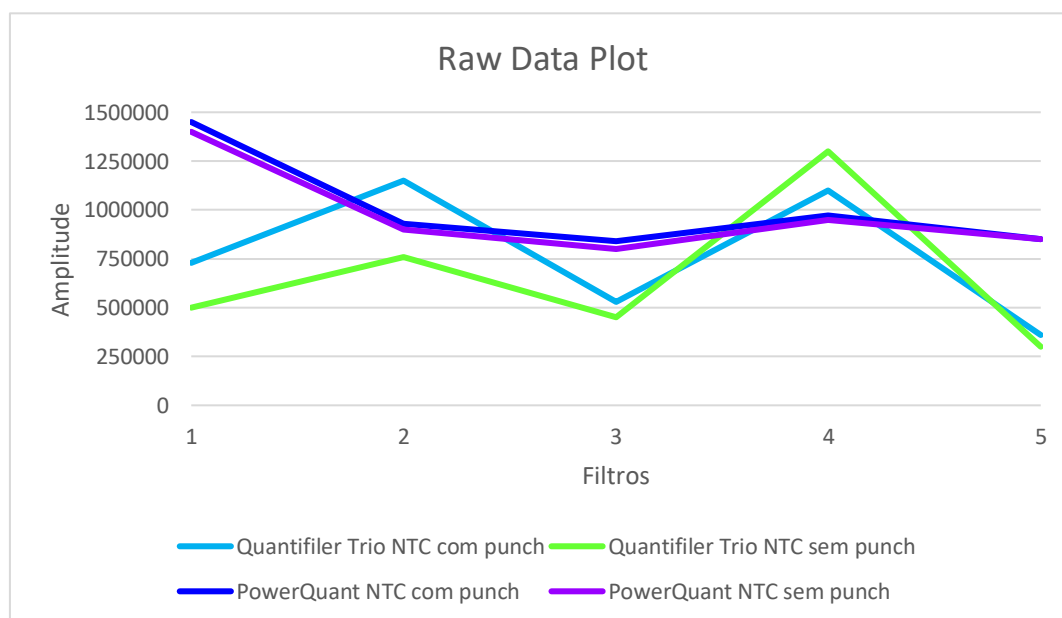


Figura 21. Gráfico *Raw Data* de reações NTC com e sem *punch* realizadas com os *kits Quantifiler® Trio* e *PowerQuant™*.

Com base na análise do gráfico *raw data* é possível observar que cada filtro do *kit PowerQuant™* exibe menor oscilação nos valores de amplitude, verificando-se ainda que alguns pontos das reações NTC com e sem *punch* são quase coincidentes. Por outro lado, com o *kit Quantifiler® Trio*, verifica-se que, especialmente os filtros 1 (FAM™) e 2 (VIC®) das reações NTC com e sem *punch* apresentam uma magnitude de oscilação elevada.

4.3. Repercussões da alteração das configurações da linha basal nos resultados da qPCR para o *kit Quantifiler® Trio*

De forma a aprofundar o estudo do efeito do *punch* de 0,5 mm nos resultados de quantificação com recurso ao *kit Quantifiler® Trio*, prepararam-se diluições seriadas a partir da solução *stock Quantifiler® THP DNA Standard (kit QT)*, obtendo-se, deste modo, cinco *standards* (Std.), variando as concentrações entre 50 e 0.005 ng/μL. Cada *standard* foi quantificado em duplicado tendo sido colocado um *punch* em cada poço de reação. As curvas de calibração resultantes do ensaio estão discriminadas na Figura 22.

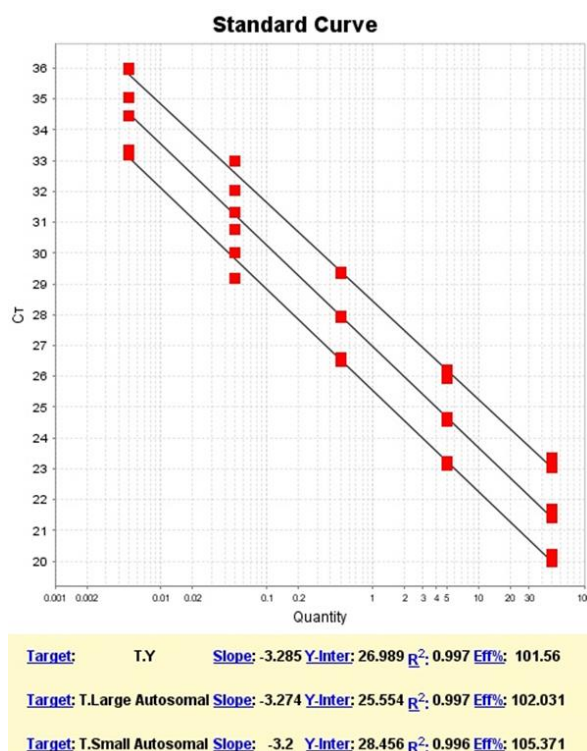


Figura 22. Curvas de calibração obtidas no ensaio com um *punch* de 0,5 mm no poço de reação.

As curvas de calibração obtidas apresentam uma relação linear com declive negativo, o que se traduz numa relação diretamente proporcional entre a concentração de DNA dos *standards* e os valores de C_T .

Os coeficientes de correlação encontram-se acima de 0.99 o que evidencia uma estreita proximidade entre a linha de regressão linear e os valores de C_T de cada *standard*.

Foram utilizadas duas folhas de cálculo distintas, uma na qual se colocaram os C_T de *standards*/amostras com *punch* e outra para os C_T de *standards*/amostras sem *punch*, sendo que cada uma destas folhas contém curvas de calibração distintas – as curvas apresentadas na Figura 16 foram utilizadas para *standards*/amostras sem *punch* e as curvas exibidas na Figura 22 foram empregues em *standards*/amostras com um *punch* de 0,5 mm no poço da reação.

Após a exportação dos C_T para a folha de cálculo mais adequada, obtiveram-se as concentrações discriminadas na Tabela 13. As concentrações dos alvos SA e Y foram obtidas com base na curva de calibração para amostras com um *punch* de 0,5 mm no poço de reação (Figura 22).

Os valores teoricamente esperados foram comparados com os valores de concentração dos *standards* obtidos para o alvo SA e Y visto estes serem aqueles que aparentam ser mais afetados com a adição de um *punch* de 0,5 mm no poço da reação. Foi também estudada a influência do *punch* no IPC C_T através da comparação entre os IPC C_T dos *standards* com e sem *punch*, pelo que utilizaram-se, para este alvo, diferentes curvas de calibração, as presentes na Figura 16 caso os *standards* não tivessem *punch* ou as da Figura 22 caso tivessem.

Tabela 13. Concentrações esperadas versus concentrações de DNA obtidas com o kit Quantifiler® Trio para os alvos SA e Y.

		Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5
Concentração esperada (ng/μL)		50	5	0,5	0,05	0,005
Concentração obtida (ng/ μL) com um <i>punch</i> de 0,5 mm no poço de reação	Alvo SA (σ)	37,105 (10,42)	3,714 (0,54)	0,360 (0,01)	0,037 (0,01)	0,002 (0,0002)
	Alvo Y (σ)	42,477 (8,53)	4,300 (0,30)	0,422 (0,03)	0,044 (0,01)	0,003 (0,001)
Diferença entre a concentração obtida e esperada (%)	Alvo SA	-25,8	-25,7	-28,0	-26,4	-53,9
	Alvo Y	-15,0	-14,0	-15,6	-13,0	-43,0
IPC C _T para cada STD sem <i>punch</i> (σ)		30,08 (0,05)	28,71 (0,09)	27,18 (0,03)	27,06 (0,05)	27,09 (0,06)
Diferença entre IPC C _T com e sem <i>punch</i> (%)		0,1	-0,01	-1,2	-0,7	-0,2

É possível inferir que para o Std. 5 com uma concentração de 0.005 ng/μL existe uma maior diferença (54% para o alvo SA e 43% para o alvo Y) entre a concentração esperada e a obtida, resultado que poderá ser devido a efeitos estocásticos.

É ainda possível observar que existe uma subestimação na quantificação do DNA total (alvo SA) em todos os *standards* entre 26% a 54% e uma subestimação entre 13% a 43% nos resultados de quantificação masculina, o que denota que os resultados obtidos para o alvo Y estão mais próximos do espectável. Através da análise do *multicomponent* da reação NTC com um *punch* de 0,5 mm (Figura 20) observa-se que o fluorocromo FAM (alvo Y) aparenta sofrer menos alterações no nível de fluorescência da linha basal em comparação com o fluorocromo VIC (alvo SA), o que poderá explicar e corroborar as quantificações obtidas (Figura 20). A subestimação dos resultados pode ter sido originada pela presença do *punch*, o qual pode ter interferido com a detecção da fluorescência. Deste modo, devido à presença do *punch*, o *software* pode ter necessitado de um maior número de ciclos para conseguir detetar a fluorescência. Isto correspondeu, por sua vez, a um C_T mais elevado em todos os *standards* e, por consequência, uma subestimação das concentrações de DNA.

Constata-se também a existência de pequenas variações nas concentrações médias de cada *standard*, à exceção do *standard* 1, o que se reflete na exatidão de cada repetição observada pelos baixos desvios padrão. Relativamente ao *standard* 1, este

apresenta um desvio padrão mais elevado que pode ter sido provocado por um erro de pipetagem de uma das repetições do *standard*.

Embora ocorra um aumento do IPC C_T à medida que aumenta o *input* da concentração de DNA, a presença de um *punch* de 0,5 mm na reação de quantificação não aparece afetar os valores do IPC C_T . Observa-se ainda que, com exceção do *standard* 1, os *standards* com um *punch* apresentam um IPC C_T menor, bem como um desvio padrão mais baixo.

De acordo com a bibliografia consultada, é recomendado que os resultados de quantificação sejam analisados após a alteração de algumas configurações da linha basal, nomeadamente em que ciclo inicia e em qual termina (isto é, o intervalo) para os alvos SA e Y [40, 41].

A linha basal corresponde aos ciclos iniciais de qPCR onde existe pouca variação na fluorescência encontrada no *background*. Já o intervalo da linha basal refere-se à secção horizontal (plana) da linha basal que é utilizada para definir manualmente o ciclo em que esta inicia e termina (ciclo inicial da linha basal e ciclo final da linha basal, respetivamente).

O *software* do equipamento 7500 *real-time PCR System* utiliza, como predefinição, um intervalo entre o ciclo 3 e o 15. A maioria das distorções inesperadas na curva de amplificação (linha basal inclinada ou com formas irregulares) ocorrem devido à utilização de um intervalo desapropriado, o qual necessita ser corrigido manualmente (sendo que, teoricamente, cada poço pode precisar de ter configurações e intervalos diferentes).

Ao configurar a linha basal, deve-se ter em consideração que o intervalo deve ter, no mínimo, 5 ciclos, sendo benéfico a adição de um maior número de ciclos. Como ciclo inicial da linha basal deve-se escolher um ciclo que esteja após o *background noise* inicial e o ciclo final da linha basal deve-se situar antes da mudança de sinal devido à amplificação.

Durante a PCR, a alteração das condições da reação pode influenciar a fluorescência. Geralmente e tal como foi dito antes, o nível de fluorescência em qualquer poço corresponde à quantidade de DNA presente. O *background noise* é mais evidente durante os primeiros ciclos de PCR antes da acumulação significativa de produto amplificado. Durante estes primeiros ciclos de PCR, o *background noise* em todos os poços é utilizado para determinar o nível de fluorescência da linha basal de toda a placa. A análise dos dados tem como objetivo determinar o momento em que a amplificação do alvo

encontra-se acima do *background noise*, facilitando medidas mais precisas de fluorescência.

Por considerar a definição manual e individual do intervalo de linha basal mais ajustado para cada amostra um método pouco prático na rotina laboratorial forense, visto implicar uma detalhada análise de todos os gráficos, o que acaba por ser uma tarefa bastante demorada, optou-se por encontrar um intervalo de linha basal o mais abrangente possível de forma a englobar os intervalos de todos *standards*. Assim sendo, após o estudo das curvas de amplificação e da análise da alteração das configurações, optou-se por, nos alvos LA e IPC, se utilizar as configurações predefinidas do *software* (linha basal entre 3 a 15) e, para os alvos SA e Y, utilizar um intervalo de linha basal ajustado manualmente.

Com esse objetivo, foram analisados individualmente os *amplification plots* de todos os *standards*, tendo-se obtido os intervalos mais ajustados para cada alvo. Observou-se que, à medida que aumentava a concentração de DNA, cada *standard* ia requerendo um intervalo crescente. Assim sendo, após a análise de todos gráficos obteve-se os seguintes intervalos para cada *standard*: Std. 1 – [13 a 18]; Std.2 – [15 a 20]; Std. 3 – [17 a 22]; Std. 4 – [23 a 28] e Std. 5 – [25 a 30]. De seguida, conjugaram-se todos os intervalos, dos quais resultaram cinco combinações de intervalos possíveis: [17 a 22]; [13 a 22]; [13 a 18]; [11 a 20] e [11 a 18]. A escolha do ciclo inicial de linha basal dos dois últimos intervalos teve por base um artigo sobre quantificação direta, no qual o autor aconselhava a subtrair 7 CN (*Cycle Number*) ao CN do “cotovelo” da curva de amplificação, ou seja, verificou-se que, em alguns *standards*, a mudança de sinal ocorria no ciclo número 18, pelo que subtraiu-se 7 valores a esse, resultando no ciclo inicial de linha basal 11 [41]. Os resultados obtidos para a concentração total de DNA (alvo SA), bem como a respetiva diferença entre concentração esperada *versus* obtida encontram-se dispostos na Tabela 14. Após este processo, verificou-se que os intervalos de [13 a 18] e [11 a 18] exibiam resultados mais consistentes e próximos dos teoricamente esperados, visto que os restantes intervalos ainda apresentavam disparidade e subestimação das concentrações obtidas para o Std. 1. Entre as duas opções possíveis, optou-se pela utilização do intervalo de [11 a 18], pois, este apresenta na maioria dos *standards* uma menor diferença entre a concentração esperada *versus* concentração obtida. Para além disso, tal como já foi referido anteriormente, é benéfico a adição de um maior número de ciclos ao intervalo de linha basal.

Tabela 14. Concentração de DNA total para cada intervalo de linha basal estudado e respetiva diferença entre concentração obtida *versus* concentração esperada.

	[7 a 22]	Diferença	[13 a 22]	Diferença	[13 a 18]	Diferença	[11 a 20]	Diferença	[11 a 18]	Diferença
Std.1	13,61	-73%	20,35	-59%	44,43	-11%	34,42	-31%	44,50	-11%
Std.2	4,47	-11%	4,76	-5%	5,67	13%	5,28	6%	5,58	12%
Std.3	0,55	9%	0,54	7%	0,54	8%	0,54	8%	0,53	5%
Std.4	0,08	58%	0,07	35%	0,06	18%	0,06	24%	0,06	14%
Std.5	0,005	2%	0,005	1%	0,005	-8%	0,005	-7%	0,004	-10%

Posto isto, o intervalo de linha basal do ciclo 11 ao 18 foi predefinido para os alvos SA e Y de amostras com um punch. Enquanto os alvos LA e IPC mantiveram o intervalo predefinido pelo *software* de 3 a 15. Os resultados das concentrações obtidas após as alterações realizadas estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Concentrações esperadas *versus* concentrações de DNA obtidas com o kit *Quantifiler® Trio* para os alvos SA, LA e Y após a alteração das configurações da linha basal.

		Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5
Concentração esperada (ng/μL)		50	5	0,5	0,05	0,005
Concentração obtida (ng/ μL) com um punch de 0,5 mm no poço de reação	Alvo SA (σ)	44,500 (7,17)	5,579 (0,76)	0,526 (0,01)	0,057 (0,03)	0,0045 (0,0001)
	Alvo Y (σ)	45,472 (6,63)	5,315 (0,36)	0,516 (0,01)	0,059 (0,02)	0,0044 (0,001)
	Alvo LA (σ)	46,270 (5,99)	5,340 (0,34)	0,495 (0,03)	0,061 (0,03)	0,0044 (0,0003)
Diferença entre a concentração obtida e esperada (%)	Alvo SA	-11,0	11,6	5,1	14,5	-10,1
	Alvo Y	11,6	6,3	3,3	19,0	-12,0
	Alvo LA	-7,5	6,8	-1,0	21,7	-11,7

A concentração de DNA nas gamas de valores mais extremas (50 e 0.005 ng/μL) exhibe uma subestimação dos resultados de quantificação de -10 e -11% para o alvo SA, -9 e -12% para o alvo Y e -8 e -12% para o alvo LA, sendo que para este alvo também existe uma subestimação nos resultados do *standard* 3 de -1%. Consta-se também que para os *standards* 2, 3 e 4 existe uma sobrestimação dos resultados entre 5 a 15% no alvo SA, entre 3 a 19% no alvo Y e no alvo LA esta sobrestimação verifica-se unicamente nos *standards* 2 e 4 de 7 e 22%, respetivamente.

Tal como na Tabela 13 verifica-se a existência de pequenas variações nas concentrações médias de cada *standard*, com exceção do *standard* 1, o que se reflete na exatidão de cada repetição observado pelos baixos desvios padrão. O *standard* 1 continua a apresentar um desvio padrão mais elevado em comparação com os restantes, o que pode ter sido provocado por um erro de pipetagem.

Alguns estudos afirmam que o alvo LA, por não apresentar alteração no nível de fluorescência basal, pode ser o melhor indicador da concentração total de DNA [41]. Nesse sentido, procurou-se verificar se existem diferenças significativas entre as concentrações de DNA obtidas para os alvos SA e LA. Através da análise da Tabela 15 é possível inferir que o alvo SA apresenta menor variação para concentrações inferiores a 0.05 ng/μL. Tendo em conta que as amostras problema no âmbito da criminalística biológica contêm, muitas vezes, concentrações ínfimas de DNA, considera-se o alvo SA o mais indicado para a quantificação do DNA total presente nessas amostras. Em relação às restantes concentrações de DNA, a diferença entre as concentrações obtidas para o alvo SA e LA não são muito discrepantes.

Estes resultados apontam para que o intervalo da linha basal entre o ciclo 11 a 18 seja apropriado para uma gama de concentrações alargada, pelo que foi o intervalo utilizado em todas as análises elaboradas com o *kit Quantifiler® Trio*. Não obstante a sobrestimação observada, os valores de quantificação obtidos devem ser considerados como meramente orientativos, estando plenamente demonstrado que a quantificação fornece valores aproximados e não resultados exatos.

Este estudo não foi realizado para o *kit PowerQuant™* devido ao facto de não se observar alterações nos níveis de fluorescência da linha basal.

Procurou-se ainda estudar se a alteração da linha basal e, consequentemente, dos resultados da quantificação do alvo SA e Y teriam algum impacto no índice de degradação, parâmetro que é obtido através da razão entre a concentração do alvo SA e a concentração do alvo LA. O resultado desse estudo pode ser observado na Tabela 16.

Tabela 16. Índice de degradação (ID) obtido nos diferentes *standards* para quantificações sem *punch* e com um *punch* para os intervalos de linha basal de 3-15 e 11-18.

	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5
ID (Linha basal ¹ sem <i>punch</i>)	1,295	1,158	0,918	0,876	1,316
ID (Linha basal ² 3-15*)	0,794	0,694	0,728	0,611	0,522
ID (Linha basal ² 11-18*)	0,960	1,042	1,064	0,927	1,020

*Quantificação realizada com um *punch* de 0,5 mm no poço da reação. ¹análise realizada com a utilização da curva de calibração para amostras sem *punch*. ² análise realizada com a utilização da curva de calibração para amostras com *punch*.

Segundo o manual do *kit Quantifiler® Trio* os valores do índice de degradação podem ser divididos em quatro categorias: com uma quantificação abaixo de 1,5 é pressuposto que a amostra não esteja degradada; acima desse valor e até 4 é dito que a amostra está ligeiramente degradada; de 4 até 10 a amostra já se encontra degradada; enquanto um ID acima de 10 corresponde a amostras severamente degradadas.

Tendo em consideração os resultados obtidos, nenhum dos *standards* apresenta degradação, sendo o ID mais baixo nos *standards* com *punch* e uma linha basal entre 3 a 15. Como seria esperado, o aumento da concentração do alvo SA acarreta um aumento do índice de degradação, mas nada considerável tendo em conta que se encontra abaixo do obtido para os *standards* sem *punch*. Deste modo, reforça-se a utilização do intervalo de 11 a 18 para amostras diretamente quantificadas para os alvos afetados pela presença de um *punch* no poço de reação.

4.4. Resultados de quantificação de DNA de amostras de referência

É importante salientar que as concentrações obtidas para o ensaio de quantificação direta vêm sob a forma de ng/*punch*, enquanto as amostras extraídas apresentam um resultado de quantificação em ng/μL. Deste modo, apesar de se referirem à mesma amostra, não é correto fazer uma correlação direta entre as concentrações obtidas nas duas metodologias. No entanto, a comparação entre os dois gráficos (amostras extraídas *versus* diretamente quantificadas) é bastante útil para tirar ilações acerca da presença de inibidores e/ou do nível de degradação da amostra.

É ainda importante realçar que todos os resultados apresentados no decorrer deste trabalho resultam da média dos valores obtidos para cada alvo.

4.4.1. Amostras de sangue, saliva e sêmen quantificadas com o kit Quantifiler® Trio

Os resultados para cada alvo das amostras extraídas de sangue, bem como os respetivos IPC C_T e índices de degradação estão representados na Figura 23. As amostras de sangue foram extraídas pelo método do *Chelex*.

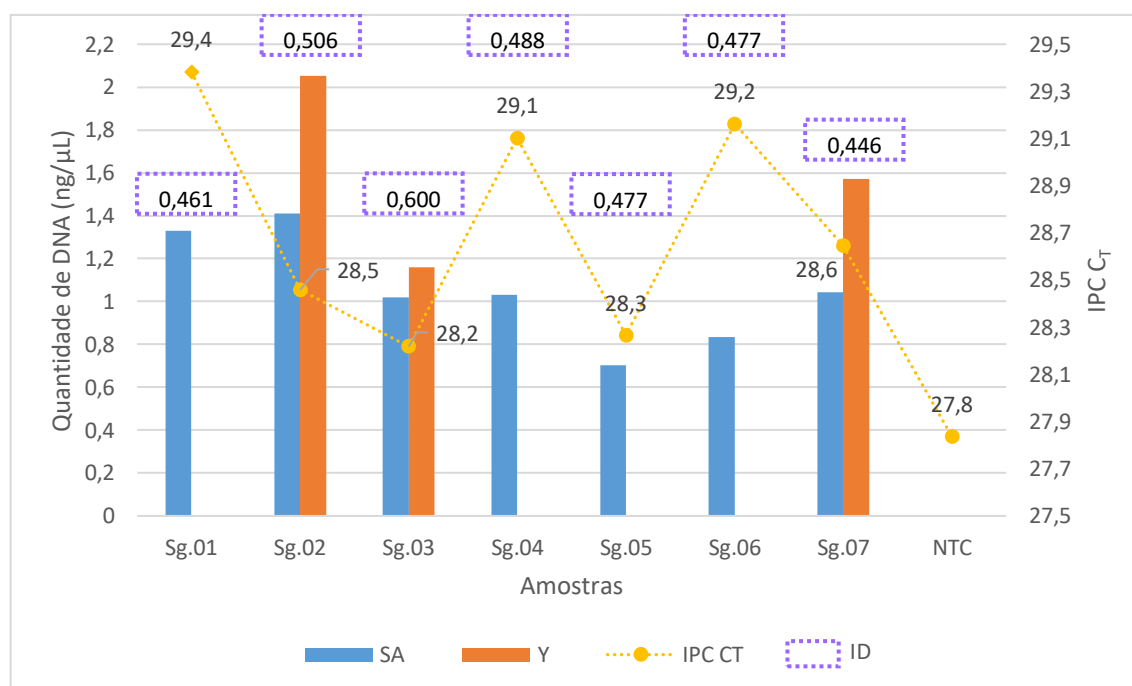


Figura 23. Resultados obtidos da quantificação das **amostras extraídas** de sangue em cartão FTA® (*kit* QT).

Os resultados das amostras de sangue diretamente quantificadas podem ser observados na Figura 24.

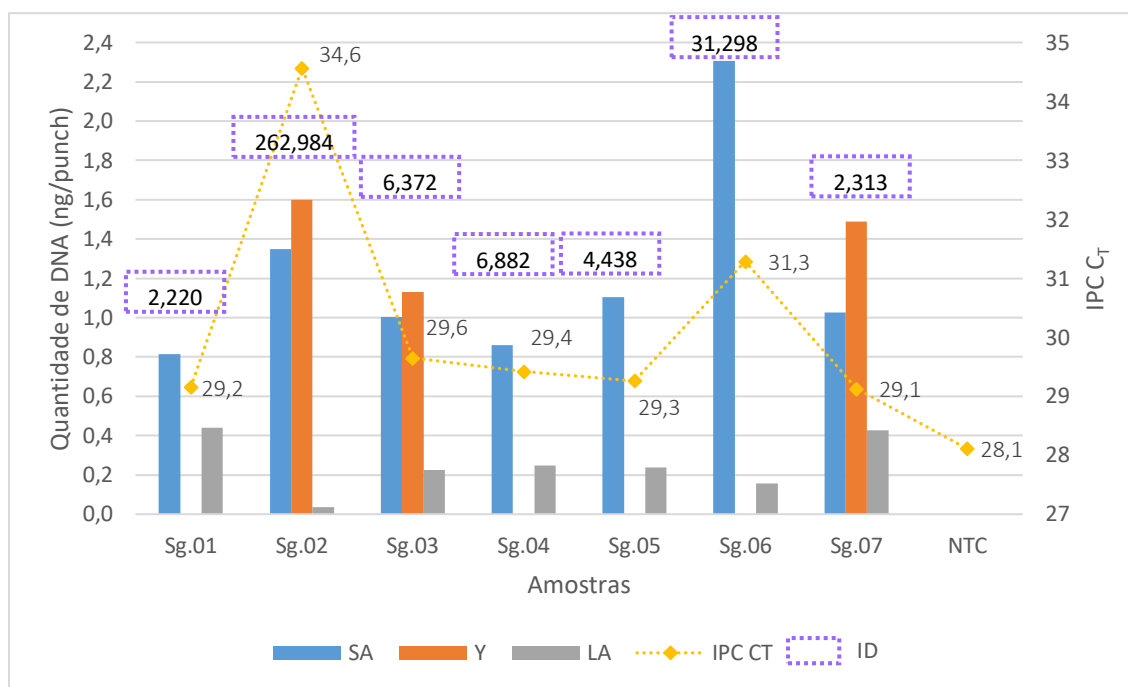


Figura 24. Resultados obtidos da **quantificação direta** das amostras de sangue em cartão FTA® (kit QT).

Através da análise dos gráficos que opõem os resultados de quantificação das amostras diretamente quantificadas às extraídas, é possível observar que, relativamente aos IPC C_T das reações NTC, as amostras de sangue apresentam níveis de IPC C_T mais elevados, especialmente as amostras diretamente quantificadas. Este facto indicia a presença de inibidores nas amostras, sendo o mais provável o grupo heme (hematina) do sangue, pelo que o grau de inibição pode estar correlacionado com a concentração sanguínea. É de realçar que cada alvo sofreu níveis de inibição diferentes.

Parece ainda haver uma relação entre o alvo LA e o IPC, visto que, as amostras com um índice de degradação elevado (acima de 10 valores) apresentam também um IPC C_T muito acima ao da reação NTC. Teoricamente, este ID está associado a uma diminuta ou mesmo ausência da quantificação do alvo LA, sendo sinónimo da presença de extrema degradação nas amostras. No entanto, devido aos elevados valores de IPC C_T, supõem-se que o alvo LA foi inibido, o que resultou na subestimação da quantidade de DNA real. A literatura afirma que quando uma amostra apresenta um IPC C_T acima de 30 ou quando um alvo não ultrapassa o *threshold* até ao ciclo 28-30 existe na reação inibidores da PCR, pelo que, através da análise da Figura 24 e da Figura 25 (a qual apresenta os *amplification plots* das amostras Sg.02 e Sg.06), fica demonstrado que estas amostras encontram-se efetivamente inibidas.

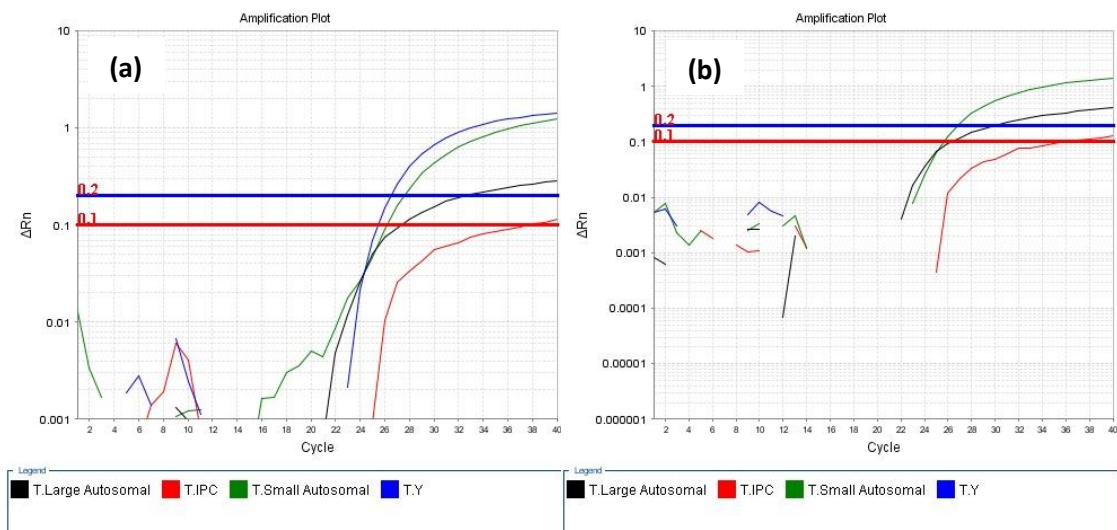


Figura 25. Amplification Plots das amostras diretamente quantificadas: (a) Sg.02; (b) Sg.06.

Deste modo, é possível concluir que as amostras de sangue contêm inibidores da PCR que comprometem a técnica da quantificação direta por PCR em tempo real. Neste sentido, não é incorreto inferir que os resultados quantitativos das amostras diretamente quantificadas podem ser inferiores aos reais, o que é corroborado com valores de IPC C_T inferiores ($ID < 0,6$) nas amostras extraídas, uma vez que a metodologia de extração por *Chelex*, embora não consiga remover totalmente os inibidores, permite diluí-los, limitando a sua ação. Assim sendo, pode-se concluir que, apesar de nas experiências iniciais os alvos LA e IPC terem demonstrado que não eram afetados pela presença de um *punch*, quando se adiciona uma amostra de sangue não extraída, alguns alvos são inibidos pela hematina, pelo que não são amplificados com tanta eficácia. Isto ocorre com mais frequência em sequências de amplificação maiores, sendo deste modo o alvo LA e o alvo IPC (com 214 pb e 130 pb, respetivamente) os mais suscetíveis a falhas de amplificação devido a inibição.

Os resultados para cada alvo das amostras extraídas de saliva e de sêmen, bem como os respetivos IPC C_T e índices de degradação estão representados na Figura 26. As amostras de saliva foram extraídas pelo método do *Chelex*, enquanto as amostras de sêmen foram extraídas com recurso ao *kit PrepFiler*.

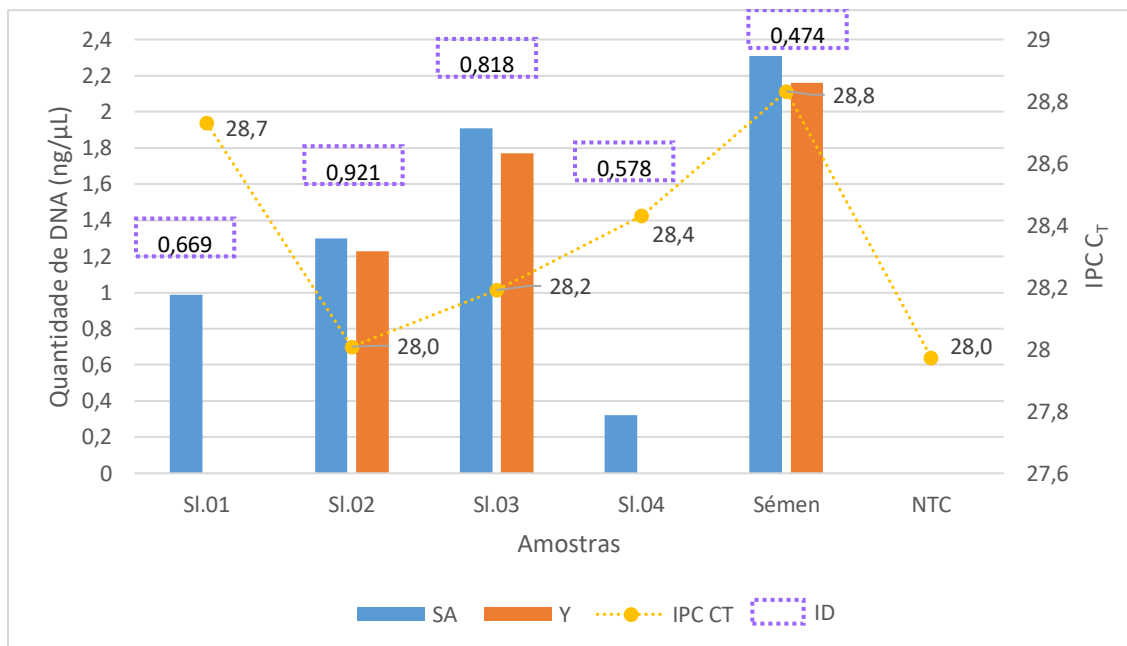


Figura 26. Resultados obtidos da quantificação das **amostras extraídas** de saliva e sêmen em cartão FTA® (kit QT).

Os resultados das amostras de saliva e de sêmen diretamente quantificadas podem ser observados na Figura 27.

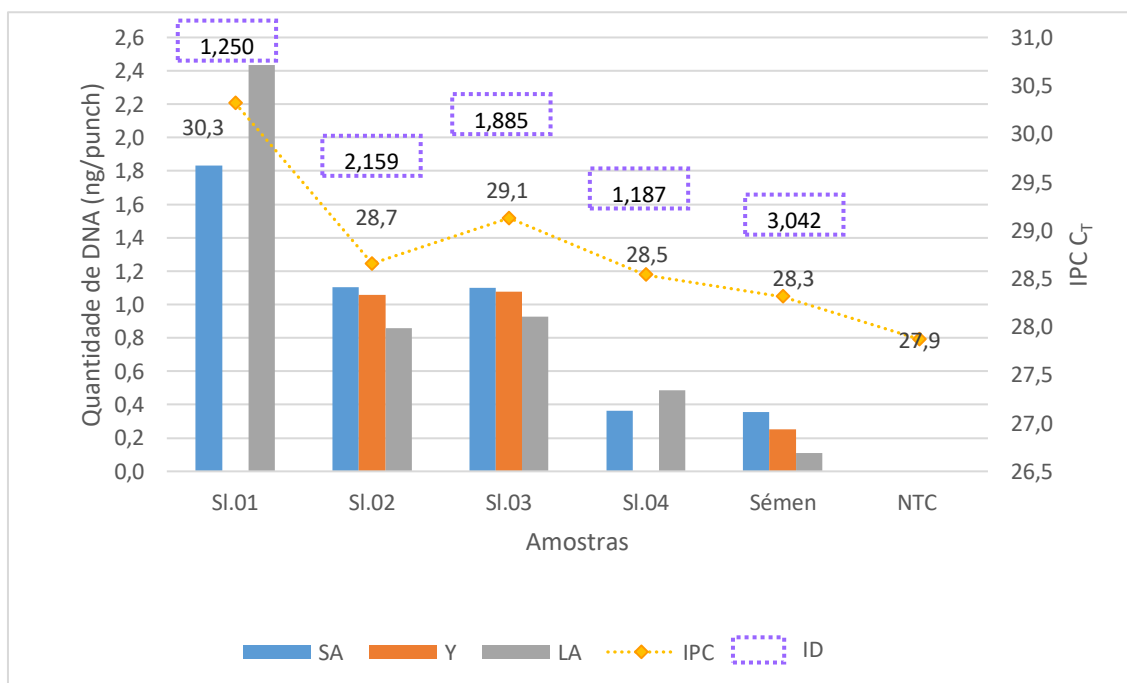


Figura 27. Resultados obtidos da **quantificação direta** das amostras de saliva e sêmen em cartão FTA® (kit QT).

Apesar de algumas amostras diretamente quantificadas continuarem a demonstrar um ligeiro índice de degradação observa-se que, em comparação com o ensaio realizado com o sangue, apresentam índices consideravelmente inferiores. A isto alia-se o facto de terem, aparentemente, sofrido menos efeitos de inibição, situação corroborada pela diminuição dos valores de IPC C_T , com exceção da amostra SI.01. Este resultado pode ser explicado pela natureza incolor e constituição do fluído biológico em consideração, o qual não contém tantos inibidores da PCR quanto o sangue.

A amostra de Sémen é a que exhibe uma maior discrepância entre as concentrações obtidas pela metodologia de quantificação direta e a quantificação realizada após extração por *PrepFiler*. Embora não seja possível, tal como já foi referido, correlacionar diretamente os resultados obtidos em ambas as metodologias, observou-se que, na quantificação direta a amostra com a menor concentração de DNA é a de Sémen (0,3g ng/punch) (Figura 27), enquanto a mesma amostra, após a extração (Figura 26) demonstra uma concentração de 2,3 ng/μL. Este facto pode ser explicado muito provavelmente devido à ausência de uma etapa de extração. O DNA encontra-se no interior da cabeça dos espermatozóides revestidos pelo acrossoma, o qual possui um elevado número de pontes de dissulfeto entre as cisteínas. A adição de um agente redutor, sendo o ditioneitol (DTT) o habitualmente mais utilizado nos *kits* de extração, vai permitir quebrar as ligações dissulfeto e libertar o DNA dos espermatozóides. Nesse sentido, estes resultados podem ser explicados em consequência da inexistência da lise da cabeça dos espermatozóides, o que originou a que só fosse quantificado o DNA não espermático presente na amostra.

4.4.2. Amostras de sangue, saliva e sémen quantificadas com o kit *PowerQuant*TM

Os resultados obtidos para cada alvo nas amostras de sangue extraídas pela metodologia de *Chelex*, bem como os respetivos IPC C_T e índices de degradação estão representados na Figura 28.

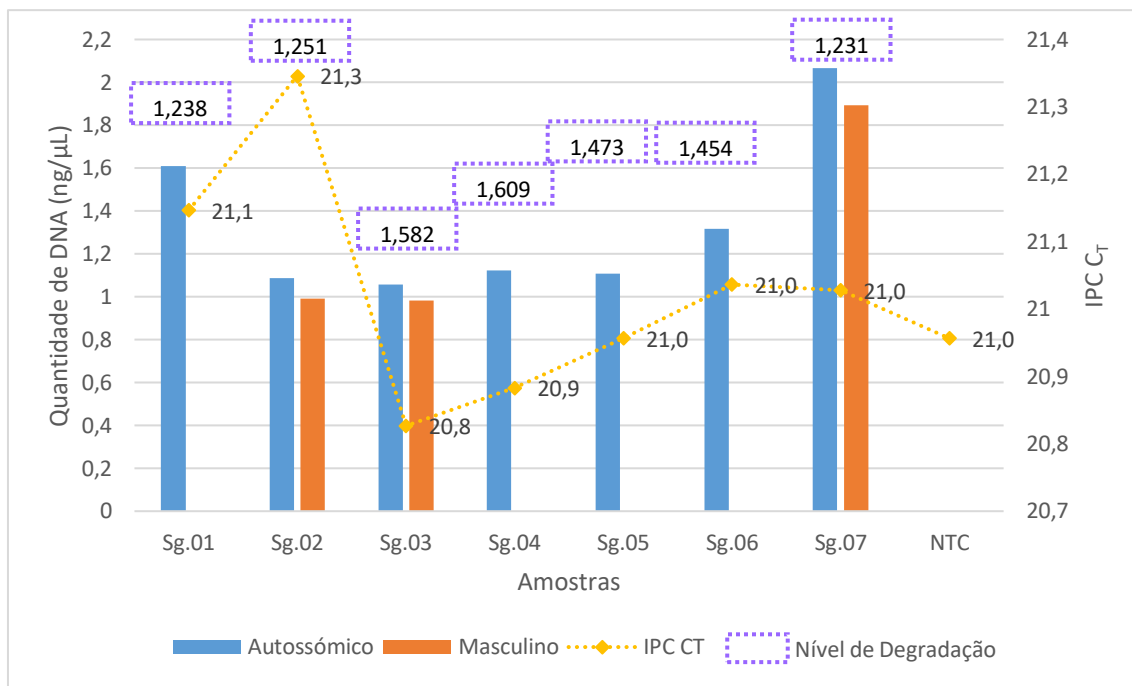


Figura 28. Resultados obtidos da quantificação das **amostras extraídas** de sangue em cartão FTA® (kit PQ).

Os resultados obtidos no ensaio de quantificação direta de amostras de sangue para cada alvo e os seus respectivos índices de degradação e IPC C_T podem ser visualizados na Figura 29.

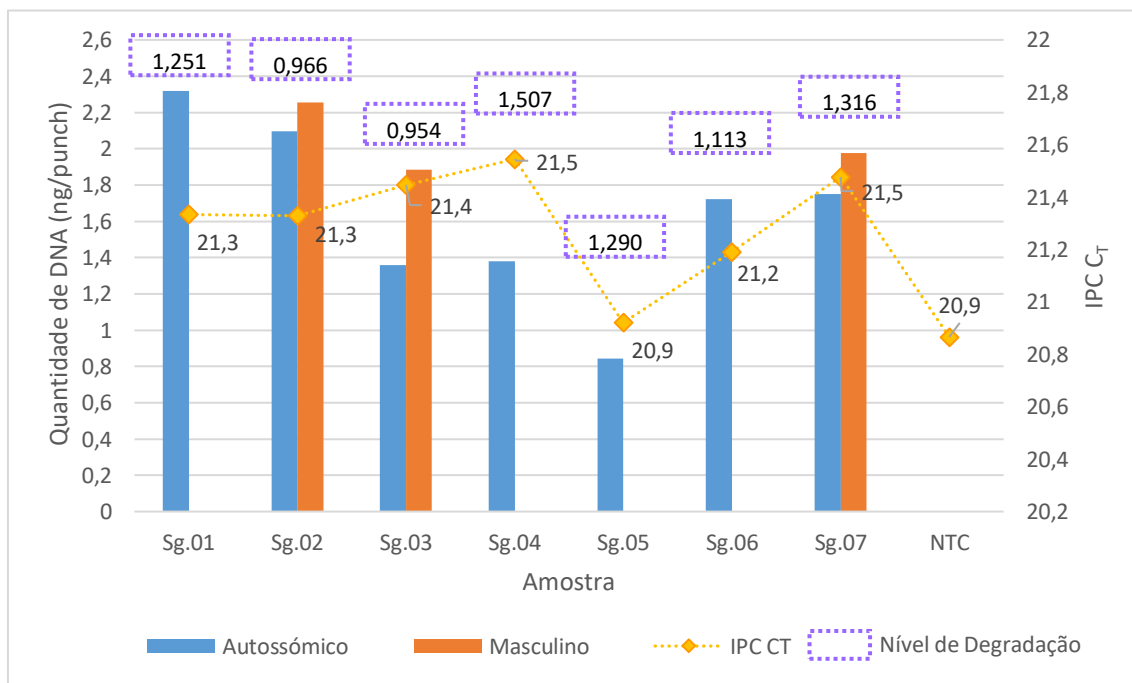


Figura 29. Resultados obtidos da **quantificação direta** das amostras de sangue em cartão FTA® (kit PQ).

Na primeira análise aos gráficos das amostras de sangue diretamente quantificadas, observa-se de imediato que, nas reações NTC o IPC C_T do *kit PowerQuant™* (IPC $C_T = 20.9$) é bastante inferior ao do *kit Quantifiler® Trio* (IPC $C_T = 28.1$). Comparando dentro do ensaio realizado às amostras de sangue (Figura 29), verificam-se menores oscilações nos valores de IPC C_T , o que significa que estas amostras foram sujeitas a menos efeitos de inibição. Desta forma, fica evidente que o *kit PowerQuant™*, comparativamente ao *kit Quantifiler® Trio*, é menos sensível aos inibidores presentes nas amostras.

No manual do *kit PowerQuant™* é referido que uma amostra encontra-se degradada quando o nível de degradação é igual ou superior a 2 valores. Como se pode constatar, através da observação da Figura 28, todos os valores de degradação encontram-se abaixo desse limiar. Em relação ao nível de degradação das amostras diretamente quantificadas *versus* extraídas verifica-se que não existe uma diferença significativa entre os valores obtidos. Constata-se que, as amostras que não foram extraídas, em comparação com os resultados obtidos com o *kit Quantifiler® Trio*, apresentam níveis de degradação significativamente mais baixos.

Por sua vez, tirando a amostra Sg.06, as amostras que foram diretamente quantificadas também exibem concentrações de DNA superiores, quase sempre acima de 1 ng/punch.

Os resultados obtidos nas amostras de saliva e de sêmen extraídas para cada alvo, bem como os respetivos IPC C_T e índices de degradação estão representados na Figura 30. Os resultados das mesmas amostras submetidas à metodologia de quantificação direta estão discriminados na Figura 31.

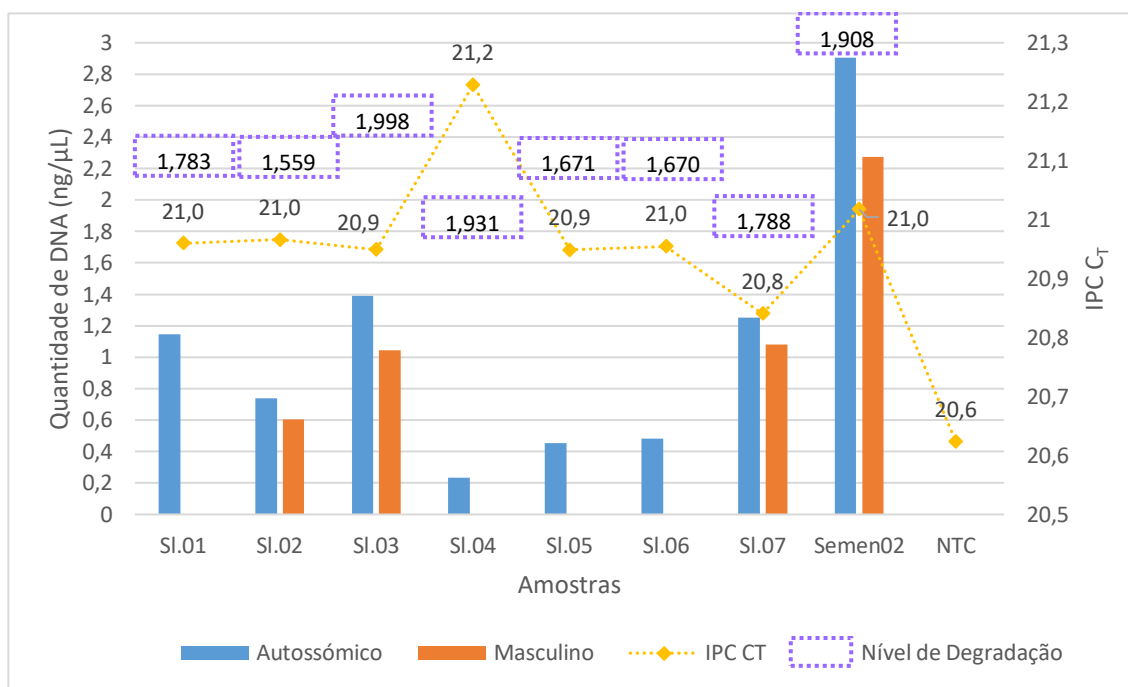


Figura 30. Resultados obtidos da quantificação das amostras **extraídas** de saliva e sêmen em cartão FTA® (kit PQ).

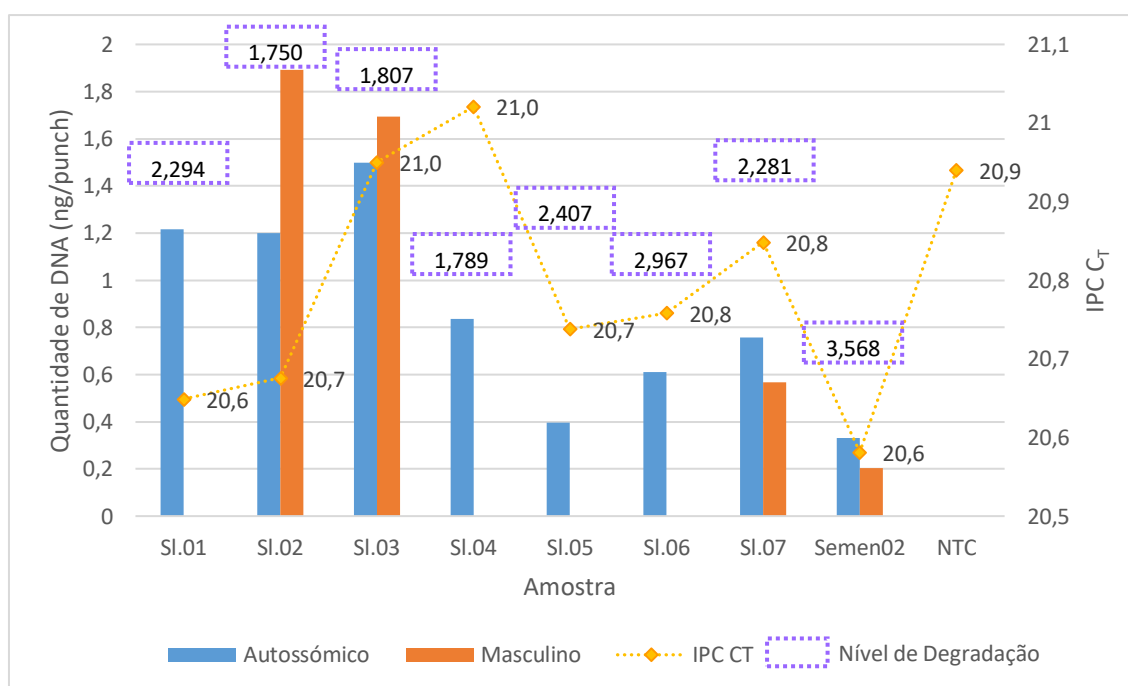


Figura 31. Resultados obtidos da **quantificação direta** das amostras de saliva e sêmen em cartão FTA® (kit PQ).

De um modo geral, pode-se notar que existe um ligeiro aumento no nível de degradação das amostras de saliva e de sêmen diretamente quantificadas, como se pode

observar na Figura 31. Este aumento não está relacionado com um aumento no IPC C_T , pelo que à partida pode-se descartar a hipótese de inibição. Aliás, a comparação entre os níveis de degradação obtidos com os dois *kits* de quantificação demonstra que, as amostras de saliva e sémen extraídas apresentam níveis superiores para o *kit PowerQuant*, apesar de não ultrapassarem o limite máximo estabelecido pelo *software*.

Conclui-se ainda que, as amostras de saliva exibem uma concentração de DNA inferior em relação às de sangue, provavelmente devido à perda de DNA durante a transferência secundária do epitélio bucal da zaragatoa para o cartão FTA[®].

Após as experiências iniciais realizadas com as amostras de referência, considerou-se que o *kit PowerQuant*[™] apresentou resultados mais robustos, pelo que optou-se pela realização das subseqüentes experiências de quantificação de amostras simuladas com recurso a este *kit*. Nesta decisão, também se teve em consideração os ensaios efetuados com as reações NTC, nos quais o *kit PowerQuant*[™] não exibiu alterações nos níveis de fluorescência da linha basal, o que reforça a escolha deste *kit* nos ensaios de quantificação direta.

4.5. Resultados de quantificação de DNA de amostras simuladas

Determinou-se a quantidade de DNA presente nos suportes porosos, isto é, nos tecidos, os quais foram, previamente à metodologia de quantificação, extraídos com recurso ao *kit PrepFiler*, estando os resultados obtidos representados na Figura 32.

De seguida, os tecidos foram humedecidos e pressionados com uma tira de limpeza. Deste modo, é possível determinar em amostras extraídas a percentagem de transferência de DNA dos tecidos para as tiras de limpeza. As tiras de limpeza foram ainda submetidas à metodologia de quantificação direta de DNA.

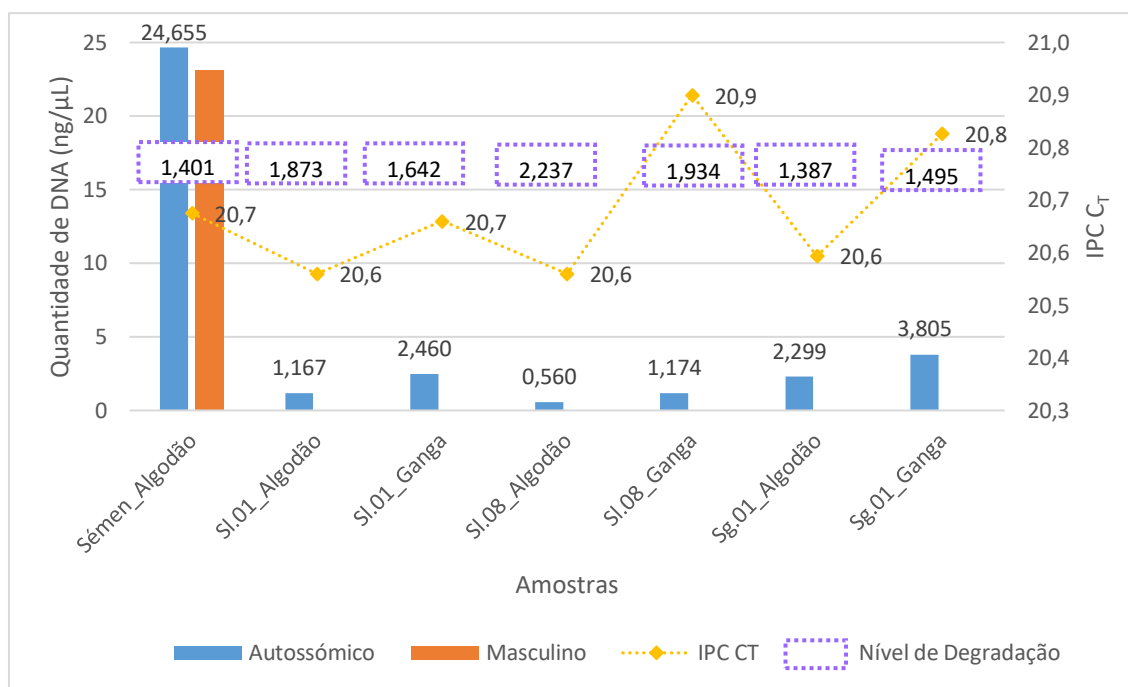


Figura 32. Resultados de quantificação dos **tecidos extraídos** de algodão e ganga nos quais foram depositados sangue (Sg), saliva (Sl) e sémen.

Numa primeira análise dos resultados, verifica-se que não existe grande variação no IPC C_T de cada amostra, bem como a maioria não apresenta degradação (Figura 32). Aliás, a amostra Sl.08_Algodão é a única que exibe um nível de degradação superior a 2 valores, porém este valor em comparação com os restantes não é muito significativo. Para além de que, como já foi referido, não existe discrepância entre o valor do IPC C_T , pelo que é possível descartar a hipótese de existirem inibidores na amostra.

Em relação às concentrações de DNA obtidas, observa-se que a amostra de Sémen tem uma concentração muito superior às restantes e que, de uma forma geral, as amostras de sangue exibem uma quantificação superior, sendo o tecido de ganga o que apresenta uma concentração de DNA superior para as amostras de sangue e de saliva. No caso das amostras de saliva, este acontecimento é facilmente explicado pela deposição de um volume superior de fluído biológico nos suportes de ganga.

Os resultados de quantificação das tiras de limpeza extraídas encontram-se discriminados na Figura 33. Ressalva-se que estas amostras foram extraídas com recurso ao *kit* de extração *PrepFiler*.

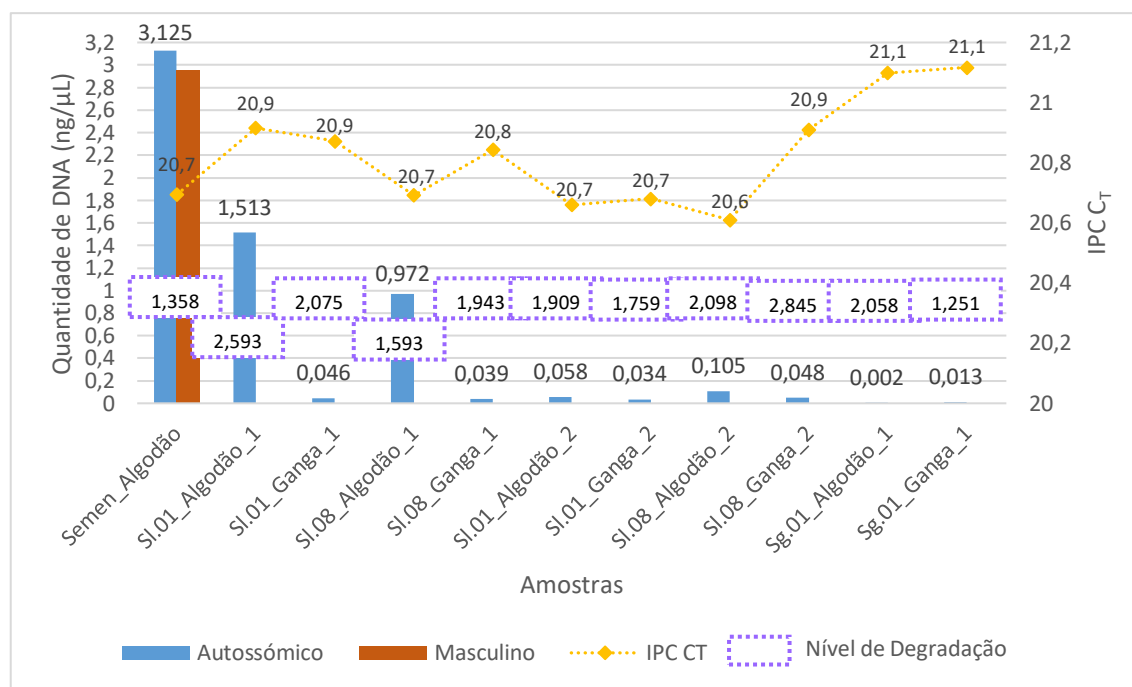


Figura 33. Resultados da quantificação das **tiras de limpeza extraídas** dos tecidos de algodão e ganga nos quais foram depositados sangue (Sg), saliva (Sl) e sêmen.

Os resultados de quantificação das tiras de limpeza diretamente quantificadas encontram-se discriminados na Figura 34.

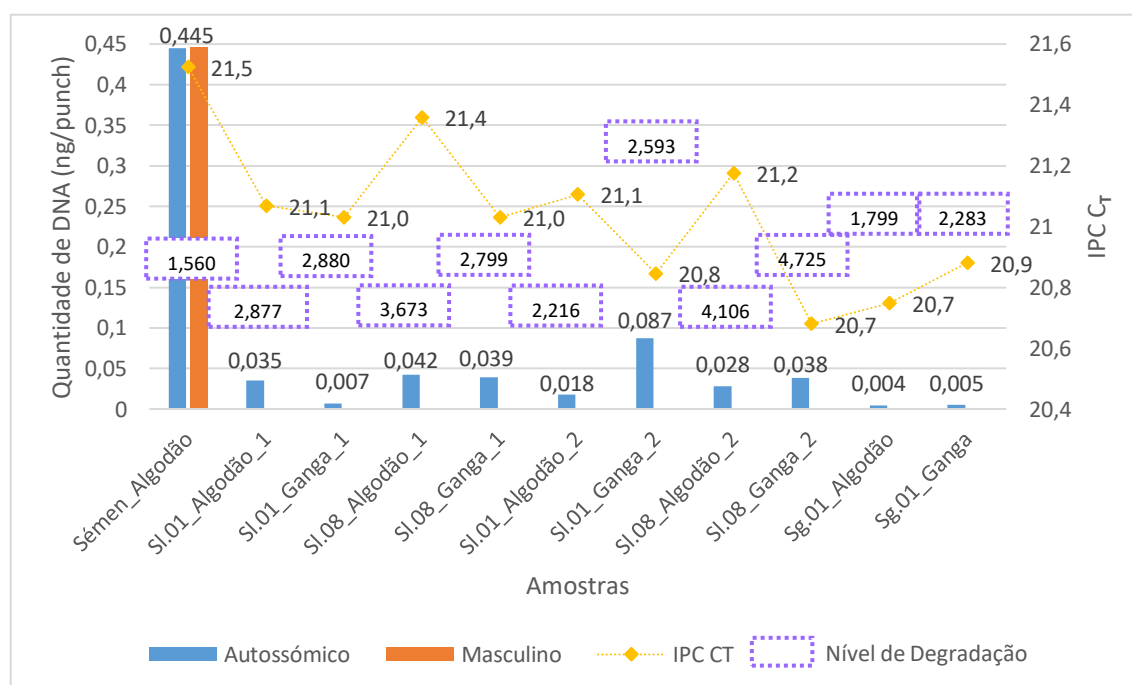


Figura 34. Resultados da **quantificação direta das tiras de limpeza** dos tecidos de algodão e ganga nos quais foram depositados sangue (Sg), saliva (Sl) e sêmen.

Como seria expectável, as amostras dos tecidos têm uma maior concentração de DNA. Por sua vez, as tiras de limpeza extraídas com o *kit PrepFiler* também apresentam, especialmente nas amostras de algodão, uma concentração superior de DNA em comparação com as amostras diretamente quantificadas

Observa-se nas tiras de limpezas diretamente quantificadas que existe uma maior variabilidade nos valores de IPC C_T , o que denota a presença de inibidores na corrida de quantificação, podendo os resultados estarem ligeiramente subestimados. Através da análise da Figura 34 verifica-se que somente duas amostras não apresentam níveis de degradação acima do limiar. Em oposição constata-se, a partir do estudo da Figura 33, que as respetivas amostras após a extração com recurso ao *kit PrepFiler* apresentam níveis de degradação menores. Existem 6 amostras extraídas que não ultrapassam o limiar de degradação, sendo que a amostra Sg.01_Algodão pela metodologia de quantificação direta indica não estar degradada, porém também é possível observar que, ao contrário da maioria das amostras em que a tendência é a amostra extraída ter uma concentração de DNA superior à diretamente quantificada, neste caso isso não se verifica.

A ganga é o suporte que exhibe mais material genético na maioria das amostras de sangue e saliva diretamente quantificadas, o que é concordante com os resultados da quantificação do DNA presente nos suportes. Porém, para as amostras de sangue e saliva extraídas, é o algodão que apresenta, por norma, concentrações superiores de DNA. Este resultado pode ter sido devido à colocação na etapa de extração, de um recorte/*punch* da tira de limpeza dos tecidos de ganga menos impregnado com material genético.

A ganga apresenta uma matriz na sua composição que pode levar a uma maior retenção de células, dificultando a limpeza e, portanto, transferência de material genético da ganga para a tira de limpeza. Uma justificação possível para o aumento do nível de degradação nas amostras diretamente quantificadas em comparação com as amostras de referência é a transferência de componentes presentes nos suportes que podem pontualmente interferir com a amplificação dos alvos. Aliás, vários estudos apontam o corante índigo da ganga como um inibidor da PCR.

De seguida, procedeu-se com a quantificação do DNA dos fluidos biológicos depositados nas lâminas de vidro. Os resultados das tiras de limpeza extraídas encontram-se dispostos na Figura 35, enquanto os resultados das tiras de limpeza quantificadas pela metodologia de quantificação direta encontram-se discriminados na Figura 36.

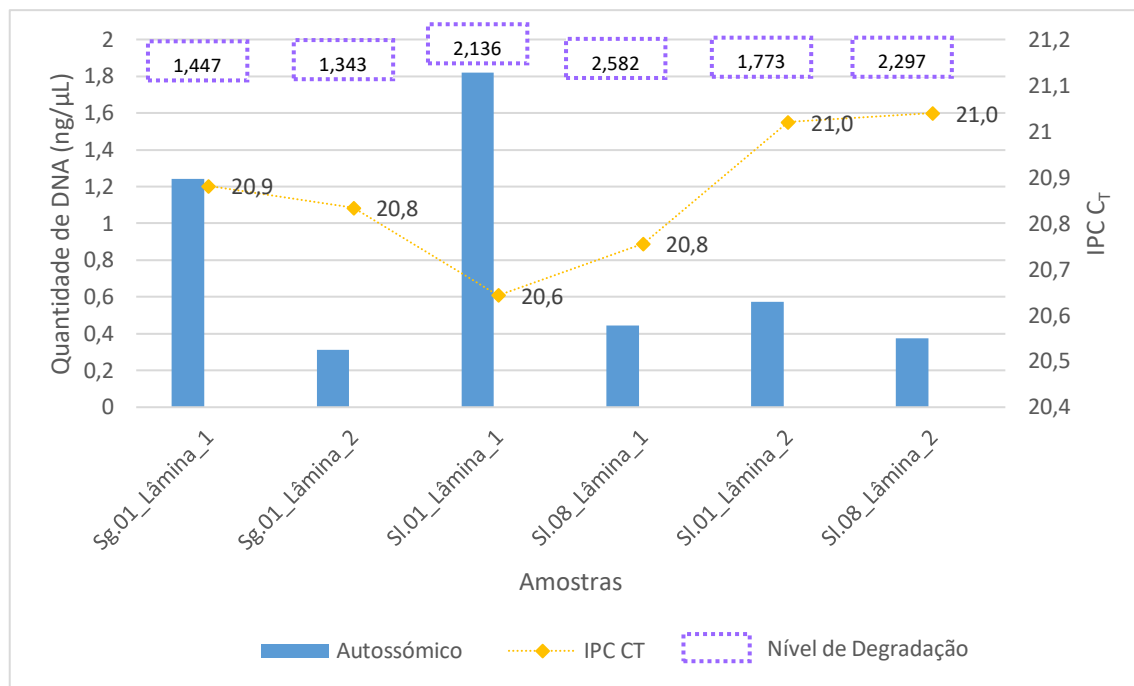


Figura 35. Quantificação **das tiras de limpeza extraídas** das lâminas de vidro nas quais foram depositadas sangue (Sg) e saliva (Sl).

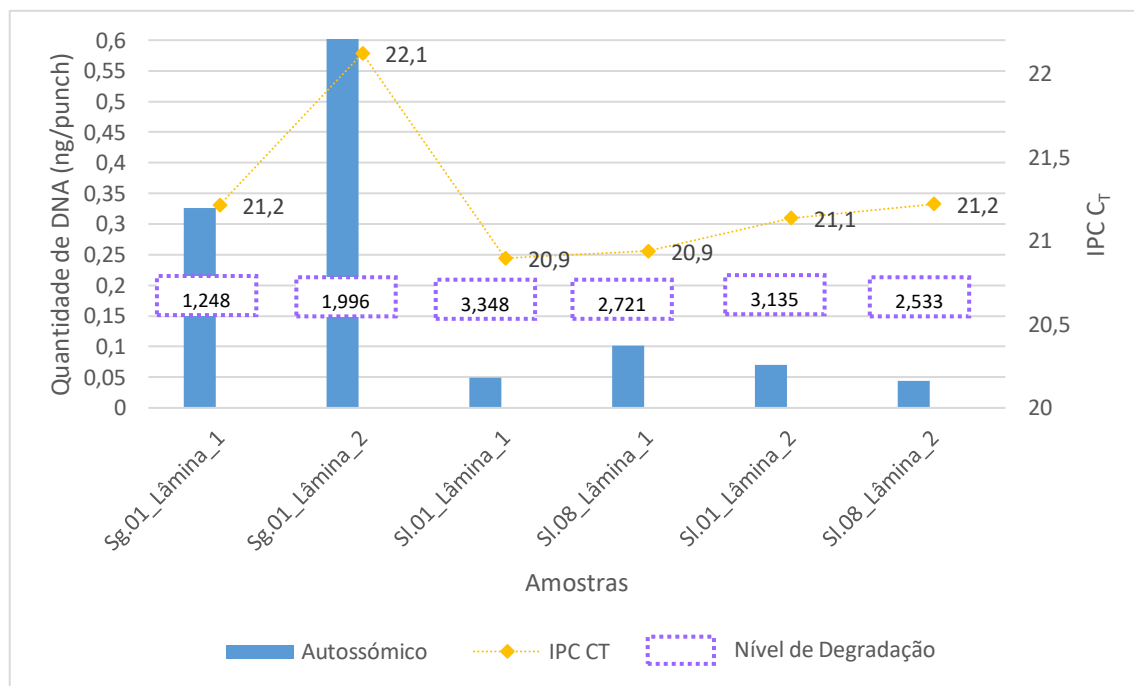


Figura 36. **Quantificação direta das tiras de limpeza** das lâminas de vidro nas quais foram depositadas sangue (Sg) e saliva (Sl).

É possível constatar que, com exceção da amostra Sg.01_Lâmina_2, as tiras de limpeza extraídas possuem uma maior concentração de DNA em relação às diretamente quantificadas. Este resultado pode ser explicado pelo facto de o *kit* de extração *PrepFiler* permitir concentrar as amostras.

Está descrito na literatura que a deposição direta de um fluído biológico num cartão FTA permite uma uniformização das células na matriz do mesmo. Porém, ao se realizar a limpeza dos tecidos/lâminas com uma tira de limpeza, não se consegue garantir que exista uma total uniformidade do material presente na matriz do cartão FTA. Posto isto, uma possível explicação para as diferenças de concentração de DNA verificadas em amostras extraídas *versus* diretamente quantificadas, prende-se com o facto de, apesar de corresponderem à mesma tira de limpeza, serem utilizadas diferentes porções (*punch/recorte*) da amostra para a extração e para a quantificação (isto é, não se tratam de réplicas), pelo que é impossível garantir que essas tenham exatamente a mesma concentração de DNA.

Nas amostras não extraídas (Figura 36) observa-se que as amostras de sangue são as que apresentam valores mais altos de quantificação, bem como são as únicas que não apresentam níveis de degradação acima de 2 valores (valor máximo definido pelo *software*). A maioria das amostras de saliva extraídas apresentam níveis de degradação acima desse valor, contudo não existe uma grande disparidade entre a concentração de DNA obtida para essas amostras e as de sangue.

É importante fazer uma ressalva que, apesar de algumas amostras que foram diretamente quantificadas (tanto com recurso com o *kit Quantifiler® Trio* quanto com o *kit PowerQuant™*) demonstrarem níveis de degradação acima dos valores espectáveis, presume-se que não se trate duma degradação “real” da amostra, visto que estas estiveram sempre em condições controladas e resguardadas de fatores externos como luz e humidade. Assim sendo, reforça-se a ideia que estes valores se devem, por vezes, a fatores de inibição que levaram a uma fraca amplificação do alvo de degradação, visto este ser suscetível a inibidores devido ao seu elevado peso molecular (294 pb). Contudo, verifica-se que as falhas de amplificação devido à presença de inibidores são menos frequentes no *kit PowerQuant™*, pelo que se supõe que este seja menos sensível aos inibidores, sendo que, ao contrário de algumas amostras quantificadas com o *kit Quantifiler® Trio*, não existe uma grande discrepância entre os valores máximos aceitáveis (no qual se considera que uma amostra não se encontra degradada) e os níveis de degradação obtidos. Esta conclusão é corroborada através da análise do alvo IPC, o qual com um produto de amplificação de 435 pb é o teoricamente mais afetado pela presença de

inibidores. Assim sendo, o estudo dos resultados obtidos para o alvo IPC concluiu que, existe uma ligeira variabilidade nos valores de IPC C_T , o que denota a presença de inibidores na corrida de quantificação.

4.6. Transferência do material biológico dos suportes porosos para as tiras de limpeza

Foi calculada a transferência de material genético dos tecidos para a respetiva tira de limpeza a partir da seguinte fórmula:

$$Transferência = \frac{\text{Quantificação tira de limpeza}}{\text{Quantificação tecido}} \times 100\%.$$

Os resultados obtidos encontram-se discriminados na Tabela 17. Estes cálculos foram realizados com base nas concentrações obtidas para as amostras extraídas com o *kit* de extração *PrepFiler*.

Tabela 17. Percentagem de DNA transferido dos diferentes tecidos para as respetivas tiras de limpeza.

Amostras	Transferência de DNA (%)
Sémen_Algodão	12,68
Sg.01_Algodão	0,10
Sg.01_Ganga	0,34
Sl.01_Algodão	129,64
Sl.01_Ganga	1,88
Sl.08_Algodão	173,74
Sl.08_Ganga	3,33
Sl.01_Algodão_2	4,98
Sl.01_Ganga_2	1,37
Sl.08_Algodão_2	18,82
Sl.08_Ganga_2	4,06

É possível observar na Tabela 17 que as primeiras repetições das amostras de saliva em algodão (SI.01 e SI.08) contêm mais DNA nas tiras de limpeza do que nas porções de tecidos extraídos, o que se traduziu numa percentagem de transferência superior a 100%. Uma explicação plausível deve-se ao facto de este tipo de amostra biológica ser incolor, pelo que não se consegue detetar à vista desarmada o local onde se encontra mais impregnada. Nesse sentido, a porção de tecido recortada e colocada na coluna do *kit* de extração *PrepFiler* provavelmente correspondeu a uma zona menos impregnada.

De uma forma geral, as percentagens de transferência foram baixas, especialmente nas amostras de sangue, isto ter-se-á possivelmente devido ao volume de solução de limpeza utilizado, o qual diluiu a quantidade de DNA inicial.

4.7. Amostras de mistura M:F

Em todas as proporções M:F realizadas, pretendeu-se que a concentração da amostra feminina fosse de 0.5 ng/μL, enquanto a concentração masculina fosse diminuindo progressivamente. Deste modo procurou-se verificar se a metodologia de quantificação direta conseguia discriminar os dois contribuintes em diferentes proporções, simulando o que acontece na maioria das perícias sexuais, nas quais o contribuinte masculino é minoritário e se encontra em concentrações muito reduzidas. Os resultados de quantificação para as amostras de mistura M:F encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados de quantificação esperados *versus* obtidos com a metodologia de quantificação direta nas diferentes proporções M:F.

Proporção M:F	Concentrações esperadas		Concentrações obtidas			Proporção M:F obtida
	DNA masculino (ng/ μL)	DNA feminino (ng/ μL)	DNA total (ng/ <i>punch</i>)	DNA masculino (ng/ <i>punch</i>)	DNA feminino (ng/ <i>punch</i>)	
1:1	0,25	0,25	0,0212	0,0026	0,0186	1:0.07
1:5	0,083	0,417	0,0375	0,0007	0,0368	1:0.50
1:10	0,045	0,455	0,0420	0,0005	0,0415	1:0.80
1:20	0,023	0,455	0,0271	0,0005	0,0266	1:0.53
1:50	0,0098	0,4902	0,0318	0,0001	0,0317	1:2.22
1:100	0,0049	0,4951	0,0385	---	0,0385	0:1

As concentrações obtidas de DNA total e DNA masculino advêm dos resultados de quantificação do alvo LA e do alvo no cromossoma Y, respetivamente. Já a concentração de DNA feminino resulta da subtração da concentração de DNA masculino à concentração de DNA total.

Através da análise dos resultados obtidos, constata-se que as concentrações de DNA total esperado é de 0.5 ng/μL, enquanto o DNA total obtido se aproximou do valor de 0,033 ng/*punch*. Quanto ao DNA masculino, evidencia-se uma diminuição da concentração gradual nas proporções, sendo não detetável na mistura de 1.100. Relativamente às proporções M:F obtidas, observa-se que estas são inferiores às proporções esperadas em todas as misturas.

4.8. Perfis genéticos obtidos com o *kit* de amplificação *GlobalFiler*[®]

A etapa de quantificação permite orientar se uma dada amostra pode ou não seguir para amplificação por PCR e, em caso afirmativo, qual o *input* de DNA que deve ser utilizado. Assim, torna-se relevante avaliar a influência da análise dos resultados de quantificação obtidos com os *kits Quantifiler*[®] *Trio* e *PowerQuant*[™] na determinação dos perfis genéticos de amostras que apresentem quantidade e/ou qualidade muito variável de DNA.

Na Tabela 19 constam os resultados de quantificação e amplificação obtidos segundo as variáveis descritas na presente tabela.

Tabela 19. Condições de quantificação e amplificação das amostras singulares.

Amostra (Referência)	Tipo	DNA total	ID	Kit	IPC	Input DNA (ng)	Tempo de injeção (s)	Perfil genético
Sémen_Algodão (A1)	EP	24,655 ng/μL	1,401	PQ	20,68	1,233	10	Completo
Sémen_Algodão (A2)	EP	3,125 ng/μL	1,358	PQ	20,69	1,041	10	Completo
Sémen_Algodão (A3)	QD	0,445 ng/punch	1,560	PQ	21,52	0,890	10	Completo
Sémen02 (A4)	QD	0,331 ng/punch	3,568	PQ	20,58	0,662	10	Completo
Sémen02 (A5)	QD	0,354 ng/punch	3,042	QT	28,31	0,354	10	Completo
Sg.02 (A6)	EC	1,087 ng/μL	1,102	PQ	21,35	1,087	10	Completo
Sg.02 (A7)	QD	2,095 ng/punch	0,966	PQ	21,33	2,095	10	Completo
Sg.04 (A8)	EC	1,031 ng/ μL	0,488	QT	29,10	1,031	10	Completo
Sg.04 (A9)	QD	0,860 ng/punch	6,882	QT	29,42	0,860	10	Completo
Sg.05 (A10)	EC	0,703 ng/ μL	0,477	QT	28,27	0,703	10	Completo
Sg.05 (A11)	QD	1,105 ng/punch	4,438	QT	29,26	1,105	10	Completo
Sg.01_Lâmina_2 (A12)	EP	0,312 ng/μL	1,343	PQ	20,83	0,936	10	Completo
Sg.01_Lâmina_2 (A13)	QD	0,603 ng/punch	1,248	PQ	22,12	0,603	10	Completo
SI.04 (A14)	EC	0,323 ng/μL	0,578	QT	28,43	0,969	10	Completo
SI.04 (A15)	QD	0,362 ng/punch	1,187	QT	28,54	0,362	10	Completo
SI.07 (A16)	EC	1,252 ng/μL	1,788	PQ	20,84	1,252	10	Completo
SI.07 (A17)	QD	0,758 ng/punch	2,281	PQ	20,85	0,758	10	Completo
SI.01_Ganga (A18)	EP	2,460 ng/ μL	1,934	PQ	20,85	1,230	10	Completo

Continuação da Tabela 19

Amostra (Referência)	Tipo	DNA total	ID	Kit	IPC	Input DNA (ng)	Tempo de injeção (s)	Perfil genético
Sl.01_Ganga_2 (A19)	EP	0,034 ng/ μ L	1,759	PQ	20,68	0,340	10	Completo
Sl.01_Ganga ¹ (A20)	QD	0,007 ng/punch	2,880	PQ	21,03	0,021	10	21/24
Sl.01_Ganga ² (A21)	QD	0,007 ng/punch	2,880	PQ	21,03	0,028	10	9/24
Sl.01_Ganga ² (A22)	QD	0,007 ng/punch	2,880	PQ	21,03	0,028	40	22/24
Sl.01_Lâmina_2 (A23)	EP	0,572 ng/ μ L	1,773	PQ	21,02	1,144	10	Completo
Sl.01_Lâmina_2 (A24)	QD	0,071 ng/punch	3,135	PQ	21,14	0,142	10	Completo
Sl.08_Algodão (A25)	QD	0,042 ng/punch	3,673	PQ	21,36	0,126	10	17/24
Sl.08_Algodão (A26)	QD	0,042 ng/punch	3,673	PQ	21,36	0,126	40	21/24

QT = Quantifiler® Trio; PQ= PowerQuant™; EC= Extração Chelex; EP= Extração PrepFiler; QD= Quantificação Direta; ID= Índice de degradação. As diferentes condições das amostras foram destacadas com diferentes cores: Amostra extraída - Tecido (lilás), Tira de limpeza extraída (laranja), Tira de limpeza diretamente quantificada (azul), Amostra de referência diretamente quantificada (amarelo), Amostra de referência extraída (verde).

Ao analisar a Tabela 19, observa-se que, das 26 amostras amplificadas, somente 5 não apresentam um perfil genético completo. É possível visualizar nas Figuras 37 e 38 que a maioria dos marcadores incompletos possuem mais de 300 pb (assinalado nas figuras com uma linha vermelha vertical), sendo por isso mais suscetíveis a falhas de amplificação por falta de material genético. As falhas de atribuição alélica ocorrem quando os alelos não foram amplificados ou quando estes não ultrapassam o limite analítico de detecção [55]. Verifica-se também que o aumento do tempo de injeção das amostras com perfis genéticos incompletos possibilitou a recuperação de mais alelos (Figura 37, Figura 38 e Tabela 19).

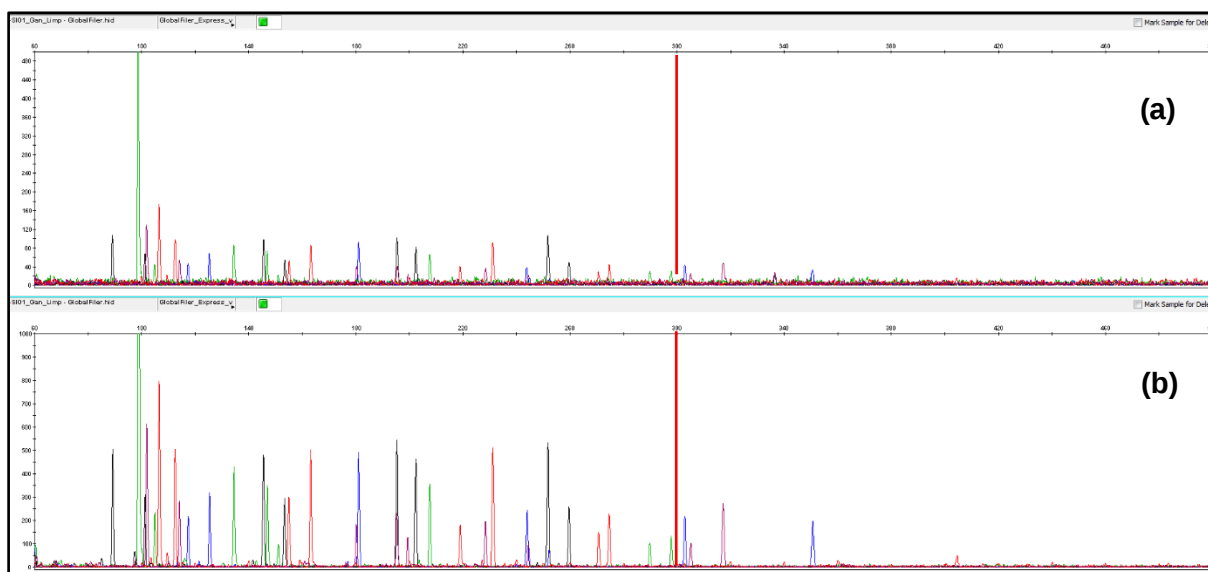


Figura 37. Perfil genético da amostra SI.08_Algodão diretamente quantificada **(a)** injetada durante 10 segundos (A25); **(b)** reinjetada durante 40 segundos (A26).

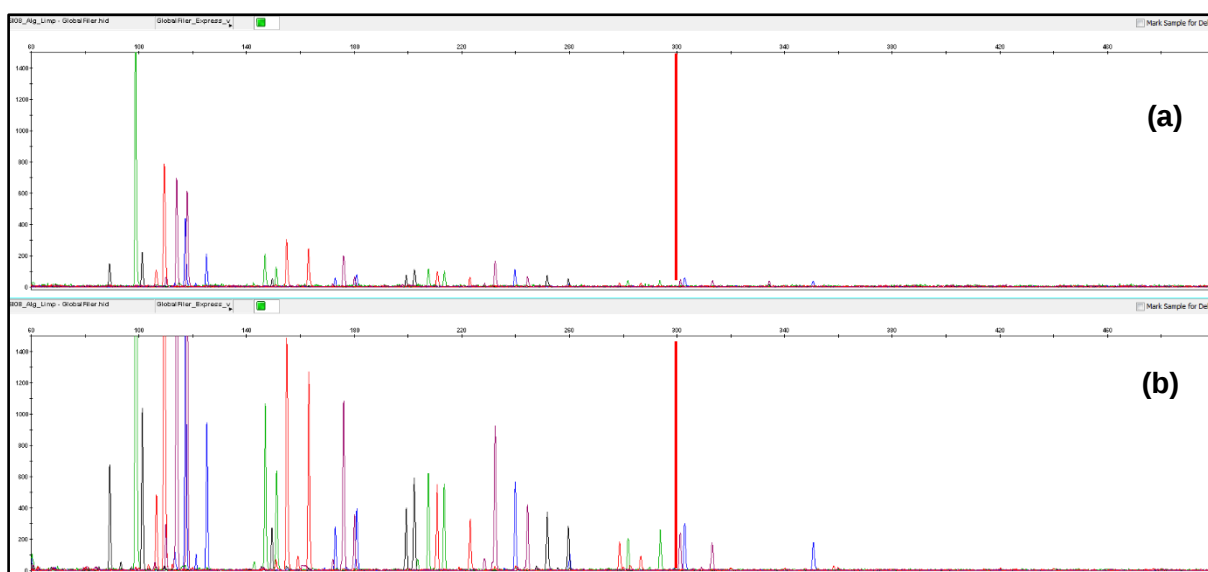


Figura 38. Perfil genético da amostra SI.01_Ganga diretamente quantificada **(a)** injetada durante 10 segundos (A21); **(b)** reinjetada durante 40 segundos (A22).

A não amplificação dos marcadores supramencionados não se deve a uma degradação efetiva das amostras, mas sim provavelmente devido à baixa quantidade de DNA, o que originou a perda de um dos alelos (*allele drop-out*) ou mesmo a não amplificação dos mesmos (*locus drop-out*). Esta teoria é concordante visto que se tratam das amostras que apresentam uma concentração de DNA muito inferior às restantes e ao limite estabelecido pela literatura. Está descrito na literatura que abaixo de uma

concentração de 0,1 ng de DNA começa-se a observar falhas de amplificação com o *kit GlobalFiler®*, pelo que os resultados obtidos são concordantes com o descrito [56].

Apesar da elevada sensibilidade da técnica de qPCR, alguns estudos demonstram que é possível obter perfis genéticos mesmo quando o resultado de quantificação é nulo/indeterminado [57]. Este fenómeno deve-se à variação estocástica em amostras com baixas concentrações de DNA. Nestas situações, embora a amostra contenha DNA, este não é quantificado, quando, durante a PCR, os *primers* não conseguem encontrar sequências de interesse suficientes para amplificar. Deve-se ter também em atenção que os tampões de PCR utilizados nos ensaios de qPCR e de amplificação de STRs podem ser diferentes. O tampão utilizado na reação de amplificação pode conter uma polimerase ou outro reagente capaz de ultrapassar a inibição, o que não acontece durante a quantificação.

O perfil genético da amostra de referência Sg.02 diretamente quantificada apresenta artefactos da PCR, o que indicia a presença de excesso de DNA (2,095 ng/punch) adicionado à reação de amplificação. Estes resultados são concordantes com os obtidos na quantificação, mostrando que os valores de quantificação direta são reais e vêm reforçar a ideia de que a inibição presente no *kit Quantifiler® Trio* está correlacionada com a concentração de DNA.

Nas quantificações realizadas às amostras de sémen, verificou-se uma enorme disparidade entre as concentrações obtidas para as amostras extraídas *versus* diretamente quantificadas. Isto deve-se, provavelmente, à ausência de uma etapa de extração que promova a lise da cabeça dos espermatozoides, pelo que se considera que as amostras submetidas à metodologia de quantificação direta só tiveram a fração epitelial quantificada. Contudo, a análise dos produtos amplificados revela que todas as amostras de sémen apresentam perfis genéticos com uma excelente qualidade, o que leva a supor que o tampão utilizado na amplificação promove a lise dos espermatozoides, o que não acontece com tanta eficácia na quantificação (Figura 39).

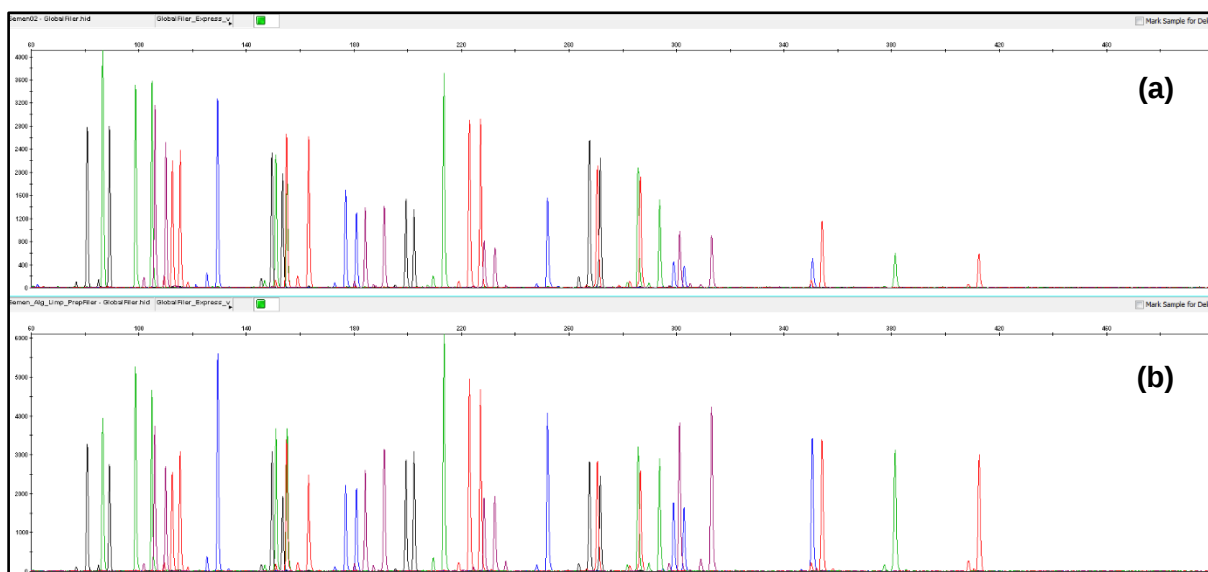


Figura 39. Perfil genético das amostras de Sémen: **(a)** diretamente quantificada (A5); **(b)** tira de limpeza extraída (A2).

Ficou assim demonstrado que os resultados de quantificação direta DNA são transponíveis para a posterior amplificação direta, permitindo colocar o número de *punchs*, isto é, o *input* ideal de DNA na reação de amplificação, resultando na obtenção de eletroferogramas com uma boa qualidade.

Na Tabela 20 constam todas as amostras amplificadas bem como os resultados obtidos para cada um dos marcadores presentes no *kit GlobalFiler®*.

Tabela 20. Resultados da amplificação de todas as amostras singulares segundo os marcadores presentes no kit GlobalFiler®.

																			AMOSTRAS													MARCADORES																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

Continuação da Tabela 20

	AMOSTRAS						
A26	A25	A24	A23	A22	A21	A20	
							Amelogenina
							D3S1358
							VWA
							D16S539
							CSF1PO
							TPOX
							Yindel*
							D8S1179
							D21S11
							D18S51
							DYS391*
							D2S441
							D19S433
							TH01
							FGA
							D22S1045
							D5S818
							D13S317
							D7S820
							SE33
							D10S1248
							D1S1656
							D12S391
							D2S1338

Nota: Marcador genético completo (verde); Allele dropout (amarelo); Locus dropout (vermelho). Os marcadores Yindel e DYS391 encontram-se em branco nas amostras femininas pois tratam-se de marcadores do Cromossoma Y, que complementam a informação da amelogenina só apresentando alelos no sexo masculino.

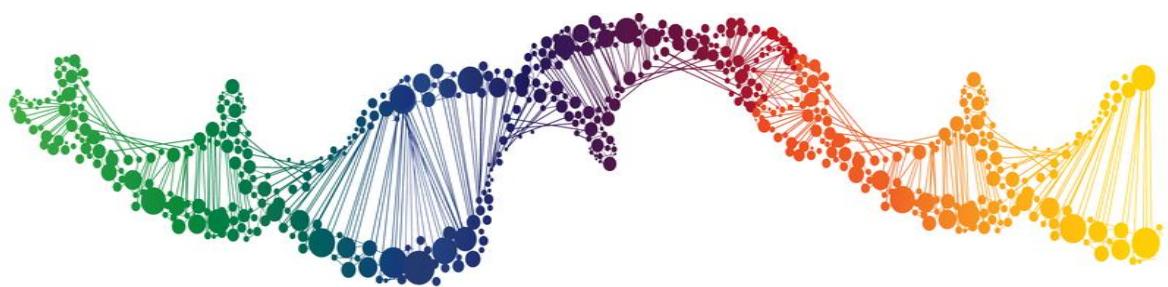
As condições de quantificação e amplificação das amostras de mistura M:F encontram-se apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21. Condições de quantificação e amplificação das amostras de mistura M:F.

Amostra	Tipo	DNA total	ID	Kit	IPC	Input DNA (ng)	Tempo de injeção (s)	Perfil genético
Mistura 1:1	QD	0,021 ng/μL	0,557	QT	27,81	0,063	10	Completo
Mistura 1:10	QD	0,042 ng/μL	0,372	QT	27,95	0,126	10	Completo

Os resultados obtidos para o contribuinte minoritário masculino ficaram aquém do esperado, pelo que as amostras deveriam ter sido amplificadas com base na quantificação obtida para o DNA masculino ao invés do DNA total, de modo a otimizar os resultados da fração masculina e recuperar mais alelos dessa fração.

No conjunto dos diferentes marcadores a amostra de mistura apresenta 16 alelos iguais aos da fração masculina, o que não é muito conclusivo pois os perfis genéticos singulares feminino e masculino possuem muitos alelos em comum (16 em 46 possíveis).



Conclusão

5. Conclusão

Uma das principais metas na rotina laboratorial forense passa por conseguir obter um perfil genético a partir de qualquer amostra biológica. Nesse sentido, é importante saber os resultados da quantificação da amostra em questão de modo a colocar o *input* ideal de DNA na reação de amplificação.

De acordo com os ensaios realizados constatou-se que, tanto para o *kit Quantifiler® Trio* quanto para o *kit PowerQuant™*, existe uniformidade entre as concentrações obtidas e as teoricamente esperadas para os *standards* e controlos positivos.

Este estudo indicou que, mesmo em diferentes dias e corridas, existe consistência nas concentrações obtidas, o que demonstra a grande precisão e reprodutibilidade do *kit PowerQuant™*.

Verificou-se que o *kit Quantifiler® Trio* apresenta, para os alvos SA e Y, alterações nos níveis de fluorescência da linha basal com a adição de um *punch* de 0,5 mm no poço da reação. Esse efeito não foi observado no *kit PowerQuant™* em nenhum dos fluorocromos utilizados no estudo.

A utilização do intervalo de linha basal do ciclo 11 ao 18, bem como as curvas de calibração para amostras com *punch*, permitiu minimizar a subestimação verificada nos resultados de quantificação, especialmente na concentração de 50 ng/μL. A alteração dos intervalos da linha basal foi unicamente realizada nos ensaios realizados com o *kit Quantifiler® Trio*.

As amostras de referência de sangue diretamente quantificadas com recurso ao *kit Quantifiler® Trio* são pontualmente suscetíveis a efeitos de inibição. Este efeito é menos acentuado nas amostras de saliva e de sêmen, não se verificando nas amostras de referência diretamente quantificadas com o *kit PowerQuant™*. Constatou-se que a maioria das amostras que apresentam inibição demonstram também níveis de degradação mais elevados. Não obstante, esses resultados não interferiram na etapa de amplificação, pelo que foi possível obter perfis genéticos completos em amostras que indicavam degradação e/ou inibição.

Comparando as mesmas amostras de referência, em relação às duas metodologias de quantificação de DNA utilizadas neste estudo (quantificação direta *versus* quantificação “padronizada”), verificou-se que, em ambos os *kits*, as amostras de sangue e saliva apresentam concentrações equiparáveis (apesar de estarem discriminadas em

unidades de concentrações diferentes). Em relação às amostras de sémen, existe uma grande discrepância de resultados, sendo que as amostras extraídas exibem concentrações de DNA muito superiores, provavelmente devido à presença de uma etapa de extração, porém isso não afetou a qualidade dos perfis obtidos das amostras diretamente quantificadas.

Entre os suportes utilizados para a realização das tiras de limpeza e posterior quantificação direta de DNA das mesmas, a lâmina de vidro foi aquela que exibiu tiras de limpeza com concentrações superiores de DNA. Em relação aos suportes absorventes, os resultados das amostras extraídas não são concordantes com os das amostras diretamente quantificadas. A ganga é o suporte que exhibe mais material genético na maioria das amostras de sangue e saliva diretamente quantificadas. Enquanto, para as amostras de sangue e saliva extraídas, é o algodão que apresenta, por norma, concentrações superiores de DNA.

Nas amostras de mistura amplificadas com o *kit GlobalFiler®*, verificou-se a ausência do perfil genético masculino.

Foi possível obter um perfil genético completo em 23 das 28 amostras amplificadas.

Em suma, a quantificação “padronizada”, isto é, com uma etapa prévia de extração, permite purificar o DNA, eliminando inibidores presentes na amostra, sendo por esse motivo o método correntemente utilizado nos laboratórios de Genética Forense. Contudo, este método requer um procedimento mais complexo, com mais etapas associadas, o que resulta em processos e perícias mais longas. Deste modo, considera-se vantajosa a integração na rotina laboratorial forense desta metodologia, como um recurso de pré-seleção de amostras. A opção do uso prévio da quantificação direta de DNA prende-se com as vantagens desta, designadamente, por ser um método simples, mais rápido do que a metodologia padronizada e menos dispendioso. Acresce ainda o facto de os resultados da quantificação direta serem transponíveis para a metodologia de amplificação direta.

Como desvantagens, encontra-se o facto de não ter sido possível detetar o contribuinte masculino em baixas concentrações de DNA, o que faz com que este método não possa ser facilmente aplicado na rotina laboratorial, embora mais estudos sejam necessários para que conclusões efetivas possam ser retiradas.

Como perspetivas futuras seria de grande interesse prosseguir os estudos com as amostras problema, testando diferentes volumes de soluções de limpeza de forma a rentabilizar o processo de transferência do material biológico dos diferentes suportes para as tiras de limpeza. Uma alternativa capaz de contornar a perda de material durante a

transferência seria a realização da metodologia de quantificação direta a partir dos suportes porosos, isto é, retirar um *punch* da amostra e colocar diretamente no poço da reação. Seria também relevante aumentar o número de amostras de mistura M:F visto ser uma componente essencial e bastante requisitada num laboratório forense.

6. Referências Bibliográficas

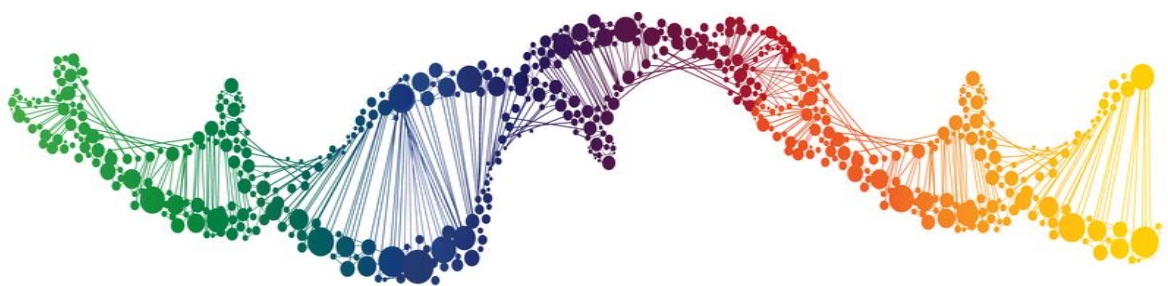
1. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 51, 263-273.
2. Corte-Real, F., & Vieira, D. N. (2015). Princípios de genética forense. Imprensa da Universidade de Coimbra.
3. Butler, J. M. (2009). Fundamentals of Forensic DNA Typing. Academic Press.
4. Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). An introduction to forensic genetics. John Wiley & Sons.
5. Butler, J. M. (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Academic Press.
6. Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature, 316, 76-79.
7. Weber-Lehmann, J., Schilling, E., Gradl, G., Richter, D. C., Wiehler, J., & Rolf, B. (2014). Finding the needle in the haystack: differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. Forensic Science International: Genetics, 9, 42-46.
8. Wang, Z., Zhu, R., Zhang, S., Bian, Y., Lu, D., & Li, C. (2015). Differentiating between monozygotic twins through next-generation mitochondrial genome sequencing. Analytical biochemistry, 490, 1-6.
9. Gill, P., Fereday, L., Morling, N., & Schneider, P. M. (2006). The evolution of DNA databases—recommendations for new European STR loci. Forensic Science International, 156(2), 242-244.
10. Pinheiro, M. F. (2008). CSI Criminal. Edições Universidade Fernando Pessoa.
11. Pinheiro, M.F.T. (2010). Genética forense: perspectivas da identificação genética. Edições Universidade Fernando Pessoa.
12. Lincoln, P. J., & Thomson, J. (1998). Forensic DNA profiling protocols (Volume 98). Springer Science & Business Media.
13. Castella, V., Dima-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., & Mangin, P. (2006). Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. Forensic science international, 156(1), 70-73.
14. Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). prepfiler 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10(4), 506-513.

15. Willard, J. M., Lee, D. A., & Holland, M. M. (1998). Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods in Molecular Biology*, 98, 9–18.
16. Lahiri, D. K., Bye, S., Nurnberger, J. I., Hodes, M. E., & Crisp, M. (1992). A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 25(4), 193-205.
17. Brevnov, M. G., Pawar, H. S., Mundt, J., Calandro, L. M., Furtado, M. R., & Shewale, J. G. (2009). Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *Journal of forensic sciences*, 54(3), 599-607.
18. Burgoyne, L. A. (1996). Solid medium and method for DNA storage. U.S. Patent 5, 496, 562.
19. Butler, J. M., Shen, Y., & McCord, B. R. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 48(5), 1054-1064.
20. ENFSI DNA Working Group. (2010). Recommended minimum criteria for the validation of various aspects of the DNA profiling process.
21. Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., Primorac, D., García, O., de Simón, L. F., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., & Fernández-Piqueras, J. (2003). Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croatian Medical Journal*, 44(3), 273-280.
22. Andréasson, H., Nilsson, M., Budowle, B., Lundberg, H., & Allen, M. (2006). Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International*, 164(1), 56-64.
23. Andreasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotechniques*, 33(2), 402-411.
24. Al-Soud, W. A., & Rådström, P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4463-4470.
25. Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences*, 55(1), 25-33.
26. Collins, P. J., Hennessy, L. K., Leibelt, C. S., Roby, R. K., Reeder, D. J., & Foxall, P. A. (2004). Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit. *Journal of Forensic Sciences*, 49(6), 1265-1277.

27. Mulero, J. J., Chang, C. W., Calandro, L. M., Green, R. L., Li, Y., Johnson, C. L., & Hennessy, L. K. (2006). Development and Validation of the AmpFSTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit: A Male Specific, Single Amplification 17 Y-STR Multiplex System. *Journal of Forensic Sciences*, 51(1), 64-75.
28. Gill, P., Whitaker, J., Flaxman, C., Brown, N., & Buckleton, J. (2000). An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International*, 112(1), 17-40.
29. Alonso, A., Martí, P., Albarrán, C., Garcí, P., Garcí, O., de Simón, L. F., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., de la Rúa, C., & Fernández-Piqueras, J. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International*, 139(2), 141-149.
30. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.
31. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Stahlberg, A., Zoric, N., & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2), 95-125.
32. Walker, N. J. (2001). Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(3), 121-127.
33. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'- $\rightarrow$ 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
34. Walker, N. J. (2002). A technique whose time has come. *Science*, 296(5567), 557-559.
35. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
36. Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik*, 437(1-2), 55-75.
37. Lakowicz, J. R. (1983). *Energy Transfer. Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer US, 303-339.
38. Nicklas, J. A., & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(8), 1160-1167.
39. Wittwer, C. (2001). *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. Rapid Cycle Real-Time PCR*. Springer Berlin Heidelberg, 1-8.

40. Liu, J. Y. (2014). Direct qPCR quantification of unprocessed forensic casework samples. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 96-104.
41. Liu, J. Y. (2014). Direct qPCR quantification using the Quantifiler® Trio DNA quantification kit. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 10-19.
42. Liu, J. Y. (2015). Direct Quantitative PCR Absent Minor Groove Binders. U.S. Patent No. 20,150,376,721. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
43. Adamowicz, M. S., Stasulli, D. M., Sobestanovich, E. M., & Bille, T. W. (2014). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PloS one*, 9(12), e116351.
44. Applied Biosystems (2012). Manual do kit PrepFiler® and PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kits. Acedido em 20, Janeiro, 2015, em https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_096102.pdf
45. Applied Biosystems (2015). Manual do kit Quantifiler® Trio DNA Quantification. Acedido em 8, Outubro, 2015 em <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4485354.pdf>.
46. Gouveia, N., Brito, P., Serra, A., Balsa, F., Andrade, L., São Bento, M., Cunha, P., Bogas, V., Lopes, V., & Porto, M. J. (2015). Validation of Quantifiler® Trio DNA Quantification kit in forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e24-e25.
47. Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., & Montagna, P. (2015). Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: a matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 77-85.
48. Vieira-Silva, C., Afonso-Costa, H., Ribeiro, T., Porto, M. J., Dias, M., & Amorim, A. (2015). Quantifiler® Trio DNA validation and usefulness in casework samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e246-e247.
49. Promega (2015). Manual do kit PowerQuant™ System. Acedido em 11, Fevereiro, 2016 em <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/powerquant%20system%20technical%20manual.pdf>
50. Applied Biosystems (2010). Manual do 7500 Real-Time PCR System. Acedido em 8, Outubro, 2015, em https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050329.pdf.
51. Applied Biosystems (2015). Manual do software de análise dos resultados HID Real-Time PCR Analysis Software Version 1.2. Acedido em 19, Outubro, 2015 em

- https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0009819_HID_PCRAAnalysisSoftware_UG.pdf
52. Applied Biosystems (2015). Manual do kit GlobalFiler® PCR Amplification. Acedido em 25, Fevereiro, 2016, em <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4477604.pdf>.
 53. Liu, J. Y. (2015). PE-Swab Direct STR Amplification of Forensic Touch DNA Samples. *Journal of forensic sciences*, 60(3), 693-701.
 54. Applied Biosystems (2012). Manual do software GeneMapper® ID-X Software Version 1.4. Acedido em 25, Junho, 2016 em <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4477684b.pdf>.
 55. Butler, J. M. (2014). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Academic Press.
 56. Hennessy, L. K., Mehendale, N., Chear, K., Jovanovich, S., Williams, S., Park, C., & Gangano, S. (2014). Developmental validation of the GlobalFiler® express kit, a 24-marker STR assay, on the RapidHIT® System. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 247-258.
 57. Cupples, C. M., Champagne, J. R., Lewis, K. E., & Cruz, T. D. (2009). STR profiles from DNA samples with “undetected” or low Quantifiler™ results. *Journal of forensic sciences*, 54(1), 103-107.



Anexos



CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE
INVESTIGAÇÃO:

“Estudo comparativo entre uma metodologia de quantificação direta
de DNA e a metodologia padronizada na rotina laboratorial forense”

Investigador Principal: Vanessa Dinis

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concordar por favor assine este documento.

Este projeto de investigação enquadra-se no âmbito da realização da tese de Mestrado em Medicina Legal no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro (SGBF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses I.P. (INMLCF) e pretende testar a viabilidade da implementação no SGBF-C de uma metodologia de quantificação direta de DNA por *real-time* PCR, a partir de amostras biológicas, em comparação à metodologia comumente utilizada no fluxo de trabalho no âmbito da criminalística biológica, a qual requer, previamente à quantificação, uma extração/purificação de DNA. Caso se verifique a exequibilidade deste projeto, isso permitirá a implementação desta metodologia na rotina laboratorial do SGBF-C, pelo que se irá traduzir na obtenção de perfis genéticos de uma forma mais rápida, com menos custos associados e ainda possibilitará que os peritos consigam previamente saber quais as amostras com uma quantidade ótima de DNA.

Nesse sentido, pede-se ao voluntário a doação de uma gota de **sangue**, obtida através de uma punção num dedo com recurso a uma lanceta, bem como de **saliva** recolhida por zaragatoa bucal. Assegura-se que as amostras obtidas serão imediatamente anonimizadas de forma irreversível, de forma proteger a identidade do voluntário. Para além do desconforto relativo a uma pequena punção num dedo e à colheita de zaragatoa bucal não são previstos outros riscos ou efeitos indesejáveis.

Todos os dados obtidos serão usados apenas para fins de investigação. Este estudo pretende determinar a quantidade de DNA presente nas amostras, pelo que se garante também que durante a investigação não será estudado o perfil genético de zonas codificantes do genoma.

A participação é voluntária, não existindo despesas ou compensações financeiras relacionadas com a mesma.

Assinatura da investigadora: _____
~~~~~

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina e que considero suficientes. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura abandonar ou recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar neste estudo nas condições acima descritas.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Data: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

**ESTE DOCUMENTO, COMPOSTO DE 1 PÁGINA, É FEITO EM DUPLICADO:  
UMA VIA PARA A INVESTIGADORA, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE**

## ANEXO II – PARECER COMISSÃO DE ÉTICA DO ICBAS-UP



### Parecer da Comissão de Ética do ICBAS-UP

#### PROJETO Nº 133/2015

**Título:** Estudo comparativo entre uma metodologia de quantificação direta de DNA e a metodologia padronizada na rotina laboratorial forense

**Investigador Responsável:** Vanessa Alexandra Alves Dinis

**Outros Investigadores:** Ana Margarida Ventura Teixeira Bento, Especialista Superior de Medicina Legal no INMLCF - Orientadora

**Duração do Projeto:** 09-Nov-2015 a 30-Jun-2016

A Comissão de Ética do ICBAS-UP reuniu dia 19 de janeiro de 2016 no edifício do ICBAS - Sala de reuniões do Departamento de Ciências do Comportamento, na presença de Liliana de Sousa, Manuel Vilanova, Margarida Araújo, Paulo Maia e Paula Faria. Decidiu emitir **parecer favorável** à realização do projeto supracitado, por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

Pela Comissão de Ética do ICBAS-UP,

Prof. Doutora Liliana de Sousa (presidente)

---

*To whom it may concern,*

*The above project is in accordance with the Portuguese law and the ICBAS-UP Ethics Committee criteria.*

---