



Elisabete Sofia Videira Pires *Real-Time PCR, High Resolution Melting –*
Aplicações Forenses



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2012

Elisabete Sofia Videira Pires ***Real-Time PCR, High Resolution Melting –
Aplicações Forenses***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Souto de Miranda, Professor auxiliar convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira

Professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves

Equiparado a Investigador Auxiliar, Universidade de Aveiro

Doutor Luís Manuel Souto de Miranda (orientador)

Professor Auxiliar Convidado, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao professor Luís Souto pela orientação deste trabalho, pelo auxílio na sua realização, pelas críticas construtivas e disponibilidade sempre demonstrada, e por me ter dado sempre a oportunidade de continuar com este trabalho.

À colega Filipa Tavares pela orientação e auxílio na elaboração deste trabalho, dedicação, disponibilidade e palavras de incentivo demonstradas nos momentos mais difíceis.

Quero agradecer aos meus pais, a quem dedico este trabalho, com todo o orgulho, por terem acreditado sempre em mim, pela luta que travam diariamente para me verem brilhar e pela compreensão nos momentos mais dolorosos, o apoio deles foi imprescindível.

Ao meu namorado Luís Doutel pela força, amor, carinho e companheirismo diário. Com ele foi-me facilitado este longo e duro caminho para a terminação da minha tese de mestrado.

À minha colega e amiga Líliana Oliveira pelo apoio nas horas de maior desespero e também pelas horas mais alegres e motivantes, pela amizade e companheirismo durante todo o nosso percurso académico.

A todas as minhas amigas em especial à Ana Dias e à Sara Fernandes pela amizade, carinho e palavras encorajadoras.

palavras-chave

Real-time PCR; Aplicações Forenses; Polimorfismos genéticos; Quantificação; High Resolution Melting

resumo

Apontada como a maior revolução científica na área forense desde a descoberta das impressões digitais, a identificação humana por meio da análise do DNA tornou-se uma poderosa ferramenta de investigação, auxiliando na elucidação de casos forenses, baseando-se cientificamente na existência de polimorfismos genéticos ao longo do genoma em indivíduos diferentes, que faz com que cada pessoa possua um código genético único. Com a introdução da real-time PCR nas investigações forenses, tornou-se possível uma análise sensível e específica de regiões polimórficas tanto no genoma nuclear como no mitocondrial, a partir de quantidades ínfimas de DNA obtidas de amostras altamente degradadas ou com baixo número de cópias. A quantificação do DNA é um procedimento importante na análise forense e deve ser efetuado, previamente, a qualquer análise de DNA. A união entre a bioinformática e a genética forense propiciou a criação de métodos de análise específicos, como a HRM, muito útil na genotipagem de SNPs, de extrema importância na investigação forense. Foi elaborada uma revisão bibliográfica com o objetivo de conhecer as aplicações forenses da real-time PCR e os respectivos métodos, tendo se confirmado então a aplicabilidade deste método na área forense.

keywords

Real-time PCR; Forensic Applications; Genetic polymorphisms; Quantification; High Resolution Melting

abstract

Listed as the greatest revolution in forensic science since the discovery of fingerprints, identification by analyzing human DNA has become a powerful research tool, helping to elucidate forensic cases, scientifically based on the existence of genetic polymorphisms throughout the genome at different individuals, which causes that each person has a unique genetic code. With the introduction of real-time PCR in forensic investigations, it became possible a sensitive and specific analysis of polymorphic regions both in the mitochondrial and nuclear genome, from minute quantities of DNA obtained from samples highly degraded or low copy number. The quantification of DNA is an important procedure in forensic analysis and must be made in advance to any DNA analysis. The union between forensic genetics and bioinformatics led to the creation of specific analysis methods, such as HRM, very useful in scanning and genotyping of SNPs, of utmost importance in forensic investigation. A literature review has been prepared in order to meet the forensic applications of real-time PCR and related methods, and so been confirmed the applicability of this method in the forensic field.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Características do Genoma Nuclear e Mitocondrial	10
Figura 1 - Representação gráfica de uma amplificação por Real-Time PCR. Curva de amplificação demonstrando as fases exponencial e <i>plateau</i>	20
Figura 2 - A: Representação gráfica de uma amplificação por Real-Time PCR (serie de diluição); B: Gráfico número de ciclos <i>versus</i> log concentração da Real-Time PCR.	21
Figura 3 - Molécula corante fluorescente SYBR Green I.....	23
Figura 4 – A: Curva de <i>Melting</i> . Temperatura de <i>melting</i> relativas a produtos específicos e não-específicos de amplificação por real-time PCR. B: Bandas no gel de eletroforese relativas a produtos específicos e não-específicos de amplificação por real-time PCR.	24
Figura 5 - Modo de funcionamento da sonda TaqMan.....	26
Figura 6 - Modo de funcionamento da sonda Molecular Beacons.....	28
Figura 7 – Série de diluição (Ensaio qPCR otimizado).....	31
Figura 8 - Curva linear padrão resultante de curvas de amplificação uniformemente espaçadas.	32
Figura 9 - Análise High-resolution DNA Melting	34
Figura 10 - Genotipagem de SNPs por HRM.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SNP – Polimorfismo de nucleotideo único

VNTR – Polimorfismo de numero variável de repetições em tandem

STR – Polimorfismo curto de repetição em tandem

mtDNA – DNA mitocondrial

nDNA – DNA nuclear

mRNA – RNA mensageiro

bp – Pares de bases

kb – Kilo pares de bases

CODIS – Combined DNA Index System (base de dados do DNA)

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RAPD – Amplificação aleatória de DNA polimórfico

AFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado

AMELX – Gene amelogenina do cromossoma X

AMELY – Gene amelogenina do cromossoma Y

dNTPs – Desoxirribonucleotideos

dsDNA – DNA de cadeia dupla

ssDNA – DNA de cadeia simples

qPCR – PCR quantitativa/ Real-time PCR

HRM – High Resolution Melting

HVI – Região hipervariavel 1

HVII – Região hipervariavel 2

HVIII – Região hipervariavel 3

IPC – Controlo positivo interno

dmtDNA – Deleção do 4977 pb do mtDNA

ÍNDICE

CAPITULO 1 Introdução	7
Ácidos Nucleicos – DNA e RNA	8
Cromossomas, Genes e Alelos	9
Genoma Nuclear e Mitocondrial	9
Mutações, polimorfismos ou variações genéticas?.....	10
Marcadores Moleculares.....	11
Cromossomas X e Y e DNA Mitocondrial	15
PCR	17
Real-Time PCR.....	19
Quantificação.....	29
HRM.....	33
CAPITULO 2 Aplicações Forenses da Real-Time PCR	37
2.1 Quantificação de DNA:.....	37
2.2 Determinação do Sexo e Identificação Humana:	43
2.3 Distinção de DNA Humano e Presença de Inibidores da PCR:.....	47
2.4 Estudo de Haplogrupos e Origem Geográfica de Amostras:.....	51
2.5 Determinação da Idade:	53
2.6 Estudo do mRNA:.....	55
2.7 Análise HRM:	57
CAPITULO 3 Conclusões e Considerações Finais	61
CAPITULO 4 Referências Bibliográficas	69
ANEXOS	I
Anexo 1.....	III
Anexo 2.....	IX

CAPITULO 1 Introdução

A Biologia Molecular e Celular tem como campo de estudo as interações bioquímicas celulares envolvidas na duplicação do material genético e na síntese proteica, e é uma área intimamente ligada à genética e à bioquímica. A Biologia Molecular consiste principalmente em estudar as interações entre os vários sistemas da célula, partindo da relação entre o DNA (ácido desoxirribonucleico), o RNA (ácido ribonucleico) e a síntese de proteínas, e o modo como essas interações são reguladas. A ciência forense adotou de tal modo as ferramentas da biologia molecular que, há mais de 20 anos, os métodos de análise de DNA foram utilizados em todo o mundo para resolver questões de identidade em crimes violentos, crimes menores, atos de terrorismo, casos de pessoas desaparecidas, e desastres em massa. Estes métodos utilizados, incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) com base em sistemas para analisar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), polimorfismos de número variável de repetição em tandem (VNTRs), polimorfismos pequenos de repetição em tandem (STRs) e DNA mitocondrial (mtDNA) (Budowle *et al*, 2003).

O estudo que se segue teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica de publicações e artigos científicos, que avaliam a grande utilidade da real-time PCR, e seus métodos de análise acoplados, em aplicações forenses.

Ácidos Nucleicos – DNA e RNA

Os ácidos nucleicos são macromoléculas de suma importância biológica. Todos os organismos vivos contêm ácidos nucleicos na forma de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Os ácidos nucleicos são compostos por:

- Molécula de açúcar - pentose (Desoxirribose - DNA ou Ribose - RNA)
- Bases nitrogenadas que são elas purinas: Adenina (A) e Timina (T); e pirimidinas: Guanina (G), Citosina (C) e Uracilo (U).
- Ácido fosfórico/fosfato.

Existem duas diferenças principais entre o DNA e o RNA, o DNA possui uma molécula de desoxirribose e o RNA, uma de ribose, o DNA contém timina e o RNA contém uracilo. O DNA é uma molécula formada por duas cadeias complementares antiparalelas (com sentidos opostos, designando-se uma por 3'-5' e a outra por 5'-3'), ligadas entre si por pontes de hidrogénio e em forma de uma dupla hélice, modelo proposto por Watson e Crick em 1953, contrariamente ao DNA, as moléculas de RNA são compostas por uma única cadeia (Regateiro, 2007).

O DNA é o armazenador da informação genética, esta informação é copiada ou transcrita para moléculas de RNA, cujas sequências de nucleotídeos contêm o “código” para a ordenação específica de aminoácidos. As proteínas são então sintetizadas num processo que envolve a tradução do RNA mensageiro (mRNA). Em células superiores, o DNA localiza-se principalmente no núcleo, dentro dos cromossomas. Uma pequena quantidade de DNA fica no citoplasma, contida nas mitocôndrias e cloroplastos. O RNA é encontrado tanto no núcleo, onde é sintetizado, como no citoplasma, onde tem lugar a síntese proteica (Regateiro, 2007).

Devido ao facto do DNA conter a informação que é fundamental para codificar todas as proteínas e RNAs necessários para se construir um organismo, é através da replicação que os seres vivos conseguem dar origem a um novo ser que

possui as mesmas características de quem o originou. A replicação é um processo pelo qual uma molécula de DNA de dupla cadeia é duplicada. Como cada cadeia da dupla hélice de DNA contem a mesma informação genética, qualquer uma delas pode servir como molde à formação de uma nova cadeia de DNA (Hanawalt, 2004; Symeonidou *et al*, 2012).

Cromossomas, Genes e Alelos

O DNA não está livre dentro da célula, mas forma complexos com proteínas numa estrutura denominada cromatina. No momento da divisão celular, a cromatina condensa-se na forma de cromossomas. Estes surgem normalmente em pares, têm diferentes tamanhos e formas, e o seu número é constante em cada espécie de ser vivo. As células humanas têm 46 cromossomas, divididos em 23 pares, com exceção das reprodutivas, que têm apenas 23 cromossomas. Os membros de um par têm o nome de cromossomas homólogos (Nussbaum, 2008).

O gene é uma unidade hereditária que consiste numa sequência particular de bases no DNA e que especifica a produção de uma determinada proteína. Os genes estão presentes em pares denominados alelos, sendo que cada alelo é localizado num dos cromossomas homólogos. Estes estão localizados num determinado *locus* (local no cromossoma, plural = *loci*) específico, que ocupa a mesma posição em cada cromossoma (Nussbaum, 2008).

Genoma Nuclear e Mitocondrial

O genoma é o conteúdo de todo o DNA presente numa célula, incluindo todos os genes e regiões intergénicas. A informação genética está codificada em dois tipos de genoma, nuclear e mitocondrial, cada um deles armazenado em dois compartimentos celulares, o núcleo e a mitocôndria, respetivamente, podemos-nos referir então, a DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (mtDNA). O DNA nuclear possui aproximadamente 3 mil milhões de pares de bases (bp) e encontra-se

organizado, em determinadas fases da célula, em cromossomas. Por sua vez, o mtDNA é constituído por uma pequena molécula circular. Comparativamente ao nDNA, este genoma é muito distinto e particular relativamente às suas características (Tabela 1) (Regateiro, 2007).

Tabela 1 - Características do Genoma Nuclear e Mitocondrial

Características	DNA Nuclear	DNA Mitocondrial
Localização	Núcleo	Mitocôndria
Conformação	Dupla hélice	Dupla cadeia circular
Tamanho	~ 3,2 Mil milhões de pb	16569 pb
Cópias por célula	2	Pode ser > 1000
Estrutura	Linear ou cromossomas	Circular
Hereditariedade	Paterna e Materna	Materna
Taxa de mutação	Baixa	5 a 10 x > ADN nuclear
Recombinação	Sim	Não
Singularidade	Único para cada indivíduo (exceto gémeos verdadeiros)	Não é único para cada indivíduo (corresponde a uma linhagem materna)

Mutações, polimorfismos ou variações genéticas?

Um conceito importante da biologia é o de mutação, que é uma mudança no conteúdo de DNA. Os tipos de mudanças podem ser de substituição de base, inserção de base, e rearranjo ou troca na ordem de segmentos de base (Kumar, 2011). As mutações estão na origem das muitas formas de diversidade no genoma sem consequências clínicas ou fenotípicas, dando origem aos polimorfismos (Komar, 2009). Estes dizem respeito à ocorrência na população de pelo menos dois alelos, de um gene ou sequência de DNA, com frequência do alelo mais raro $\geq 1\%$ na população geral (Koch & Andrade, 2008).

Este tipo de diversidade genética é comumente utilizado para:

- Estudos populacionais (estudo da diversidade do genoma humano)
- Estudos forenses (identificação individual e testes de paternidade)
- Marcadores genéticos (mapeamento genético).

❖ Tipos de Polimorfismos

Os polimorfismos podem ser agrupados em 2 tipos: Polimorfismos de comprimento e polimorfismos de sequência.

- Polimorfismos de comprimento incluem as regiões STR (*short tandem repeats*) e VNTR (*variable number tandem repeat*), e são caracterizados por sequências de nucleotídeos que se repetem em múltiplas cópias, variando o número de repetições entre os indivíduos para cada *locus*.
- Polimorfismos de sequência são compostos de diferentes nucleotídeos numa determinada localização do genoma. Estas variações em sequência podem ser manifestadas como regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases. Em geral originam-se de mutações pontuais (Kumar, 2011).

Marcadores Moleculares

A análise de DNA tem como objetivo diferenciar um indivíduo de outro, através de um grande número de características, dando-lhe uma identidade absoluta como pessoa, podendo assim ser diferenciado dentre bilhões de outros. A variabilidade humana é enorme, dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente em 1 de cada 500 pares de bases do DNA. (Pena, 2009).

Na espécie humana existem cerca de 35 mil genes que codificam RNA, estes genes representam aproximadamente 10% do genoma, todo o restante trata-se de sequências repetitivas que têm uma função estrutural. É a variabilidade deste restante que é estudada e utilizada nos exames forenses de DNA (Carracedo, 2005).

No perfil de DNA somente algumas regiões do DNA são analisadas, as regiões escolhidas são aquelas que apresentam maior variação individual e facilidade de estudo, estas são denominadas de marcadores genéticos ou moleculares. Os marcadores moleculares são utilizados para caracterizar o DNA de um indivíduo num padrão ou perfil de fragmentos que lhes é particular. Neste caso são utilizados marcadores polimórficos, ou seja, regiões que apresentam mais de um alelo por *locus*.

Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, é agora possível analisar qualquer região dentro dos cerca de 3 mil milhões de pares de bases que compõem o genoma. Os *loci* de DNA utilizados em genética forense devem ter algumas propriedades chave, eles deveriam idealmente:

- Ser altamente polimórficos (variando muito entre os indivíduos);
- Ser fáceis e baratos para a caracterização;
- Dar perfis que são simples de interpretar e fácil de comparar entre laboratórios;
- Não estar sob qualquer pressão seletiva;
- Ter uma baixa taxa de mutação (Goodwin *et al*, 2007).

Para a análise de polimorfismos genéticos recorre-se ao estudo das regiões repetitivas de DNA. Um *locus* de minissatélites (VNTR) e microsatélites (STR) pode ter muitos alelos em função do número de vezes em que essa estrutura é repetida ao longo do DNA, em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única e deixando a população polimórfica em relação ao *locus* (Koch & Andrade, 2008). Minissatélites ou VNTRs estão localizadas predominantemente nas regiões subteloméricas dos cromossomas e têm uma sequência de repetição no núcleo, que varia em tamanho de 6 bp a 100 bp. Minissatélites foram os primeiros polimorfismos usados em perfis de DNA e que foram utilizados com sucesso no tratamento de casos forenses durante vários anos (Goodwin *et al*, 2011).

Os *loci* de microsatélites ou STRs são parecidos com minissatélites, mas com estrutura repetida menor, mais frequentes e polimórficos. Os STRs têm uma unidade de repetição entre 1 bp e 6 bp. A maior parte dos *loci* que são usados em

genética forense são repetições tetranucleotídicas, que têm uma unidade de repetição de 4 bp. STRs satisfazem todos os requisitos de um marcador forense:

- São robustos, conduzindo a análise bem sucedida de uma ampla gama de material biológico;
- Os resultados gerados em laboratórios diferentes são facilmente comparados;
- São altamente discriminatórios, especialmente na análise simultânea de um grande número de *loci* (multiplexing);
- São muito sensíveis, requerendo apenas algumas células para uma análise bem sucedida;
- São relativamente baratos e fáceis de gerar perfis de STR (Goodwin *et al*, 2011).

Além disso, estes *loci* são muito abundantes no genoma humano e cada um deles possui um grande número de diferentes alelos, inclusive maior do que o encontrado em VNTRs, o que os torna ainda mais úteis na identificação humana (Koch & Andrade, 2008).

A chave da diversidade destas regiões é então o número de repetições de uma dada sequência de bases. Tais diferenças podem ser estudadas com sondas de DNA ou com a PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Mais recentemente, os abundantes SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) e os polimorfismos de inserção/deleção (INDELS) têm emergido como possíveis alternativas na investigação forense. Os SNPs são marcadores do tipo polimorfismo de base única e baseiam-se nas alterações mais elementares da molécula de DNA, isto é, mutações em apenas uma das bases nitrogenadas de cadeia (A, C, T e G). As mutações mais recorrentes são as do tipo transição, em que há troca de uma purina por outra purina (A \leftrightarrow G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C \leftrightarrow T). As transversões são menos frequentes e acontecem quando há troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa (C \leftrightarrow G, C \leftrightarrow A, T \leftrightarrow A e T \leftrightarrow G) (Goodwin *et al*, 2011).

Há um crescente interesse na genotipagem de SNPs no campo forense, não só na utilidade de SNPs para a definição do cromossoma Y ou haplogrupos de mtDNA ou para analisar a origem geográfica de amostras, mas também para aplicações potenciais de SNPs autossômicos. O interesse da pesquisa forense em SNPs autossômicos foi atraído devido às vantagens potenciais em testes de paternidade por causa da baixa taxa de mutação e, especialmente, na análise de amostras degradadas pelo uso de amplicões curtos (Sobrinho *et al*, 2005).

Amostras forenses que contêm pouca quantidade de DNA ou estão muito degradadas, exigem análises de marcadores genéticos alternativas ou abordagens para o que é usado atualmente em casos de rotina. SNPs garantem apoiar as análises forenses de DNA pela abundância de potenciais marcadores, recetividade à automatização e potencial redução no tamanho de fragmentos necessário para apenas 60-80 pb (Budowle & Daal, 2008).

Os marcadores SNPs vão desempenhar um papel importante na análise de amostras forenses difíceis, tais como aquelas que estão muito degradadas, para aumentar o poder da análise de parentesco e reconstruções familiares de pessoas desaparecidas e restos humanos não identificados, bem como para proporcionar a investigação em alguns casos sem um suspeito (sem nenhuma correspondência de perfil genético no CODIS - Combined DNA Index System). Os SNPs para análises forenses podem ser divididos em quatro categorias:

- SNPs para testes de identidade;
- SNPs de linhagem informativa;
- SNPs de ancestralidade informativa;
- SNPs de fenótipo informativo.

SNPs são a base molecular de vários tipos de marcadores moleculares que foram desenvolvidos com diferentes metodologias ao longo das últimas três décadas como RFLPs, RAPDs e AFLPs. A genotipagem de SNPs pode ser feita por real-time PCR (Budowle & Daal, 2008).

Cromossomas X e Y e DNA Mitocondrial

O gene da amelogenina é de cópia única e localiza-se nos cromossomas sexuais X e Y, sendo extensivamente utilizado na rotina forense para determinação do sexo genético em amostras de origem desconhecida através da amplificação pela PCR. No cromossoma X, o gene AMELX origina um produto de amplificação de 106 pb e no cromossoma Y, o gene AMELY dá lugar a um amplicão de 112 pb. O gene AMELX contém uma deleção de 6 pb no intrão 1. Portanto, quando os amplicões são analisados após corrida electroforética, amostras de origem masculina (XY) mostram duas bandas, uma para o fragmento de 106 pb e outra para o de 112 pb, enquanto que as amostras femininas (XX) demonstram somente uma banda de 106 pb. Desta forma, a análise do *locus* da amelogenina determina o sexo genético da amostra estudada (Wurmb-Schwark *et al*, 2006).

Análises de polimorfismos presentes no cromossoma Y e mtDNA são frequentemente realizadas. Os microssatélites do cromossoma Y são importantes na análise forense do DNA. Devido à falta de um cromossoma homólogo, não existe recombinação na meiose e só são identificados alelos de origem masculina, herdados em bloco dos antepassados masculinos. Testes de DNA com o cromossoma Y são importantes para uma série de diferentes aplicações em genética humana, incluindo análise de evidências forenses, testes de paternidade, investigações históricas e estudo dos padrões de migração humana ao longo da história e pesquisa genealógica pela herança haplotípica (Buttler, 2011).

A análise de microssatélites existentes no cromossoma Y tem sido utilizada para elucidar casos de violação onde se tem mistura de material biológico, e a extração diferencial do DNA não é possível, e de testes de paternidade. STRs de cromossoma Y também têm sido utilizados para o teste de paternidade em que o suposto pai não está disponível para os testes, nestes casos, qualquer parente masculino que esteja relacionado paternalmente com o suposto pai pode ser usado como uma referência. Casos envolvendo identificação humana também

têm usado o cromossoma Y como uma ferramenta de ligação que permanece para os familiares paternos (Goodwin *et al*, 2011).

A herança em bloco de alelos diferentes do mesmo cromossoma é denominada de herança haplotípica, e o conjunto dos alelos chamam-se haplótipos, que por sua vez são, uma combinação de alelos que não se encontram em equilíbrio de ligação, quer dizer, que existem combinações de alelos em “excesso” e há uma “falta” de combinações de outros alelos. Um haplótipo é uma combinação de alelos em *loci* adjacentes, que fazem parte do mesmo cromossoma e são transmitidos juntos, sendo que, pode ser formado por um ou vários alelos, ou até pelo cromossoma inteiro. Ao conjunto de haplótipos designa-se de haplogrupo. Os haplogrupos mais comumente estudados são os haplogrupos do cromossoma Y e os haplogrupos de mtDNA (Lewis, 2011).

O mtDNA é cientificamente aceite como uma ferramenta muito útil para a genética forense, no entanto o estudo do mtDNA deve limitar-se aos casos em que não foi possível a obtenção de resultados pela análise de nDNA ou naqueles em que se pretende informação adicional, uma vez que o nDNA possui um poder de discriminação muito superior, para além da menor complexidade de metodologia empregue (Coble *et al*, 2004).

Em vestígios, em que a quantidade de DNA é muito ínfima ou em que a quantidade de DNA esteja muito degradada, o mtDNA pode ser usado como uma fonte alternativa. Os restos cadavéricos antigos ou provenientes de grandes catástrofes, encontrando-se altamente degradados, cabelos sem raízes, ossos, dentes, impressões digitais, urina e fezes são alguns dos materiais biológicos em que o estudo de mtDNA pode ser vantajoso (Holland & Parsons, 1999; Gun, 2009).

Outra aplicação sustenta-se na sua hereditariedade uniparental, em situações de identificação forense nas quais existem apenas amostras de parentes de linhagem materna para comparação, como por exemplo, na identificação de desaparecidos e restos cadavéricos, identificação criminal e no estudo de relações de parentesco pela linhagem materna, permitindo a reconstrução de

linhas evolutivas através do tempo, enaltecendo o ancestral materno de uma população, sem que haja interferência dos efeitos da hereditariedade biparental e da inerente recombinação existente no nDNA (Butler, 2005; Gunn, 2009).

Entretanto, uma condição chamada de heteroplasmia pode existir, quando uma pessoa apresenta mais de um tipo de mtDNA, desta maneira, a análise de fios de cabelo, por exemplo, pode demonstrar resultados diferentes ou ambíguos. Em investigação forense, a heteroplasmia pode, por vezes, complicar a interpretação dos resultados de mtDNA (Gunn, 2009). Atualmente é feita também investigação de SNPs em todo o genoma mitocondrial, o que aumenta o poder de análise (Coble *et al*, 2004).

O mtDNA é então um marcador genético de grande interesse na área forense, pois uma única célula possui mais de 5000 cópias de mtDNA com estruturas circulares, associadas à resistência do mtDNA à digestão enzimática (Gunn, 2009).

Na maior parte, o foco em estudos forenses de mtDNA até o momento, envolveu duas regiões hipervariáveis na região controlo, comumente referidas como HVI (HV1) e HVII (HV2). Ocasionalmente, uma terceira porção da região de controlo, conhecido como HVIII (HV3), é examinada para fornecer mais informações sobre a amostra testada. São regiões polimórficas que estão localizadas dentro da região controlo do mtDNA ou D-Loop que mede 1100 pb e permitem a individualização (Gunn, 2009; Buttler, 2011).

PCR

A reação em cadeia da DNA polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR) revolucionou a genética molecular por permitir a rápida clonagem e a análise do DNA. A PCR é uma técnica de biologia molecular, com base no processo de replicação do DNA que ocorre *in vivo*, o que permite a amplificação *in vitro* de uma sequência nucleotídica específica de uma molécula de DNA molde (*template*) pela DNA polimerase. Para permitir tal amplificação seletiva, alguma

informação prévia, a respeito das sequências alvo, é necessária. Essa informação é utilizada para desenhar dois oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, os quais são específicos para a sequência alvo e apresentam cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão. A identificação desta sequência é efetuada então pelos *primers* específicos sintetizados artificialmente, cujas sequências são complementares das sequências que se pretendem amplificar (Koch & Andrade, 2008).

Na presença de uma DNA polimerase termoestável apropriada e dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP e dTTP), é iniciada a síntese de novas cadeias de DNA, que são complementares a cada uma das cadeias de DNA da sequência alvo, formando, desta maneira, um fragmento de DNA com sequência idêntica a do DNA a ser analisado, e previamente selecionado pelo par de *primers* (Koch & Andrade, 2008).

Durante a PCR são utilizadas temperaturas elevadas, com o objetivo de separar o DNA de cadeia dupla em duas cadeias simples (desnaturação), permitindo assim a ligação dos *primers* (*annealing*). Com a adição de bases nucleotídicas à reação, formam-se novas cadeias de DNA através da ação da enzima DNA polimerase (extensão) (Goodwin *et al*, 2011). Uma vez que este ciclo de duplicação molecular é repetido várias vezes, a PCR é uma reação em cadeia porque resulta num aumento exponencial do número de cópias da região delimitada pelos *primers*, uma vez que as cadeias de DNA, recentemente sintetizadas, irão atuar como moldes para mais uma síntese de DNA nos ciclos subsequentes. Após cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão incluir, além do DNA que iniciou a reação, cópias da sequência alvo específica, uma quantidade que é facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico quando submetida a eletroforese em gel de agarose (Koch & Andrade, 2008).

Na PCR convencional, o produto final amplificado, ou fragmento amplificado, é analisado por meio da técnica de eletroforese. Para realizar uma eletroforese é preparado um gel de agarose ou de poliacrilamida, o DNA é introduzido nas cavidades pequenas do gel e, em seguida, uma corrente elétrica é aplicada

através do gel. Os fragmentos de DNA amplificados podem ser separados de acordo com o seu tamanho, uma vez que a molécula de DNA é carregada negativamente, os fragmentos migram na matriz de agarose ou de poliacrilamida, em direção ao eletrodo positivo (cátodo) quando submetidos a um campo elétrico. No entanto, para alcançar o eletrodo positivo, o DNA tem de migrar através do gel. Os fragmentos de DNA menores podem migrar através do gel mais rapidamente que os fragmentos maiores de DNA. A velocidade de migração dos fragmentos de DNA lineares através da agarose é inversamente proporcional ao seu peso molecular. Assim, a separação dos fragmentos por eletroforese durante a execução depende do peso molecular dos fragmentos, da concentração do gel, da conformação do DNA, do tampão e do corante do gel (azul de metileno ou brometo de etídeo) (Westermeier, 2005).

Real-Time PCR

O objetivo primário na realização de um ensaio de quantificação de DNA é a de determinar a quantidade de DNA "amplificável". Uma reação de amplificação de PCR pode falhar devido à presença de inibidores coextraídos, DNA altamente degradado, quantidade de DNA insuficiente, ou uma combinação de todos estes fatores. Assim, um ensaio que pode refletir de forma precisa tanto a qualidade como a quantidade do *template* de DNA numa amostra é benéfico para a tomada de decisões sobre como proceder. A técnica de real-time PCR fornece essa avaliação. Instrumentos estão agora disponíveis e podem monitorizar o processo de PCR à medida que decorre a amplificação, permitindo a recolha "em tempo real" dos dados. Real-time PCR é por vezes referida como PCR quantitativa (qPCR) ou "análise cinética" porque analisa a mudança de ciclo-a-ciclo do sinal de fluorescência resultante da amplificação de uma sequência alvo, durante a PCR. Esta análise é realizada sem abrir o tubo da PCR e, portanto, pode ser referido como um ensaio de deteção em tubo fechado ou homogéneo (Buttler, 2011).

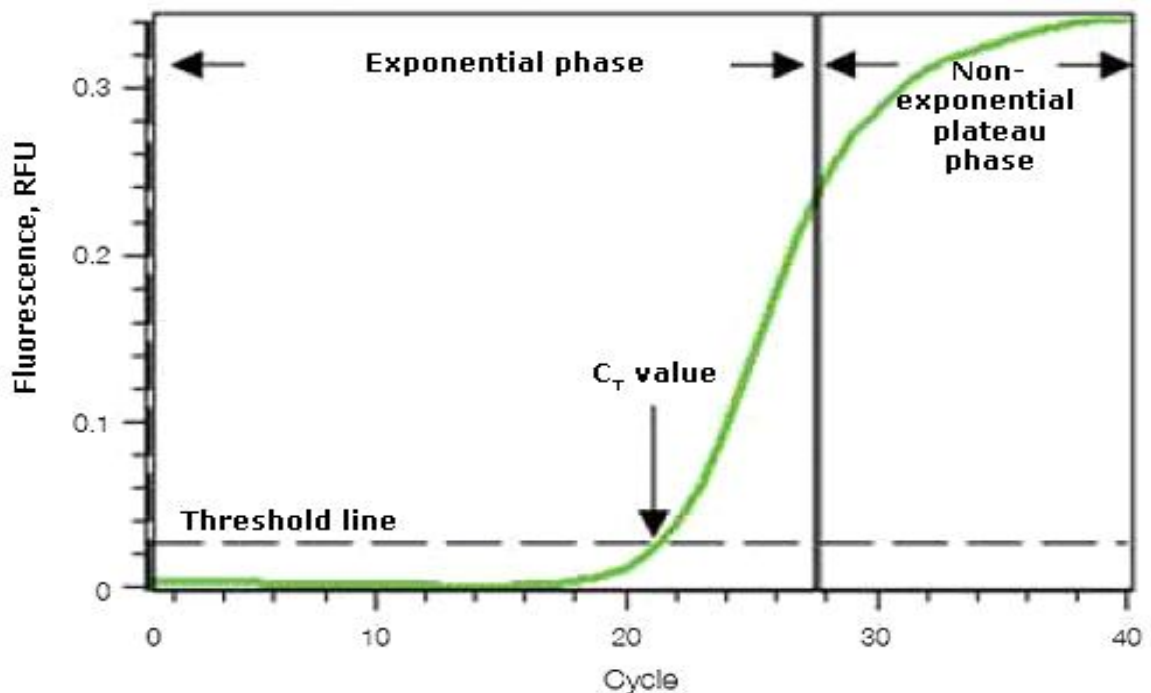


Figura 1 - Representação gráfica de uma amplificação por Real-Time PCR. Curva de amplificação demonstrando as fases exponencial e *plateau*.

(Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

Em contraste com a PCR convencional, a PCR em tempo real permite o acúmulo de produto amplificado para ser detetado e medido à medida que a reação progride, isto é, em "tempo real". A detecção em tempo real de produtos de PCR é possível através da inclusão na reação de uma molécula fluorescente que relata um aumento na quantidade de DNA com um aumento proporcional no sinal de fluorescência. As químicas fluorescentes empregadas para este propósito incluem corantes de ligação ao DNA e *primers* de sequências específicas fluorescentes ou sondas. Termocicladores especializados, equipados com módulos de detecção de fluorescência, são usados para monitorizar a fluorescência à medida que a amplificação ocorre. A fluorescência medida reflete a quantidade de produto amplificado em cada ciclo (VanGuilder *et al*, 2008).

O número do ciclo PCR é mostrado no eixo x, e a fluorescência da reação de amplificação, que é proporcional à quantidade de produto amplificado no tubo, é mostrado no eixo y. O gráfico da amplificação mostra duas fases, uma fase

exponencial seguido por uma fase não exponencial, a fase *plateau*. Durante a fase exponencial, a quantidade de produto de PCR duplica aproximadamente em cada ciclo. No entanto, assim como a reação se processa, os componentes da reação também são consumidos e, finalmente, um ou mais dos componentes torna-se limitado. Neste ponto, a reação desacelera e entra na fase de *plateau* (Figura 1). Uma representação gráfica do número de ciclo *versus* uma escala do logaritmo da concentração de DNA deve resultar numa relação linear durante a fase exponencial de amplificação por PCR (Figura 2) (Buttler, 2011).

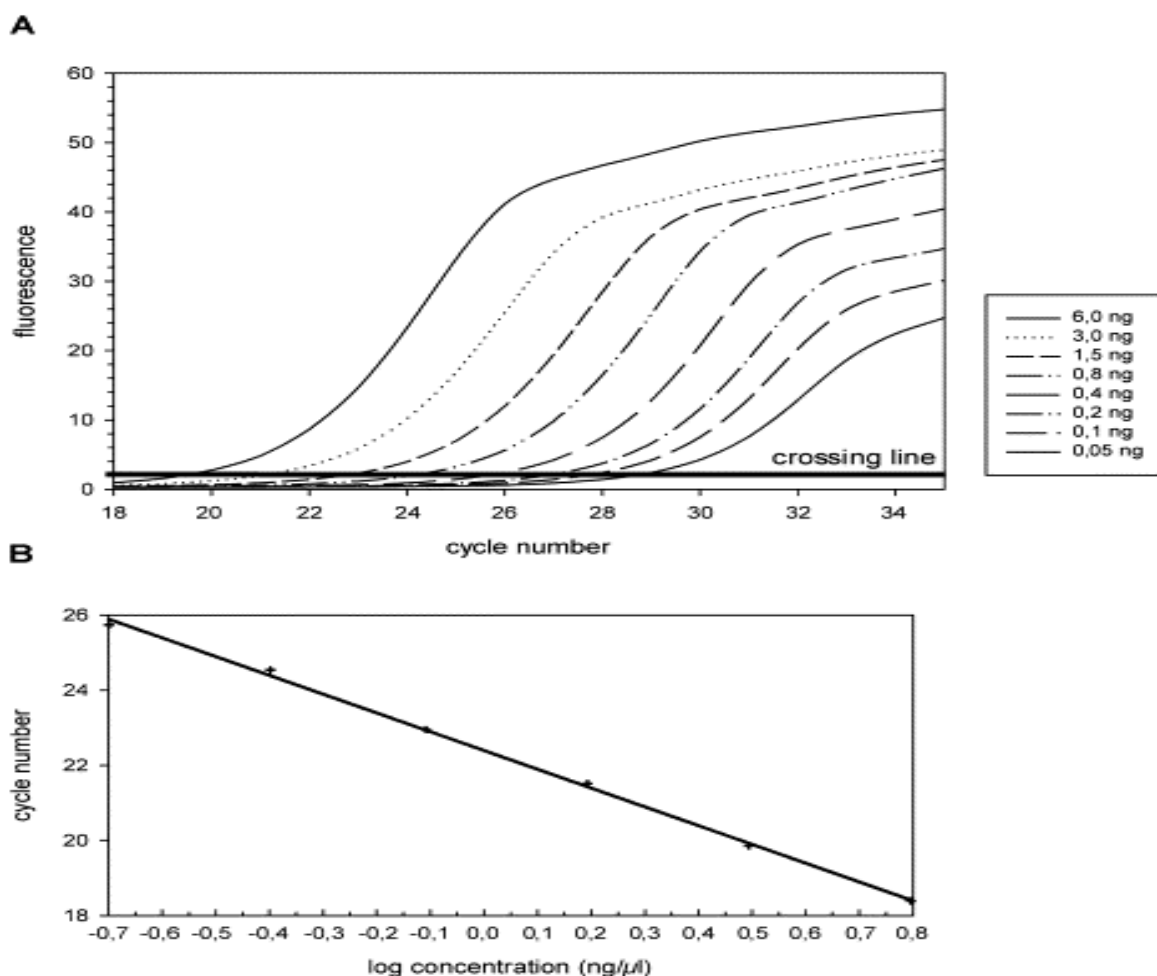


Figura 2 - A: Representação gráfica de uma amplificação por Real-Time PCR (serie de diluição); B: Gráfico número de ciclos *versus* log concentração da Real-Time PCR.

(Fonte: Schnerr *et al.*, 2001)

Inicialmente, a fluorescência permanece em níveis de fundo (background), e aumentos na fluorescência não são detetáveis, embora o produto acumule exponencialmente. Eventualmente, produto amplificado suficiente é acumulado para produzir um sinal fluorescente detetável. O número do ciclo em que isso ocorre é chamado de ciclo limite, ou CT. Como o valor CT é medido na fase exponencial quando os reagentes não estão limitados, PCR em tempo real pode ser utilizada com segurança e precisão para calcular a quantidade inicial de DNA *template* presente na reação. O CT de uma reação é determinado principalmente pela quantidade de *templates* presentes no início da reação de amplificação. Se uma grande quantidade de *templates* está presente no início da reação, relativamente poucos ciclos de amplificação serão necessários para acumular produtos suficientes para dar um sinal fluorescente acima do nível de fundo (background). Assim, a reação terá um baixo, ou precoce, CT. Em contraste, se uma pequena quantidade de *template* está presente no início da reação, mais ciclos de amplificação serão necessários para o sinal de fluorescência se elevar acima do background. Assim, a reação vai ter um elevado, ou tardio, CT. Esta relação é a base para o aspecto quantitativo da PCR em tempo real (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Um passo importante na concepção de um ensaio real-time PCR é a seleção da química para monitorizar a amplificação da sequência alvo. Existe uma variedade de produtos químicos fluorescentes disponíveis, que podem ser classificados em dois tipos principais:

1. Ligação de DNA (corantes *SYBR Green I*)
2. Sequência de oligonucleotídeos específicos ou sondas marcadas (*Molecular Beacons* e *TaqMan*, hibridização, sondas *Eclipse*, *Amplifluor*, *Scorpions*, *Lux* e *primers BD QZyme*).

As químicas mais utilizadas para PCR em tempo real são o corante *SYBR Green I* e sondas de hidrólise *TaqMan*. A química selecionada para o ensaio real-time PCR depende da sua aplicação, se se tratar de um *singleplex* ou *multiplex*, assim como considerações de custo (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Corantes de ligação a DNA

O corante de ligação ao DNA mais comumente usado para PCR em tempo real é *SYBR Green I*, que se liga de forma inespecífica à dupla hélice de DNA (dsDNA). SYBR GREEN I

SYBR Green I é um exemplo de corante intercalante do DNA, que apresenta pouca fluorescência quando está livre, em solução, mas a sua fluorescência aumenta até fortemente, quando este se liga ao dsDNA (Figura 3) e pode ser facilmente detetado. Portanto, o sinal fluorescente a partir de um total de reação é proporcional à quantidade de dsDNA presente, e aumenta à medida que o alvo é amplificado (VanGuilder *et al*, 2008).

A maior vantagem dos corantes de ligação dsDNA, em oposição ao uso de sondas fluorescentes é que ele pode ser usado com qualquer par de *primers* para qualquer alvo e que apenas dois *primers* são necessários. É uma alternativa mais barata e exige menos conhecimento especializado do que o desenho de sondas

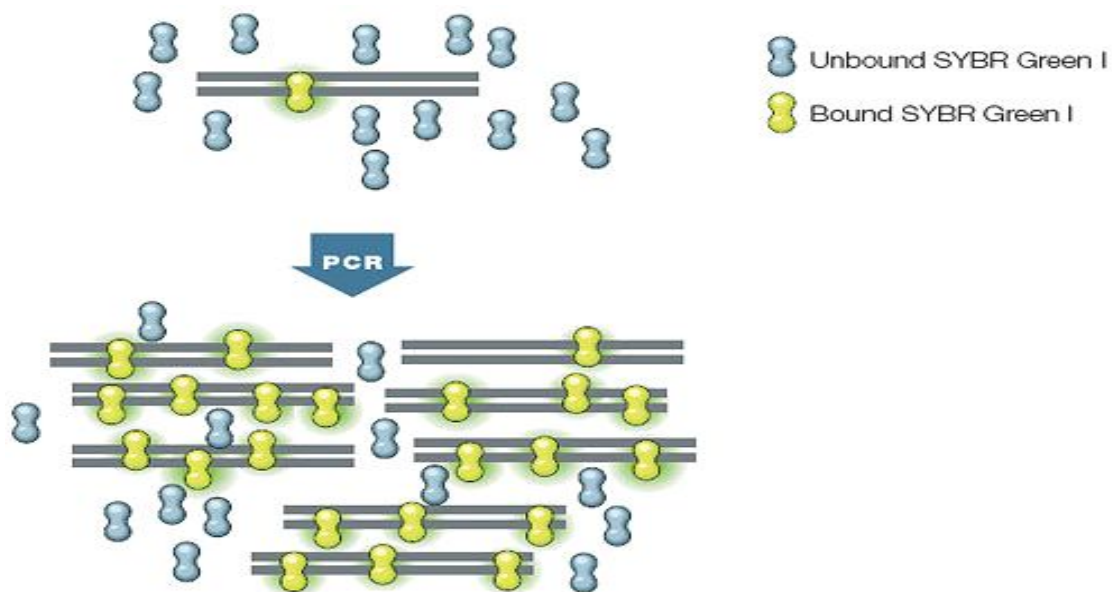


Figura 3 - Molécula corante fluorescente SYBR Green I.

(Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

fluorescentes. Por conseguinte, a especificidade é diminuída, devido ao risco de amplificar os produtos não específicos de PCR ou dímeros de *primers*, uma vez que se ligam indiscriminadamente a produtos de cadeia dupla. Depois de completada a reação de amplificação, é gerada uma curva de *melting*, para verificar a especificidade da reação de amplificação e discriminar entre produtos específicos e não específicos de PCR, durante o qual a emissão de fluorescência é monitorizada continuamente. Deste modo, a fração de fluorescência proveniente do alvo específico pode ser distinguida daquela proveniente de dímeros de *primers* ou de produtos de amplificação não específica (VanGuilder *et al*, 2008).

Cada molécula de DNA tem uma temperatura de *melting* (T_m), temperatura à qual 50% dos pares de bases de dsDNA são separados. A temperatura de *melting*

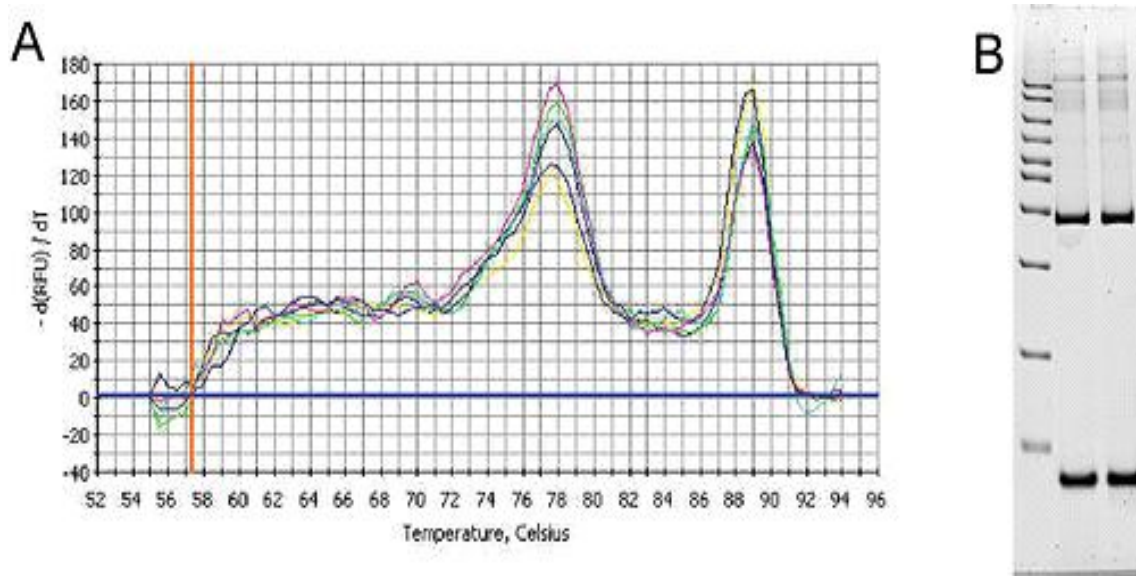


Figura 4 – A: Curva de *Melting*. Temperatura de *melting* relativas a produtos específicos e não-específicos de amplificação por real-time PCR. B: Bandas no gel de eletroforese relativas a produtos específicos e não-específicos de amplificação por real-time PCR.

(Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

depende do comprimento da molécula de DNA, ordem das sequências, complementaridade entre bases e quantidade de ligações G:C. Quando um corante intercalante do DNA é usado, à medida que o fragmento é aquecido, um súbito decréscimo na fluorescência é detetado (devido à dissociação das cadeias

do DNA e liberação do corante fluorescente intercalante). Este ponto é determinado pelo ponto de inflexão da curva de *melting* ou pico de *melting*. O pico característico na temperatura de *melting* do amplicão distingue-o de outros produtos, tais como dímeros de *primers*, que desnaturam a temperaturas diferentes. Um exemplo disto é mostrado na Figura 4, em que o pico de *melting* com uma T_m de 89°C representa o produto específico, e corresponde à banda superior nas pistas 2 e 3 no gel. O pico com uma T_m de 78°C representa o produto não específico, e corresponde à banda inferior nas pistas 2 e 3 no gel (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

O inconveniente principal dos corantes de ligação ao DNA é a sua falta de especificidade, isto é, corantes de ligação ao DNA ligam-se a qualquer dsDNA. Como resultado, a presença de produtos não específicos de uma reação de PCR em tempo real, podem contribuir para a fluorescência total e afetar a precisão da quantificação. Outra consequência é que os corantes de ligação ao DNA não podem ser utilizados para reações *multiplex* porque os sinais fluorescentes de amplicões diferentes não podem ser distinguidos (VanGuilder *et al*, 2008). No entanto, é possível configurar as reações paralelas para examinar genes múltiplos, tais como, um gene de interesse e um gene de referência, num ensaio de PCR em tempo real com *SYBR Green I* (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Sondas

Geralmente as mais usadas são as sondas *Taqman* e *Molecular Beacons*, estas tiram vantagem da transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), para garantir que a fluorescência específica é detetada apenas na presença do produto amplificado. O *primer* ou sonda de oligonucleótido é marcada com um fluoróforo *repórter*, mas na maioria dos casos, o oligonucleotideo é concebido de modo que a fluorescência é extinta quando o alvo específico está disponível. Geralmente isto é conseguido ligando uma molécula de *quencher* à sonda, e a elaboração de um mecanismo pelo qual o *repórter* e o *quencher* são separados quando a sonda se liga ao seu alvo

específico. Na real-time PCR, os *primers* e sondas fluorescentes oferecem duas vantagens principais sobre os corantes de ligação ao dsDNA, detetam especificamente a sequência alvo para que os produtos não específicos não afetem a exatidão da quantificação e permitem que as reações de multiplex sejam executadas (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

ENSAIOS TAQMAN

Ensaio *TaqMan* empregam uma sequência específica, uma sonda oligonucleotídica marcada com fluorescência chamada a sonda *TaqMan*, para além dos *primers* a Figura 5 ilustra o modo como trabalha a *TaqMan*. Também conhecido como o ensaio 5'-nuclease, o ensaio *TaqMan* aproveita a atividade exonuclease 5' de certas polimerases termoestáveis, como a *Taq*, mas qualquer enzima com atividade exonuclease 5' pode ser usada. A sonda contém um *repórter* fluorescente na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'.

Vários *repórter* fluorescentes estão em utilização, incluindo 6 - carboxifluoresceína (FAM), tetracloro - 6 - carboxifluoresceína (TET), hexacloro - 6 - carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) ou 4 - (dimetilaminoazo) benzeno - 4 - carboxílico (DABCYL). Quando a sonda está intacta, a proximidade do *repórter* e

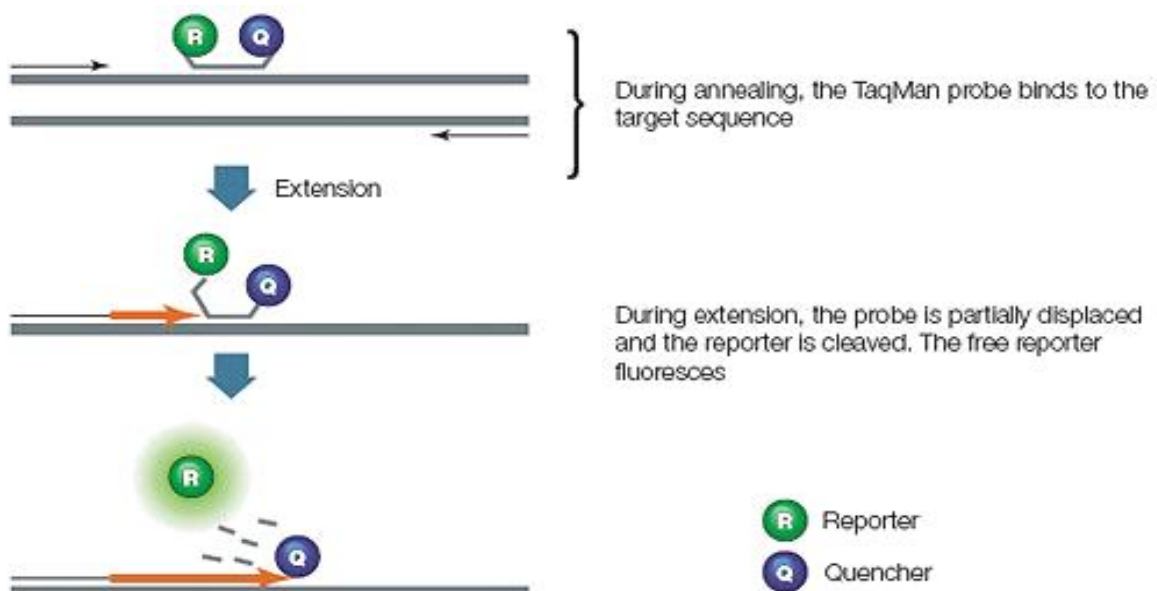


Figura 5 - Modo de funcionamento da sonda TaqMan.

(Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

do *quencher* permite FRET e a emissão de fluorescência não ocorre. Durante o passo de *annealing* e extensão da reação de amplificação, a sonda hibridiza com o alvo e a atividade exonuclease específica 5'→3' da *Taq* cliva o *repórter*. Como resultado, o *repórter* é separado do *quencher*, e o sinal resultante de fluorescência é proporcional à quantidade de produto amplificado na amostra. Seguindo o *annealing* dos *primers Forward* e *Reverse* à sequência alvo, a sonda *TaqMan* foi concebida para hibridizar entre estes locais dos *primers* e é hidrolizada pela atividade exonuclease 5'→3' da *Taq* polimerase. Se não existe produto presente, a sonda não se liga e conseqüentemente não é degradada, permanecendo a fluorescência do *repórter* extinta. A hidrólise da sonda resulta da supressão do *repórter* e subsequente aumento cumulativo na fluorescência proporcional à quantidade do produto presente, o que aumenta a especificidade da PCR na detecção do produto. A química *TaqMan* é a mais amplamente utilizada na PCR em tempo real, e tem sido usada para vários fins, como a detecção de SNPs e análise quantitativa (VanGuilder *et al*, 2008).

As principais vantagens da utilização de sondas *TaqMan* incluem alta especificidade e a capacidade de realizar as reações *multiplex*. As desvantagens são o custo da sonda, que pode ser elevado, e a concepção do ensaio pode não ser trivial (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

MOLECULAR BEACONS

Nas *Molecular Beacons*, um *repórter* fluorescente está ligado à extremidade 5' e um *quencher* está ligado à extremidade 3' de uma molécula de DNA de cadeia simples (ssDNA). No entanto, também são concebidos para adotar uma estrutura *hairpin-loop* ou *stem-and-loop*, enquanto livre em solução, para trazer o *repórter* fluorescente e o *quencher* em estreita proximidade e assim poder ocorrer FRET. A porção *loop* da molécula é complementar da molécula de ácido nucleico alvo e a porção *hairpin* é formada pelo *annealing* das sequências complementares nas extremidades da sonda. A grande proximidade do *repórter* e do *quencher* nesta configuração *hairpin* suprime a fluorescência do *repórter*. Quando a sequência da

sonda na *loop* hibridiza com uma sequência alvo de ácido nucleico complementar durante o passo de *annealing*, ocorre uma alteração configuracional que obriga a *hairpin-loop* a separar-se (Figura 6).

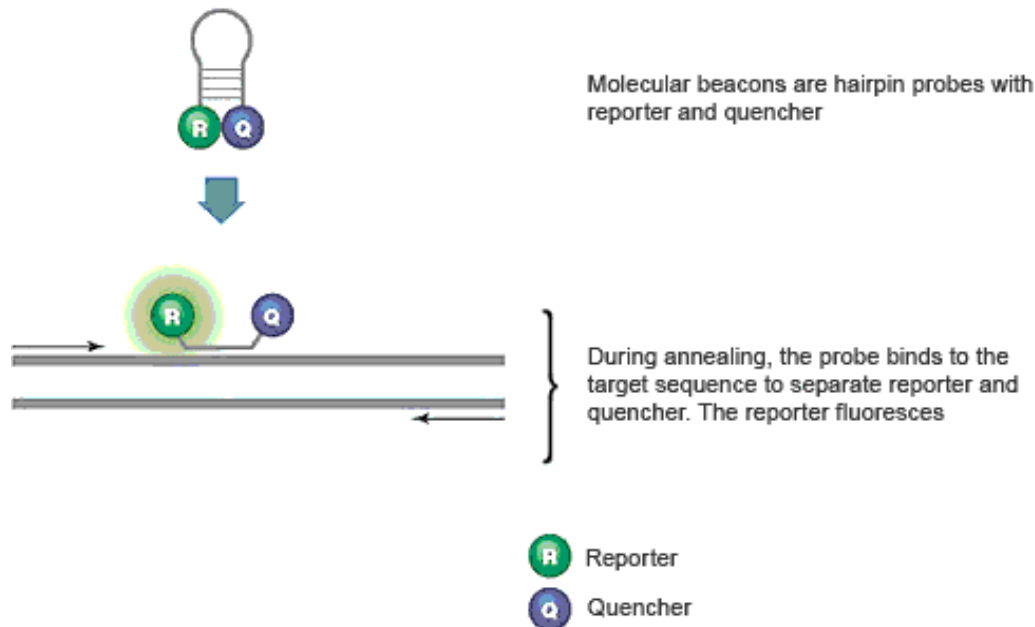


Figura 6 - Modo de funcionamento da sonda Molecular Beacons.

(Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

Isto resulta numa estrutura linear e, portanto, a separação do *repórter* do *quencher* (FRET não ocorre) e um aumento na emissão de fluorescência. Uma nova hibridização ocupa lugar no passo de *annealing* de cada ciclo, e a intensidade da fluorescência resultante indica a quantidade de amplicão acumulada no fim do ciclo anterior. *Molecular Beacons* permanecem intactas durante a PCR (ao contrário das sondas *TaqMan* que são destruídas pela atividade 5' exonuclease) e devem re-hibridizar com a sequência alvo em cada ciclo para a emissão de fluorescência. A quantidade de fluorescência emitida pelo *repórter* na *Molecular Beacon* é proporcional à quantidade de alvo na reação. *Molecular Beacons* são particularmente adequados para a identificação de mutações pontuais (VanGuilder *et al*, 2008).

Molecular Beacons têm algumas vantagens sobre outras químicas, são altamente específicos, podem ser utilizadas para *multiplex*, e se a sequência alvo não corresponde exatamente à sequência da *Molecular Beacon*, a hibridização e

fluorescência não ocorrerão, uma qualidade desejável para as experiências de discriminação de alelos. A principal desvantagem do uso de *Molecular Beacons* está na sua concepção, o *hairpin* deve ser forte o suficiente para que a molécula não se dobre espontaneamente numa conformação *non-hairpin*, que resulta numa fluorescência indesejada. Ao mesmo tempo, o *hairpin* não deve ser muito forte, ou a *Molecular Beacon* pode não hibridizar adequadamente com o alvo (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Quantificação

Após a extração do DNA, uma medição precisa da quantidade de DNA e qualidade do DNA extraído, é desejável. Com o avanço da tecnologia, análises forenses de DNA têm sido realizadas com sucesso numa imensa variedade de materiais como cabelos, saliva, impressões digitais e células epiteliais em vários objetos, e até mesmo em materiais que se encontram misturados, no entanto a quantidade de DNA presente nas diferentes amostras pode variar substancialmente. Por vezes a amostra já se encontra muito degradada e, se a quantidade de DNA presente for mínima, prejudicará o êxito da análise (Andréasson *et al*, 2006).

Para assegurar que a quantidade presente numa amostra é indicada para subsequente amplificação por PCR, que o DNA extraído é especificamente humano e não de outra fonte biológica, e que apenas uma quantidade mínima seja utilizada para análise, a *DNA Advisory Board* recomenda a quantificação de DNA como um procedimento obrigatório (Goodwin *et al*, 2011).

Esta quantificação específica de DNA humano é essencial para assegurar a qualidade dos estudos, principalmente em casos que se baseiam em amostras degradadas ou com baixo número de cópias de DNA. Permite, igualmente, a possibilidade de uma decisão entre o estudo de nDNA ou mtDNA, como, também, obter informações acerca do estado de degradação da amostra e da presença de inibidores (Alonso *et al*, 2003).

Muitos fatores ambientais contribuem para uma rápida degradação do DNA, como o tempo, altas temperaturas, nucleases e humidade, sendo estes os maiores problemas nas análises forenses. A presença de inibidores da PCR é muito comum nos vestígios, tais como a melanina dos cabelos, ureia e a hemoglobina dos eritrócitos, podendo ser facilmente extraídos juntamente com o DNA da amostra, não permitindo a amplificação por PCR (Butler, 2005).

Tem vindo a ser cada vez mais utilizado um método que tem demonstrado ser muito sensível, específico e de baixo custo, a *real-time* PCR, designada por alguns autores como rtqPCR ou, simplesmente, qPCR, que significa quantificação por PCR em tempo real ou PCR quantitativa (Arya *et al*, 2005; Timken *et al*, 2005; Niederstatter *et al*, 2007; Whittle & Sumita, 2008; Fregel *et al*, 2011).

Características de um ensaio qPCR otimizado

Uma vez que a quantificação em tempo real se baseia na relação entre a quantidade inicial de *template* e o valor de CT obtido durante a amplificação, um ensaio qPCR ótimo é essencial para a quantificação precisa e reprodutível de uma amostra. As características de um ensaio qPCR otimizado são:

- Curva padrão linear ($R^2 > 0,980$ ou $r > | -0,990 |$)
- Alta eficiência de amplificação (90-105%)
- Coerência entre reações idênticas (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Uma forma eficaz de determinar se o ensaio qPCR está otimizado é executar uma série de diluições de uma amostra e usar os resultados para gerar uma curva padrão. O *template* utilizado para este fim pode ser um alvo com uma concentração conhecida (por exemplo, nanogramas de DNA genómico ou de cópias de DNA de plasmídeo), ou uma amostra de quantidade desconhecida (por exemplo, cDNA). A curva padrão é construída através da representação gráfica do logaritmo da quantidade inicial de *template* (ou o fator de diluição, para quantidades desconhecidas) sobre o valor de CT obtido durante a amplificação de cada diluição. A equação da linha de regressão linear, com coeficiente de

correlação de *Pearson* (r) ou o coeficiente de determinação (R^2), pode então ser utilizado para avaliar se o ensaio qPCR está otimizado (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

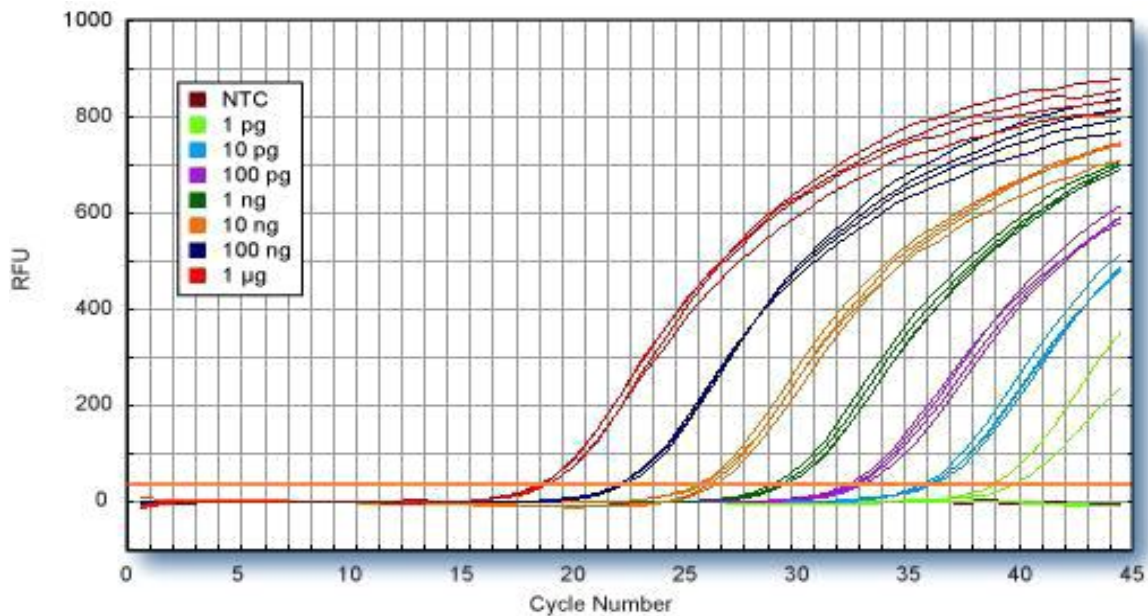


Figura 7 – Série de diluição (Ensaio qPCR otimizado).

(Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

Idealmente, a série de diluição irá produzir curvas de amplificação que estão uniformemente espaçadas, tal como mostra na Figura 7. Se uma duplicação perfeita ocorre em cada ciclo de amplificação, o espaçamento entre as curvas de fluorescência será determinada pela equação $2^n = \text{fator de diluição}$, onde n é o número de ciclos entre as curvas no limiar de fluorescência (ou seja, a diferença entre os valores de CT das curvas). Por exemplo, com uma diluição de 10 vezes em série, de DNA, $2^n = 10$. Por conseguinte, $n = 3,32$, e os valores de CT devem ser separados por 3,32 ciclos. As curvas de amplificação uniformemente espaçadas produzirão uma curva linear padrão, como mostra na Figura 8. A equação e valor r da linha de regressão linear são mostrados acima do gráfico. O valor de r ou R^2 de uma curva padrão representa o quão bem os dados experimentais se ajustam na linha de regressão, isto é, como os dados são lineares. Linearidade, por sua vez, dá uma medida da variabilidade entre ensaios replicados e se a eficiência de amplificação é a mesma para diferentes números

de cópias de *template* inicial. A diferença nos valores de CT observados entre repetições irá diminuir o valor de r ou R2. Para resultados ótimos deve-se obter um r cujo valor absoluto é $> 0,990$ ou um valor de $R^2 > 0,980$ (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

A eficiência de amplificação, E, é calculada a partir do declive da curva padrão, utilizando a seguinte fórmula: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Idealmente, a quantidade de produto de PCR irá duplicar durante cada ciclo de amplificação exponencial, isto é, haverá um aumento de 2 vezes no número de cópias em cada ciclo. Isso traduz-se numa eficiência de reação igual a 2. Usando uma eficiência igual a 2 na equação acima, $2 = 10^{-1/\text{slope}}$, indica que a inclinação ótima da curva padrão será -3,32. Note-se que o valor absoluto do declive é o mesmo que o espaçamento ideal dos traços fluorescentes descritos anteriormente. A eficiência da amplificação é também frequentemente apresentada como uma percentagem, ou

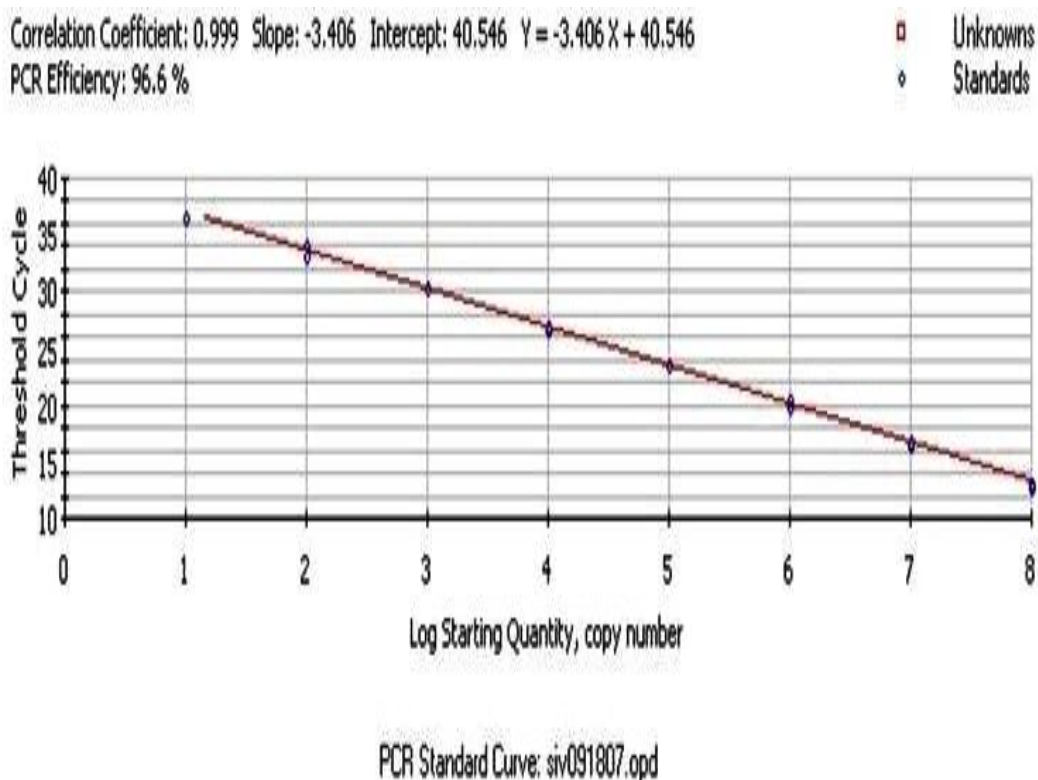


Figura 8 - Curva linear padrão resultante de curvas de amplificação uniformemente espaçadas. (Fonte: Bio-Rad Laboratories Inc., 2006)

seja, a porcentagem de *template* que foi amplificado em cada ciclo. E para converter em porcentagem:

$$\text{Eficiência\%} = (E - 1) \times 100\%$$

Para uma reação ideal % Eficiência = $(2 - 1) \times 100\% = 100\%$. (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

Uma eficiência de cerca de 100% é o melhor indicador de um ensaio robusto e reproduzível. Para resultados ótimos deve se obter uma eficiência de amplificação de 90-105%. Eficiências de reação baixas podem ser causadas por mau desenho de *primers* ou por condições de reação abaixo do ideal. Eficiências de reação >100% pode indicar erro de pipetagem nas diluições de série ou coamplificação de produtos não específicos, como dímeros de *primers*. Quando se utiliza o método descrito para determinar a eficiência de amplificação, na presença de inibidor também pode resultar num aumento aparente na eficácia. Isto porque, as amostras com a maior concentração de *template* têm também o nível mais elevado de inibidores, os quais causam um CT tardio, enquanto as amostras com concentrações mais baixas de *template* têm níveis mais baixos de inibidores, causando um CT mais precoce. Como resultado, o valor absoluto do declive diminui e a eficiência calculada parece aumentar. Se a eficiência da reação é <90% ou >105%, dever-se-á modificar o ensaio, redesenhando os *primers* e/ou sondas (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

HRM

A análise *High Resolution Melting* (HRM) é um aprimoramento da análise *melting* tradicional do DNA, explicada anteriormente neste capítulo, que pode ser usada para determinar as variações de sequência dentro de amplicões de PCR. A análise HRM requer uma amplificação inicial da sequência alvo através da PCR, na presença de um corante de ligação ao DNA que gere um sinal fluorescente forte quando ligado apenas a DNA de cadeia dupla. Análise HRM é realizada como uma extensão de "tubo fechado" para o ciclo de PCR, para a caracterização

da variação genética nas sequências de ácidos nucleicos com base no comportamento de fusão (dissociação) de um produto de PCR à medida que transita de cadeia dupla para cadeia simples de DNA, com uma resultante diminuição na fluorescência (Figura 9). Isso produz um perfil de *melting* característico para a sequência de tipo selvagem (wt). As mutações presentes em outras amostras podem ser detetadas, quer como uma mudança no ponto de

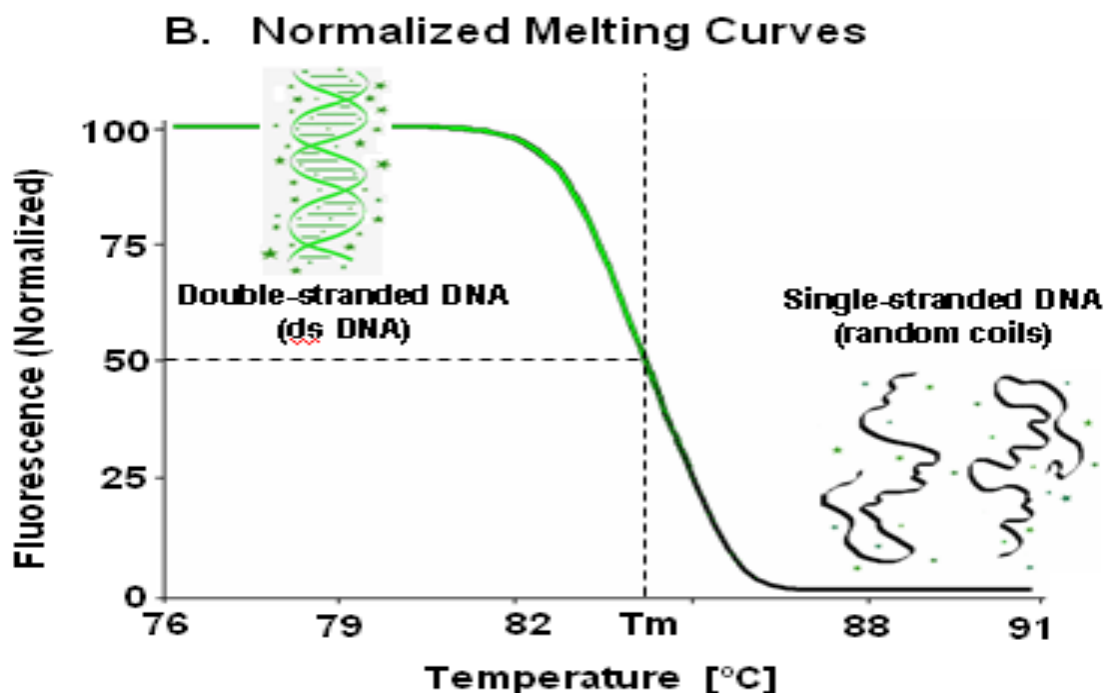


Figura 9 - Análise High-resolution DNA Melting

(Fonte: <http://www.gene-quantification.de/hrm.html>)

fusão (dissociação) da curva de *melting*, ou como uma mudança na forma da curva de *melting*. Perfis de curva de *melting* são comparados utilizando a HRM, de tal modo que a determinação do genótipo a partir de dados da análise HRM é um processo simples e semiautomatizado. Uma vez que a análise HRM não requer sondas oligonucleotídicas marcadas caras, torna-se uma alternativa rentável aos tradicionais métodos de genotipagem baseados em sondas (Gidlöf *et al*, 2009)

Instrumentação de fluorescência que incide na HRM tem sido adotada para instrumentos de PCR em tempo real, com sucesso. Os dados de fluorescência,

gerada durante a dissociação de DNA, podem ser analisados através da análise HRM com base na temperatura de *melting* (T_m) ou na forma da curva de *melting*. Os dados da T_m são calculados após a remoção matemática do fundo (background) e normalização da curva de *melting*. Diferenças na T_m podem permitir a discriminação de muitos genótipos, diferenças na forma das curvas de *melting* podem ser convenientemente exibidas pela sobreposição de curvas normalizadas e traçando as diferenças entre as amostras de fluorescência (Erali *et al*, 2009).

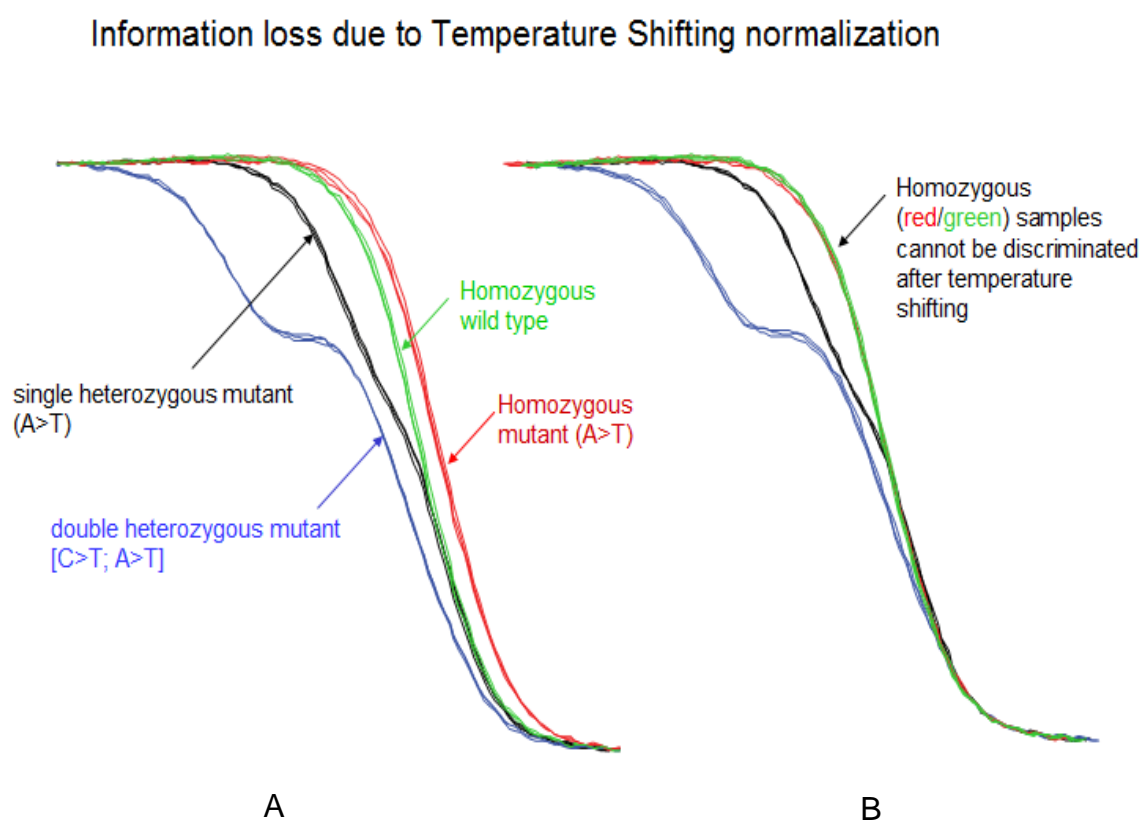


Figura 10 - Genotipagem de SNPs por HRM.

Amostras de tipo selvagem homozigóticas, mutação e heterozigóticas são mostrados numa curva de *melting* (A) e uma curva normalizada para a mutação (B). Cada categoria de genótipo SNP pode ser facilmente discriminado antes da normalização da temperatura. No entanto, quando as curvas são normalizadas, genótipos homozigóticos sobrepõem-se precisamente e já não podem ser discriminados.

(Fonte: <http://www.gene-quantification.de/hrm.html>)

HRM oferece um análise simples e de baixo custo, análise rápida (1-5min pós PCR) sem adição de reagentes e sem processos de separação) e uma elevada flexibilidade para a detecção de quase qualquer variante de sequência concebível.

As aplicações incluem:

- Descoberta e verificação de mutações
- Análise de metilação e quantificação
- DNA *fingerprinting*
- Análise STR
- Inserções e deleções
- Teste de zigosidade (Reed *et al*, 2007; Wittwer, 2009).

A versatilidade desta tecnologia emergente permite diversas aplicações, tais como genotipagem de mutações, correspondência de sequências e tipagem HLA, identificação de espécies, distinção de diferentes homozigotos através de diferenças na temperatura de melting e genotipagem de SNPs (Palais *et al*, 2005).

CAPITULO 2 Aplicações Forenses da Real-Time PCR

2.1 Quantificação de DNA:

Ensaio com real-time PCR têm sido desenvolvidos para várias aplicações forenses, incluindo a quantificação de nDNA e mtDNA e DNA do cromossoma Y (Timken *et al*, 2005). Estes exploram recursos da qPCR que tornam a técnica particularmente atrativa para aplicações forenses:

- Ensaio de qPCR podem ser projetados para quantificar genomas específicos de interesse;
- Os ensaios podem ser sensíveis o suficiente para detetar apenas algumas cópias ou mesmo uma única cópia de DNA alvo;
- Taxas de detecção dinâmica da qPCR abrangem prontamente as, cerca de, três ordens de magnitude necessárias para a maioria das aplicações forenses (por exemplo: 30 pg para 30 ng de nDNA);
- Os protocolos experimentais para quantificações na PCR em tempo real são simples, de grande economia de trabalho, e passíveis de automatização.
- Além disso, o uso de químicas específicas de detecção (por exemplo, *TaqMan* ou *Molecular Beacon*) torna possível a concepção *multiplex*, ensaios em tempo real qPCR que podem quantificar simultaneamente mais do que um alvo numa amostra, oferecendo a possibilidade de poupar tempo, trabalho e DNA extraído (Timken *et al*, 2005).

Em 2002 Andreasson *et al*. descreveram um ensaio qPCR duplex para quantificação de nDNA e mtDNA, usando a sonda *TaqMan*. O ensaio de quantificação foi concebido como uma análise *multiplex* de mtDNA e nDNA simultaneamente, o que limita as quantidades DNA necessárias para a quantificação de amostras forenses. Assim, é obtida uma estimativa simultânea do número total de cópias de nDNA e o número total de moléculas de mtDNA numa amostra forense, em particular.

Andrèasson *et al*. referem que este sistema de quantificação com a real-time PCR tem-se mostrado sensível, fiável, reproduzível e muito útil na análise de DNA

forense de rotina e que em comparação com muitos outros ensaios de quantificação utilizados na análise de DNA forense, a quantificação utilizando o ensaio qPCR *TaqMan* é mais rápida, mais fácil e também mais sensível.

Os seus resultados demonstraram que a abordagem qPCR duplex fornece uma quantificação de DNA útil e sensível, economizando tempo de análise e, muitas vezes, DNA limitado.

Existem várias áreas em análise forense, em que o ensaio qPCR *TaqMan* pode ser útil para além da determinação do número de cópias de DNA de uma amostra forense em particular:

- O ensaio pode ser utilizado para determinar o número de cópias médio de DNA num tipo particular de amostra forense, tais como impressões digitais, a caspa, os pelos, ou outros materiais;
- Os efeitos sobre o teor de DNA de diferentes materiais forenses, tais como as impressões digitais de visualização química, pode ser avaliada;
- O ensaio pode ser usado para determinar a eficiência de amplificação e de rendimento de *templates* distintos em termos de otimização por PCR *multiplex* utilizando sondas marcadas com fluorocromos diferentes;
- A proporção de moléculas de mtDNA por célula pode ser avaliada em tecidos diferentes. Isto é útil na avaliação de materiais forenses e em estudos de doenças associadas a mutações do mtDNA (Andréasson *et al*, 2002).

Além disso, os procedimentos de extração de DNA são ineficientes e estão associados a uma perda substancial de DNA valioso na amostra forense, portanto, os procedimentos de DNA diferentes de extração e purificação podem ser avaliados e comparados por meio deste sistema de quantificação no que diz respeito à recuperação de DNA e remoção de inibidores (Andréasson *et al*, 2002).

Em 2003 e 2004, Alonso *et al*, conceberam ensaios em real-time PCR de mtDNA para estimar a quantidade de DNA e o seu estado de degradação a partir de amostras de DNA antigo recuperadas de restos de esqueletos com 500 a 1.500 anos de idade. Desenvolveram dois ensaios de qPCR *singleplex* para quantificar o genoma mitocondrial humano, um com o alvo 113 pb HVI e outro com o alvo

287 bp na região HVI. Devido à diferença de tamanho entre as duas sequências alvo, demonstraram que a comparação dos resultados destes ensaios de quantificação de qPCR mitocondriais pode proporcionar informação sobre o grau de degradação de DNA. O desenvolvimento de um ensaio PCR em tempo real de mtDNA para estudar especificamente dois tamanhos diferentes (fragmento 113 bp e 287 bp) foi demonstrado como eficaz na avaliação do número de cópias do mtDNA e do estado de degradação de amostras antigas de osso e de dentes. A PCR em tempo real demonstrou ser um método altamente sensível e específico para a quantificação do nDNA e mtDNA recuperados de restos humanos antigos.

Em 2004, Vallone *et al*, estudaram a genotipagem de SNPs localizados em todo o genoma mitocondrial para ajudar a resolver casos em que os indivíduos possuem as regiões HV1/HV2 idênticas. Um conjunto de 11 SNPs selecionados para distinguir indivíduos caucasianos que possuem HV1/HV2 idênticas, foram incluídas num ensaio *multiplex*. O ensaio foi otimizado para a detecção *multiplex* de SNPs nas posições 3010, 4793, 10211, 5004, 7028, 7202, 16519, 12858, 4580, 477 e 14470 no genoma mitocondrial e as amostras de mistura de DNA foram quantificadas por real-time PCR. Os autores demonstraram que o ensaio funciona bem para a detecção de heteroplasmia e mistura de DNA, e no tratamento de casos típicos com amostras de mtDNA altamente degradadas. O ensaio demonstrou ser robusto e indica ter potencial para misturas de amostras e amostras degradadas com baixo número de cópias de DNA.

Timken *et al*, 2005, desenvolveram um ensaio real-time PCR duplex para quantificação de nDNA e mtDNA humano em amostras forenses, onde concluíram que para amostras muito degradados, o ensaio qPCR duplex fornece melhores estimativas do *template* nDNA para amplificação STR do que o ensaio qPCR ou comercial, ou hibridação *Slot blot*. Além de descreverem os resultados da quantificação de DNA em amostras degradadas, também abrangeram os aspetos do desenvolvimento do ensaio qPCR duplex, e detalhes de estudos de validação forenses, incluindo estudos de precisão, reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade de espécie e aplicações ao estudo de casos do tipo amostras.

Em 2006, Andréasson *et al* voltaram a realizar um ensaio de quantificação *multiplex* com base no método de detecção em tempo real 5'-exonuclease (*TaqMan*). Neste estudo, avaliaram o teor de DNA de tipos comuns de materiais forenses utilizando o ensaio de quantificação anteriormente descrito (Andréasson *et al*, 2002). Ambos números de cópias de mtDNA e nDNA foram determinados numa porção da raiz dos cabelos arrancados da cabeça, enquanto que a quantidade de mtDNA foi estimado nas partes mais distais. A quantidade de nDNA foi determinada nos pelos do corpo e nas células epiteliais recuperadas de acessórios (por exemplo, anéis, relógios, colares/pulseiras, óculos, brincos), e a quantidade de ambos mtDNA e nDNA foi determinada em células epiteliais recuperadas de impressões digitais. Usando este ensaio sensível de quantificação de PCR em tempo real, obteve-se um melhor entendimento sobre o conteúdo de DNA e a variação em materiais forenses comumente analisados, e isso pode orientar o cientista forense quanto à melhor abordagem de biologia molecular para analisar várias provas forenses (Andréasson *et al*, 2006).

A real-time PCR tem uma grande utilidade na quantificação de DNA forense, e é particularmente útil na análise pós-extração de amostras que contêm DNA altamente degradado. Essas amostras, embora não sejam incomuns, são mais frequentemente encontradas, por exemplo, em casos de desastres em massa e em casos de pessoas desaparecidas.

Ricci *et al*, em 2006, utilizaram extensivamente a PCR quantitativa em tempo real, juntamente com um kit comercialmente disponível (Kit de Quantificação Quantifiler Human DNA, Applied Biosystems), para a quantificação de DNA humano numa grande variedade de amostras recuperadas no tratamento de casos forenses (amostras forenses, incluindo manchas de sangue, esperma, secreção vaginal, cabelos, ossos e dentes velhos foram extraídos). De acordo com a experiência, a utilização destes kits permitiram definir as reações de amplificação de um modo racional, adicionando a quantidade adequada de *template* de DNA para realizar uma reação de PCR equilibrada.

Em 2007, Niederstatter *et al*, desenvolveram um ensaio modular da real-time PCR para uma quantificação absoluta do nDNA e mtDNA. Para a determinação do número de *templates* amplificáveis como o tamanho mínimo requerido para genotipagem e avaliação do grau de degradação do DNA pela PCR, foram utilizados *primers* de diferentes tamanhos (nDNA: 79, 156 e 246 bp; mtDNA: 102, 143, 283 e 404 bp) e sondas *TaqMan* para amplificação e detecção de produtos gerados pela PCR. DNA degradado por DNases serviram como modelo para demonstrar os efeitos da fragmentação do DNA na quantificação pela real-time PCR e subsequente genotipagem. Devido ao seu elevado grau de sensibilidade e especificidade, a sua grande gama dinâmica e linear, o seu formato de ensaio homogêneo e a automatização, a PCR em tempo real é uma abordagem muito atraente para a quantificação absoluta de DNA amplificável em amostras forenses. Estes autores têm usado a real-time PCR para a quantificação de DNA de amostras no tratamento de casos em laboratório há 2 anos, o que reforçou a otimização do fluxo de trabalho da amostra, facilitando a automatização da amostra e os procedimentos de processamento de dados.

A quantificação precisa de DNA forense extraído é agora bastante simples com a utilização da PCR em tempo real. Tornou-se uma etapa essencial após a purificação do *template* no tratamento de casos forenses antes da amplificação por PCR de *loci* STR ou do mtDNA, de modo a otimizar ou mesmo evitar o processamento de amostras adicionais. Existem vários relatórios de ensaios de qPCR forenses e kits comerciais agora disponíveis ou a ser disponibilizados que permitem a quantificação por qPCR de um ou mais alvos representativos, a maioria destas obras descrevem ensaios que quantificam até três alvos (Whittle & Sumita, 2008).

Com base no protocolo descrito por Niederstatter *et al*, 2007, Coble *et al* em 2009, desenvolveram um ensaio de quantificação de mtDNA pela real-time PCR, crucial na descoberta de pessoas desaparecidas. Testes de DNA forense foram realizados com restos mortais descobertos em 2007, utilizando o mtDNA, STR autossômico e Y-STR. Combinados com o teste de DNA adicional do material da

sepultura de 1991, estes investigadores encontraram evidências praticamente irrefutáveis de que os dois indivíduos recuperados da sepultura de 2007 são as duas crianças desaparecidas da família Romanov.

A quantificação do DNA é um pré-requisito para o estudo de amostras forenses com baixo número de cópias e análise de DNA antigo.

O método apresentado por Fregel *et al* em 2011, combinou dois ensaios *TaqMan multiplex* PCR em tempo real para a quantificação nDNA e mtDNA em amostras degradadas ou limitadas. Detecção de nDNA baseou-se na amplificação independente de fragmentos específicos no *locus* amelogenina dos cromossomas X e Y e um controlo interno de PCR (IPC) para reconhecer problemas com inibidores. O pequeno comprimento dos fragmentos (71 pb) favoreceu a quantificação do DNA severamente degradado. A quantificação de mtDNA baseou-se na amplificação de três fragmentos de PCR localizados na região 16S do mtDNA. Dois deles foram amplificados com *primers* específicos humanos e sondas, o que permitiu uma aplicação da técnica em todo o mundo. Além disso, a sua diferença de tamanho (167 e 314 pb, respetivamente), forneceu informações sobre o nível de degradação do DNA. A fim de reconhecer DNA não humano, um fragmento de mtDNA interespecífico (187 pb) foi também desenvolvido.

2.2 Determinação do Sexo e Identificação Humana:

A partir da amplificação de um segmento do gene da amelogenina nos cromossomas homólogos X e Y, torna-se possível, não só a quantificação, como também a determinação do sexo do indivíduo. Esta quantificação é importante nos casos em que exista uma mistura de DNA masculino e feminino, frequente em casos de agressão sexual, dando informações sobre a componente masculina (Alonso *et al.*, 2004;).

Várias publicações recentes têm abordado exatamente essas questões para amostras forenses, em especial para as amostras degradadas. Alonso *et al.*, em 2003 têm desenvolvido ensaios de qPCR para várias amostras degradadas e difíceis, incluindo um ensaio duplex que, simultaneamente, quantifica os cromossomas X e Y humanos com alvo 106 pb e 112 pb no gene amelogenina (AMG). O uso da PCR em tempo real para visar especificamente o número de cópias de cromossomas sexuais X e Y mostrou ser de grande ajuda para uma deteção precisa de cada contribuição masculino/feminino nessas misturas desequilibradas, oferecendo também a possibilidade de realizar simultaneamente análise qualitativa diferente como a determinação do sexo e a degradação do DNA. Mais tarde, em 2004, Alonso *et al.*, repetiram os ensaios, mostrando que a PCR em tempo real para AMGX/AMGY demonstrou ser um método altamente sensível e específico, tanto para a quantificação do nDNA como na determinação do sexo das amostras ósseas forenses.

Schlenk *et al.* em 2004 efetuaram um estudo no qual descreveram o desenvolvimento de um sistema qPCR *multiplex* para 13 *loci*, em pedidos de testes de paternidade. Para este fim, um sistema de qPCR *multiplex*, que permite a amplificação simultânea de oito *loci* STR diferentes, juntamente com o *locus* de amelogenina sexo-específico, foi alargado. Foram descritos de forma confiável perfis de DNA completos de amostras de uma única fonte a partir de *template* de DNA de quantidades tão baixas como 120pg, sugerindo um potencial uso deste sistema também na análise de casos forenses. Com uma margem média de

exclusão de 99,9989% e um poder de discriminação de cerca de 1×10^{14} , em caucasianos, o novo sistema de qPCR *multiplex* oferece um método importante e sensível para análise de DNA forense.

O sistema *multiplex* apresentado, compreendendo um total de 12 *loci* STR, acabou por ser uma ferramenta robusta e confiável para genotipagem. O design do kit e protocolo de amplificação foi otimizado para satisfazer as necessidades de diferentes aplicações com amostras de DNA derivadas de uma variedade de fontes. Devido ao seu elevado grau de sensibilidade e uma capacidade de discriminação de cerca de 1×10^{14} , o sistema *multiplex* por real-time PCR pode ser considerado como um dispositivo eficaz, não só para os testes de paternidade, mas também para análise forense (Schlenk *et al*, 2004).

Anwar *et al* 2006, referem que o gene amelogenina é muito bem conhecido pela comunidade forense, como um indicador do sexo do dador de uma amostra específica. Estes autores escolheram o gene AMG como alvo da PCR em tempo real, a qual é significativamente rápida e pode ser usada para processar economicamente pequenas amostras. Acrescentaram ainda, que utilizar AMG como alvo, com o objetivo de quantificar DNA extraído de uma amostra forense, oferece diversas vantagens e que a PCR em tempo real facultava resultados de quantificação com grande fiabilidade.

Fregel *et al*, 2011, realizaram dois ensaios *TaqMan multiplex* PCR em tempo real para a quantificação de nDNA e mtDNA em amostras degradadas ou limitadas, sendo que na quantificação de nDNA, estes investigadores basearam-se na amplificação independente de fragmentos específicos no *locus* amelogenina dos cromossomas X e Y, e se a quantificação é focada no *locus* amelogenina, também permite a determinação do sexo. Neste método para além da quantificação do nDNA e mtDNA, os autores puderam também determinar o sexo das amostras pelo estudo do gene amelogenina.

Alguns dos problemas destas técnicas são o fenómeno de *dropout* alélico no *locus* amelogenina (perda de alelos, que segundo Alonso *et al*, 2004, é um artefacto da PCR muito comum quando é feita genotipagem a partir de amostras

com baixo número de cópias, como amostras forenses) e enviesamentos de quantificação do mtDNA, devido a variação intraespecífica humana que afetam o *annealing* dos *primers* e/ou sondas. No entanto, o uso de dois conjuntos de *primers* diferentes para amplificação cromossomas X e Y foi utilizado para reduzir a *dropout* alélica na análise com baixo número de cópias. O método habitual de análise da amelogenina para determinação do sexo baseia-se na amplificação de um fragmento comum nos cromossomas X e Y, que inclui uma deleção de 6 pb apenas no cromossoma Y. No entanto amostras do sexo masculino podem ser afetadas por *dropout* alélica, levando a uma atribuição feminina incorreta quando apenas cromossoma X é amplificado. No método de Fregel *et al*, dois amplicões específicos (71 pb) de X e Y foram concebidos (nomeados de AMGX e AMGY). O amplicão AMGX está localizado numa inserção de 200 pb do cromossoma X, ao passo que o *primer reverse* e a sonda para AMGY, estão localizados na deleção de 6 bp que caracteriza o cromossoma Y.

2.3 Distinção de DNA Humano e Presença de Inibidores da PCR:

Segundo Nicklas & Buel, 2003, técnicas iniciais simplesmente mediam a quantidade de DNA total numa amostra, não distinguindo entre DNA humano e não humano, mas a técnica de real-time PCR, pode medir especificamente o DNA humano, excluindo o DNA não-humano (produto alimentar, animal, ou de contaminação bacteriana). Ensaios da real-time PCR podem ser mais rápidos e menos dispendiosos do que os métodos tradicionais (PCR convencional), tornando-os ideais para o laboratório forense. Métodos humano-específicos, utilizando PCR em tempo real foram desenvolvidos, permitindo a quantificação precisa para análises STR.

A combinação de dados de qualidade e quantidade de DNA humano proporciona ao analista de DNA forense uma informação substancial prévia para a amplificação STR, além disso, reduz o número de amostras precisas para reavaliação (Costello & Schumm, 2006).

Green *et al* em 2005, apresentaram os resultados de um estudo de validação de desenvolvimento que realizaram com os Kits Quantifiler. O Kit de Quantificação *QuantifilerTM Human DNA* e o kit de quantificação *QuantifilerTM Y Human Male DNA* foram concebidos para a quantificação de DNA genómico humano em amostras forenses, estes kits utilizam o método da PCR em tempo real para quantificar, respetivamente, DNA humano total ou somente DNA humano masculino. Os Kits Quantifiler foram testados para critérios de desempenho, tais como especificidade, sensibilidade, estabilidade, precisão e exatidão, e, além disso, foram testados com amostras do tipo forense e amostras com misturas de DNA (masculino e feminino). Um controlo interno positivo da real-time PCR (IPC), foi incluído como um controlo de qualidade interno para verificar a função de todos os componentes do sistema, bem como a capacidade de amplificação das amostras analisadas e a presença de inibidores. Os métodos Kit Quantifiler foram altamente específicos para o DNA humano, e detetaram quantidades tão ínfimas como 32 picogramas de DNA, utilizando apenas 2µl de amostra por ensaio. Estes testes de validação mostraram que o ensaio, envolvendo a real-time PCR, é fiável

e robusto, e produz resultados de quantificação consistentes. A utilização de ensaios de kit Quantifiler como um procedimento preliminar demonstrou permitir uma elevada taxa de sucesso para a análise subsequente de amostras com um método de genotipagem STR. Os ensaios também demonstraram possuir determinadas características únicas que são suscetíveis de serem benéficas na análise forense de DNA, tais como a capacidade de detetar DNA masculino separadamente em amostras misturadas com DNA feminino e de proporcionar mais informação sobre a presença de inibidores do PCR na análise de amostras.

A estimativa da quantidade de DNA humano é um procedimento recomendado em genética forense em que, estabelecer a concentração de DNA e avaliar a presença de inibidores da PCR numa amostra, representa um passo necessário antes de desenvolver uma reação de PCR. Com a técnica da PCR em tempo real baseada na atividade de 5-nuclease da *Taq* DNA polimerase para clivar uma sonda específica fluorescente, é possível a utilização de uma quantidade limitada de DNA para obter informação sobre a degradação de DNA e para revelar a presença de inibidores da PCR (Ricci *et al*, 2006).

Costello & Schumm, 2006 descreveram o desenvolvimento, validação e aplicação de um ensaio quantitativo duplex real-time PCR para quantificação específica de DNA humano com a presença de um IPC que permite a deteção simultânea de inibidores da PCR. Em conclusão os autores referiram que este tipo de ensaio providencia uma valiosa combinação de dados de quantificação de extrema sensibilidade e qualidade de DNA, que podem ajudar a reduzir a frequência de atrasos e a despesa na reamplificação e reanálise de STR. O perfil deste ensaio torna-o ideal para amostras com um baixo número de cópias, para as quais é necessária uma alta sensibilidade, e para deteção de inibidores antes de desperdiçar valiosas amostra, o que é extremamente importante.

No ano seguinte, 2007, Niederstatter *et al*, desenvolveram, a partir de um ensaio de rtqPCR *TaqMan* duplex publicada por Andreasson *et al*, um conceito de quantificação de nDNA e mtDNA humanos, que forneceu informação sobre a

qualidade das preparações de DNA. Foram introduzidos IPCs, gerados *in vitro* pela mutagénese dos alvos de nDNA e mtDNA, permitindo testar a funcionalidade da reação e a deteção de inibidores da PCR no DNA extraído, sem a necessidade de uma sonda *TaqMan* adicional. Uma amostra de hemateína foi usada para testar a capacidade da real-time PCR quantitativa em prever os efeitos dos inibidores na genotipagem pela PCR. Analisaram com sucesso mais de 12.000 amostras de tratamento de casos até agora e a taxa de repetições da PCR caiu de 18 para 7%. Isto demonstra claramente que o ensaio qPCR é uma valiosa ferramenta para análise forense de amostras do mundo real muitas vezes difíceis, reduzindo significativamente o tempo e o número de repetições dispendiosas de PCR *multiplex* de STR, que são causados pela utilização de quantidades subótimas de DNA *template* e a ação de inibidores de PCR.

Em 2008 Whittle & Sumita, procuraram desenvolver um ensaio de qPCR que permite a quantificação de três distintos mas relevantes alvos forenses de DNA humano e fornece informações sobre a possível presença de inibidores da PCR. Embora a quantificação de DNA *template* não possa transmitir a informação relativa à sua qualidade, procuraram amplificar alvos com menos de 130 pb de tamanho, dando assim alguma informação sobre a degradação de DNA. Um ensaio de PCR em tempo real quadruplex foi desenvolvido para quantificar quatro alvos de DNA:

1. O gene RB1 humano no nDNA
2. O gene presente no cromossoma DAZ Y humano
3. O gene presente na ATPase DNA mitocondrial humano
4. Um IPC artificial para revelar a possível presença de inibidores da PCR

Assim, se chegou à conclusão que a amplificação permaneceu sensível na presença de um excesso de DNA não-humano. A presença de inibidores pode afetar o processamento subsequente à quantificação, mesmo na presença de concentrações de *template* adequadas. O passo de quantificação é um momento ideal, durante o qual a influência de tais inibidores pode ser estimada (Whittle & Sumita, 2008).

Mais recentemente, em 2011, Soejima *et al*, vieram ainda reforçar que a PCR em tempo real é um sistema excelente para a quantificação de DNA humano para detetar especificamente DNA humano, porque proporciona uma elevada sensibilidade, elevada especificidade, e informação acerca das amostras de DNA terem um tamanho suficientemente elevado para serem amplificadas e ainda se estão presentes inibidores da PCR. Entre os vários métodos da PCR em tempo real, a sonda *TaqMan* é superior em termos de especificidade e também proporciona um ensaio altamente sensível. Com o objetivo de confirmar a aplicabilidade do presente protocolo para a prática forense, Soejima *et al* realizaram uma PCR em tempo real com DNA isolado de unhas de corpos em decomposição, e um fémur de um esqueleto, manchas de sangue com 6 anos de idade, e esperma de uma vagina como *template*. Foram obtidos resultados positivos a partir destas amostras forenses, bem como as quantidades foram estimadas entre 0,007 e 6,57 ng/ml. Os resultados do presente estudo sugerem que o método PCR em tempo real com base na sonda *TaqMan* e alvo *FOXP2* é altamente sensível e capaz de discriminar e quantificar o DNA humano especificamente.

Também em 2011 Fregel *et al*, realizaram dois ensaios *TaqMan multiplex* PCR em tempo real para a quantificação de nDNA e mtDNA em amostras degradadas ou limitadas, tendo introduzido um IPC artificial para revelar a possível presença de inibidores da PCR evitar qualquer tipo de confusão na análise das amostras forenses em estudo. Com o sistema *TaqMan* real-time PCR, os autores obtiveram informações sobre o nível de degradação do DNA e puderam também reconhecer DNA não humano de um fragmento de mtDNA interespecífico.

2.4 Estudo de Haplogrupos e Origem Geográfica de Amostras:

A PCR em tempo real tem vindo a demonstrar também, a sua utilidade no estudo e investigação de vários haplogrupos, origem geográfica de amostras e populações antepassadas a partir de amostras antigas de DNA.

Em 2006, o estudo de populações antigas, da Ásia Central, Sibéria e da América do Sul, com STRs e SNPs de mtDNA permitiu a Petkovski *et al*, investigar relações parentais entre os indivíduos de locais de sepultura revelando práticas funerárias. Estudos de DNA antigo também forneceram informações sobre a origem e a história da população antepassada. Focando-se em marcadores bialélicos que têm uma baixa taxa de mutação de polimorfismo de repetição, foi possível corresponder os eventos a períodos de tempo mais longos. Nos seus estudos antropológicos sobre as amostras de DNA antigo da Mongólia, Sibéria e América do Sul, concentraram esforços em três SNPs do cromossoma Y (TAT, M242 e RPS4Y) conhecidos por ter distribuições específicas alélicas nessas populações ou por serem informativos sobre o povoamento da América (M242 e RPS4Y). Amostras antigas onde o DNA está fortemente degradado e escasso foram quantificadas pela PCR em tempo real, permitindo fornecer informações de perfis distintos de SNPs a partir de apenas pequenos fragmentos de *template* intacto.

A filiação regional, a partir dos haplogrupos detetados também pode ser um fator útil e decisivo na identificação pessoal ao analisar indivíduos desconhecidos ou amostras de rastreio (Pontes & Pinheiro, 2008).

Segundo Pontes & Pinheiro, 2008, a porção não recombinante do cromossoma Y tem vários tipos de variação, incluindo SNPs, e apesar do seu baixo poder de discriminação, SNPs fornecem uma ferramenta de exclusão poderosa e simples para fins forenses, é que podem potencialmente detetar fragmentos mais pequenos de DNA, o que é importante, em particular para a análise de DNA degradado. Posto isto, estes autores realizaram um estudo que consistiu na

análise de um grupo de polimorfismos SNP (M2, M9, M35, M89, M45, M170, M172, M173, M207 e P25) numa amostra de população masculina do norte de Portugal, que permitiu a determinação dos haplogrupos europeus mais comuns, incluindo os de norte de Portugal. O método utilizado para a genotipagem destes polimorfismos foi a PCR em tempo real com sondas *TaqMan*, tendo chegado à conclusão que com a real-time PCR é possível definir haplogrupos.

Um outro trabalho que comprova a importância da PCR em tempo real para o estudo de haplogrupos em amostras forenses é o de Malmstrom *et al* em 2009. Através da análise de DNA extraído de restos humanos antigos escandinavos, mostraram que as pessoas da cultura Ware Pitted (PWC) não eram os ancestrais diretos dos modernos escandinavos (incluindo a população Saami do norte da Escandinávia), mas que estão mais estreitamente relacionadas com as populações contemporâneas da região do Báltico oriental.

Malmstrom *et al*, para investigar componentes de ancestralidade da PWC nos escandinavos modernos e povos da região do Báltico, recuperaram amostras antigas do esqueleto de 22 indivíduos provenientes das duas culturas diferentes e utilizaram a real-time PCR quantitativa em sequências do mtDNA (316 pb do D-loop) para avaliar o teor de mtDNA humano total em todas as amostras e para pesquisar o comportamento molecular apropriado (razão de degradação). Os seus resultados suportaram as hipóteses decorrentes de análises arqueológicas que propõem uma substituição da população do Neolítico ou pós-Neolítico na Escandinávia, além disso, os dados são consistentes com a visão de que o Báltico oriental representa um refúgio genético para algumas populações de caçadores europeus.

2.5 Determinação da Idade:

Wurmb-Schwark *et al*, 2002, avaliaram a precisão e fiabilidade da PCR em tempo real para quantificar genoma mitocondrial. Foi utilizada a PCR em tempo real para quantificar a frequência da deleção de 4977 pb do mtDNA (dmtDNA), comumente associada à idade, num conjunto de 42 amostras de músculo iliopsoas de indivíduos de idade conhecida. Os resultados indicam que a frequência da mutação poderia ser usada para distinguir entre tecidos de indivíduos jovens e velhos. Concluíram que a PCR em tempo real é um método valioso, fiável e fácil de usar para quantificar a quantidade total de mtDNA, que pode ser útil para uma análise mais aprofundada. O método pode também ser adequado para determinar a proporção da dmtDNA para estimar a idade de um indivíduo numa abordagem forense ou para investigar a relação entre o mtDNA mutado e as doenças específicas sob aspetos patológicos.

Segundo Wu & Csako, 2006, com base na observação de que a dmtDNA acumula em tecidos pós-mitóticos com o avanço da idade, esta deleção foi proposta para ser utilizada como um relógio molecular forense. Ensaios de PCR em tempo real, têm sido desenvolvidos para a deteção e quantificação desta deleção, tendo sido demonstrada a viabilidade de utilização de ensaios quantitativos com amostras forenses de pequenos tamanhos (100 a 200 pb), como um resultado da degradação do DNA.

Schwark *et al* em 2006 debruçaram-se também sobre este tema através de um ensaio duplex na PCR em tempo real, referindo a importância da dmtDNA para os cientistas forenses e clínicos, sendo que diferentes métodos de PCR têm sido utilizados comumente para determinar quantidades de dmtDNA. Schwark *et al* desenvolveram um ensaio duplex real-time PCR utilizando sondas e validando este método, aplicando-o a amostras relevantes a nível forense e clínico. Findado o trabalho, concluíram que o ensaio duplex da PCR em tempo real é um meio muito eficiente para quantificar de forma segura e fácil a dmtDNA e que este é adequado para análises quantitativas de apenas ínfimas quantidades de dmtDNA

(por exemplo no sangue) assim como de materiais altamente degradados, características como estas fazem desta técnica uma excelente aplicação para fins forenses e clínicos.

Mais uma publicação de Wurmb-Schwark *et al*, 2006, em que reforçaram a grande utilidade da real-time PCR na quantificação da dmtDNA nos tecidos pós-mitóticos, como o músculo esquelético e cérebro, mesmo nos tecidos de rápida replicação como a pele ou o sangue, afirmando ainda que o mtDNA pode ser influenciado por vários fatores intrínsecos e extrínsecos.

2.6 Estudo do mRNA:

O RNA mensageiro (mRNA) pode fornecer a necessária sensibilidade, especificidade e capacidade de automatização que os laboratórios modernos de biologia forense exigem para identificação da origem celular. Cada tipo de célula tem o seu próprio transcriptoma e diferenças no padrão de expressão podem ser utilizadas para identificar marcadores de mRNA com forte sobre-expressão em relação aos outros tipos de células relevantes a nível forense (tais como fluidos corporais). Com a identificação precoce de mRNA de vários marcadores com respetiva sobre-expressão no sangue venoso, sangue menstrual, saliva, sêmen e secreções vaginais, trabalhos recentes têm-se centrado no aperfeiçoamento destes marcadores de mRNA para aumentar a sensibilidade ou resistência à degradação, ou no desenvolvimento de ensaios *multiplex* para permitir testes em paralelo de vários marcadores de mRNA em quantidades diminutas de amostra (Visser *et al*, 2011).

Em 2000, Ishida *et al* desenvolveram uma abordagem para a transcrição reversa quantitativa RT-PCR de mRNA utilizando a metodologia fluorescente *TaqMan*, em material de autópsia. A apoproteína A surfactante pulmonar (SP-A) do mRNA foi quantificada em tempo real, a partir de um pulmão de cadáver. A SP-A e uma referência endógena de gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) foram amplificadas no mesmo tubo. Este ensaio teve uma alta reprodutibilidade e discriminação mesmo em materiais de autópsia forense até 96 horas *post-mortem*. Os autores chegaram a conclusão que este sistema sem manipulação pós-PCR da amostra seria uma ferramenta muito útil no diagnóstico patológico e análise de DNA forense.

Becker *et al* em 2003, realizaram um estudo em que foi estabelecido um ensaio real-time PCR com transcriptase reversa para quantificar os níveis de mRNA do recetor μ -opioid humano (MOR1) em tecido de cérebro de autópsia humana o que veio a provar a utilidade do mRNA, conjuntamente com a real-time PCR, na área forense. O método descrito por estes autores será útil noutros estudos sobre os

níveis de RNAm, em estado estacionário, no cérebro de viciados que morreram devido a uma sobredosagem de opiáceos, de modo a elucidar se o abuso de opiáceos crônico é acompanhado por uma regulação da expressão do recetor μ -opioid.

Visser *et al*, 2011 identificaram, através da base de dados completas e pesquisas de literatura, em combinação com testes laboratoriais empíricos de marcadores candidatos, um conjunto de mRNAs que são altamente sobre-expressos em células epiteliais da pele em relação a outros tipos de células de relevância forense, e realizaram testes apropriados para descrever a sensibilidade dos ensaios desenvolvidos e da estabilidade em termos de tempo dos marcadores propostos. Apresentaram uma abordagem ao mRNA altamente específica e sensível para identificação de pele em futuras aplicações em análises forenses em que todos os genes candidatos foram examinados experimentalmente através da real-time PCR em amostras de pele, assim como numa variedade de fluidos corporais relevantes a nível forense, tais como sangue, sangue menstrual, sêmen, saliva e secreções vaginais, para os níveis detetáveis de expressão. Este estudo não só proporcionou marcadores de mRNA adequados para a identificação de células de pele, incluindo quantidades mínimas de material de pele, mas também contribuiu para o estudo do mRNA, utilizando uma metodologia *multiplex* adequada para aplicações forenses como a qPCR, futuramente adequados para a determinação fiável de todos os tipos celulares normalmente encontradas em amostras forenses, incluindo a pele.

2.7 Análise HRM:

Em 2005 Palais *et al*, constataram que a análise *high resolution melting* da real-time PCR pode detetar mutações heterozigóticas e na maioria mutações homozigóticas, no entanto, alguns SNPs têm curvas de *melting* idênticas à do tipo selvagem. Desenvolveram então um ensaio, em que DNA de um genótipo de referência conhecida foi adicionado a cada amostra desconhecida antes da PCR. Como resultado a análise quantitativa heteroduplex diferenciou genótipos heterozigóticos, homozigótica, e do tipo selvagem. Concluíram que nestes casos a utilização da real-time PCR seguida por análise HRM permite uma perfeita genotipagem de SNPs. Este estudo demonstra que a análise HRM é atraente como um método de tubo fechado que permite tanto a genotipagem para qualquer variante da sequência e genotipagem específica sem sondas (Palais *et al*, 2005).

Na publicação de 2007 de Reed *et al*, com base num estudo de revisão, foi descrito que em alguns casos, a genotipagem completa do DNA alvo é menos importante do que determinar se as sequências de DNA correspondem. Este cenário ocorre em medicina forense, ou seja, o conhecimento da sequência do genótipo não é necessário, mas a identidade da sequência é. Por exemplo, no transplante de órgãos, irmãos estão geralmente genotipados para HLA para se obter a melhor histocompatibilidade, no entanto o que é realmente importante é o de encontrar um irmão compatível, isto é, uma identidade da sequência HLA. A identificação da sequência HLA (correspondência/matching) por HRM foi demonstrada usando *locus* HLA-A altamente polimórficos em todos os casos de alelos partilhados entre dois indivíduos.

A análise convencional da curva de *melting* é realizada após a PCR em tempo real em qualquer instrumento para monitorizar a pureza do produto (corantes dsDNA) e de sequências (sondas de hibridação). Avanços recentes incluem instrumentos de alta resolução e corantes saturantes de DNA que distinguem muitas espécies diferentes. Por exemplo, a verificação de mutações (identificação de heterozigotos) por meio de análise HRM é em sistema de tubo fechado e

possui sensibilidade e especificidade semelhante ou superior a métodos que requerem a separação física (Erali *et al*, 2008).

Segundo o estudo feito por Erali *et al*, 2008, com a HRM, SNPs podem ser genotipados sem sondas e regiões mais complexas podem ser genotipadas com sondas de hibridização sem marcação. HLA com *loci* altamente polimórficos podem ser sujeitos a uma análise HRM para estabelecer a identidade de sequências para correspondência em transplantes. Genotipagem simultânea com uma ou mais sondas não marcadas e verificação de mutação do amplicão inteiro podem ser realizadas ao mesmo tempo, no mesmo tubo, diminuindo ou eliminando a necessidade de resequenciação da análise genética. Análise HRM do produto de PCR é homogêneo, em sistema de tubo fechado, rápida (1-5 min), não destrutiva e não requer sondas covalentemente marcadas com fluorescentes. HRM permite nitidamente um estudo aprofundado de SNPs, o que se torna deveras interessante em aplicações forenses.

Dobrowolski *et al* em 2009, aplicaram a análise HRM numa avaliação completa do genoma mitocondrial e avaliação específica de mutações reconhecidas. Desenvolveram um ensaio com uma cobertura completa do genoma mitocondrial, utilizando 36 fragmentos de sobreposição (301-658 pb), empregando um protocolo de PCR. Estes ensaios utilizam uma estratégia calibrada baseada em amplicões que é extremamente simples na sua concepção, utilização e interpretação, e ainda oferece a sensibilidade para detetar variantes com uma heteroplasmia de 10% e abaixo. Tempo de resposta para os testes de genotipagem é muito baixo, tornando-se claramente numa vantagem. Variação no mtDNA é amplamente utilizada em aplicações forenses e o método HRM vai com certeza simplificar a análise do mtDNA.

Gidlöf *et al* em 2009, relataram um ensaio para a discriminação de DNA entre indivíduos diferentes com base na análise HRM das duas regiões hipervariáveis HVI e HVII do genoma mitocondrial. Ao distinguir claramente as curvas de *melting* do DNA de seis indivíduos diferentes, os autores concluíram que este ensaio tem

o potencial essencial para funcionar como um método rápido e barato para a pré-triagem de amostras forenses antes da sequenciação do DNA. Análise HRM representa um método de triagem simples e de baixo custo para a detecção de variação genética dentro de amplicões de PCR. Uma vez que a amplificação por PCR é uma parte necessária da análise de amostras forenses de DNA, um ensaio com pré-rastreio por HRM pode ser facilmente integrado na rotina laboratorial. Usando HRM, um grande número de amostras da cena do crime pode ser rastreado simultaneamente, para a identificação de amostras de interesse, e posterior sequenciação de DNA.

CAPITULO 3 Conclusões e Considerações Finais

As aplicações da Biologia Molecular no laboratório forense centralizam-se, em grande parte, na capacidade de análise do DNA em identificar um indivíduo a partir de cabelos, manchas de sangue, fluidos corporais, entre outros itens recuperados no local do crime/acidente/catástrofe. O estudo do DNA para finalidades forenses baseia-se nos mesmos princípios fundamentais e usa as mesmas técnicas que são rotineiramente empregadas numa ampla variedade de situações médicas e genéticas, tais como o diagnóstico e o mapeamento genético. Com uma incrível sensibilidade e poder de discriminação, a análise de DNA tem sido a “figura-chave” e promete grandes progressos no campo da ciência forense e por possuir um alto poder de discriminação, a análise do DNA tem fornecido aos investigadores uma grande oportunidade de excluir suspeitos que não estão relacionados à investigação em questão. Nas últimas décadas, muitas técnicas foram desenvolvidas com o objectivo de identificação genética precisa de indivíduos. Dentre elas, as mais significativas são então a RFLP, VNTR, PCR, STR e SNP.

Na presente revisão bibliográfica foi dada ênfase à técnica PCR, nomeadamente à real-time PCR. Dado por concluído este estudo são várias as ilações que podemos tirar desta revisão bibliográfica em relação à real-time PCR e suas aplicações forenses.

Primeiramente será de suma importância referir as vantagens da real-time sobre a PCR convencional, sendo uma das principais vantagens, a PCR em tempo real permitir determinar o número de cópias a partir de uma amostra de DNA *template* com precisão e alta sensibilidade numa ampla faixa dinâmica. Os resultados da PCR em tempo real podem ser qualitativos (presença ou ausência de uma sequência) ou quantitativos (número de cópias de DNA). PCR em tempo real, que é quantitativa também é conhecido como qPCR, em contraste, a PCR convencional é na melhor das hipóteses semiquantitativa, além disso, os dados de PCR em tempo real podem ser avaliados sem eletroforese em gel de agarose,

resultando em tempo de experiência reduzido e maior produtividade. Finalmente, porque as reações são executadas e os dados são avaliados num sistema de tubo fechado, as oportunidades para a contaminação são reduzidos e a necessidade de manipulação de pós-amplificação é eliminado.

E é exatamente a questão da contaminação que nos remete para uma outra, o problema dos inibidores da PCR. Esses inibidores podem estar presentes em amostras de DNA recolhidas em cenas de crime, como por exemplo fluidos corporais, tal como sangue e sêmen, solo, areia, madeira, ou folhas que contêm substâncias que podem ser coextraídas com o DNA e inibir a amplificação por PCR. Corantes têxteis, couro e superfícies de madeira também podem conter inibidores da DNA polimerase. Os inibidores podem interferir com a lise das células necessárias para a extração do DNA, degradação dos ácidos nucleicos, e podem inibir a atividade da DNA polimerase impedindo assim a amplificação do DNA alvo. Ocasionalmente tais substâncias, como corantes têxteis de vestuário ou hemoglobina dos glóbulos vermelhos, podem permanecer com o DNA durante o processo de preparação da amostra e interferir com a DNA polimerase, para evitar a amplificação da PCR com êxito.

Potenciais inibidores da *Taq* polimerase incluem compostos *heme* provenientes do sangue, sais biliares e os polissacarídeos complexos a partir de fezes e material vegetal, substâncias húmicas de solo, que é comumente coextraído dos ossos, ureia, a melanina de pele e do cabelo. Colagénio de tecidos e ossos, concentrações altas de iões, em especial cálcio e magnésio, EDTA que é utilizado em altas concentrações para o isolamento de DNA de ossos, também inibem a PCR (Goodwin *et al*, 2011).

O resultado da amplificação de uma amostra de DNA que contém um inibidor, tal como hematina, é uma perda dos alelos (*dropout* alelica) dos *loci* de STR de tamanho maior ou mesmo completa falha de todos os *loci*. Amostras contendo inibidores de PCR muitas vezes produzem resultados de perfis parciais que se parecem com uma amostra de DNA degradado. Assim, a não amplificação dos *loci* STR de uma amostra, pode ser, quer devido a DNA degradado, em que não

há um número suficiente de cópias intactas do *template* de DNA, quer devido à presença de um nível suficiente de inibidores da PCR, que reduz a atividade da DNA polimerase (Butler, 2011).

No desenvolvimento da revisão bibliográfica, pôde-se constatar a aplicabilidade da real-time PCR na detecção de inibidores da PCR, muito comuns em investigações forenses. Juntamente com a introdução de controlos positivos internos (IPC) é possível prevenir e detetar a presença de inibidores da PCR. Os IPCs podem ser *primers* desenhados artificialmente para amplificar especificamente DNA não humano, utilizando uma sonda adicional que emite um sinal fluorescente distinto, permitindo assim monitorizar a presença de inibidores da PCR. (Green *et al*, 2005; Ricci *et al*, 2006; Costello & Schumm, 2006; Niederstatter *et al*, 2007; Whittle & Sumita, 2008; Fregel *et al*, 2011; Soejima *et al*, 2011). Em casos impossíveis de remover os inibidores da PCR, a monitorização de um controle interno positivo (IPC) em ensaios de qPCR utilizados para quantificação de DNA, pode pelo menos fazer um analista ciente de que os inibidores da PCR estão presentes (Butler, 2011).

Será também fácil compreender, que uma amostra que não apresente bons resultados terá de ser de novo analisada, ou seja, terá de ser de novo realizado todo o processo, desde a extração até à obtenção de novos resultados, o que terá uma implicação no orçamento do laboratório e no tempo da análise. A quantificação assegura, assim, também estes aspetos, indicando, desde o início, se a quantidade de DNA é a ideal para análise subsequente.

A quantificação do DNA humano tornou-se uma análise essencial para garantir a qualidade dos estudos com base na real-time PCR, realizados a partir de amostras com baixo número de cópias e/ou amostras de DNA altamente degradado que são analisadas com frequência em investigações forenses, incluindo estudos de DNA antigo ou genética forense.

A PCR em tempo real demonstrou ser um método altamente sensível e específico, tanto para a quantificação do nDNA e mtDNA, como na determinação do sexo de amostras ósseas forenses, através da quantificação do gene AMG.

Foi demonstrada a utilidade de PCR em tempo real para a quantificação do DNA do cromossoma Y, mtDNA e nDNA recuperados de restos humanos antigos, muito útil na identificação de pessoas desaparecidas. A possibilidade de quantificação de mtDNA pela real-time PCR, tornou-se rotina em biologia forense uma vez que tem certas características que o tornam desejável para análise forense, ou seja, elevado número de cópias, a falta de recombinação e herança matrilinear, sendo usado para analisar ossos antigos, dentes, fios de cabelo, saliva, manchas de sangue, secreções vaginais e amostras de sémen, e outras amostras biológicas, onde o conteúdo de nDNA é baixo. A real-time PCR foi também utilizada para determinar a quantidade de nDNA e mtDNA nos pelos do corpo e nas células epiteliais recuperadas de acessórios (por exemplo, anéis, relógios, colares/pulseiras, óculos, brincos) e em impressões digitais. O uso da quantificação de DNA em tempo real, revelou várias percepções importantes sobre o teor de DNA em vários materiais forenses. Informações relativas à variação inter e intraindividual, variação no teor de DNA dentro de cabelos arrancados e caídos em comprimentos diferentes, o teor de DNA médio em diferentes tipos de cabelos, bem como em outros materiais, são altamente informativos para o design inteligente em aplicações forenses (Andreasson *et al.*, 2002; Budowle *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2004; Schlenk *et al.*, 2004; Timken *et al.*, 2005; Andréasson *et al.*, 2006; Anwar *et al.*, 2006; Ricci *et al.*, 2006; Niederstatter *et al.*, 2007; Whittle & Sumita, 2008; Coble *et al.*, 2009; Fregel *et al.*, 2011). Real-Time PCR é uma abordagem muito atraente para a quantificação absoluta de um template de DNA amplificável em amostras desconhecidas (Niederstatter *et al.*, 2007).

Foi também demonstrado que a real-time PCR permite a genotipagem de SNPs e STRs (Palais *et al.*, 2005; Timken *et al.*, 2005), o que torna a real-time PCR numa ferramenta valiosa em aplicações forenses, uma vez que estes polimorfismos são de extrema importância na análise de amostras degradadas ou com um baixo número de cópias de DNA (Alonso *et al.* 2003; Niederstatter *et al.*, 2006; Budowle & Daal, 2008) podendo ser utilizados na identificação humana (Vallone *et al.*, 2004; Green, 2005; Coble *et al.*, 2009; Butler, 2007). Além disso, a quantificação

de SNPs pela real-time PCR é também uma vantagem desta técnica, uma vez que está implicada em vários estudos forenses, como na definição de cromossoma Y e haplogrupos do mtDNA e na análise da origem geográfica de amostras (Sobrino *et al*, 2005; Pontes & Pinheiro, 2008; Malmstrom *et al*, 2009).

Assim como os SNPs, os STRs, trouxeram uma revolução nas investigações forenses. Utilizando a real-time PCR, os analistas são agora capazes de trabalhar rotineiramente perto dos limites máximos de sensibilidade e poder discriminatório em genotipagem de amostras forenses. Os métodos de genotipagem STR mais poderosos utilizam a real-time PCR para amplificar o *locus* alvo, permitindo a recolha de informação precisa do genótipo a partir de quantidades mínimas de DNA (Alonso *et al*, 2003; Green, 2005; Coble *et al*, 2009).

Com base na observação de que a deleção de 4977 pb do mtDNA acumula em tecidos pós-mitóticas com o avanço da idade, esta deleção foi proposto para ser utilizado como um relógio molecular forense. A utilização da real-time PCR quantitativa foi capaz de detetar e quantificar a dmtDNA. Foi demonstrada claramente a viabilidade de utilização de ensaios quantitativos em amostras forenses, como esta deleção do mtDNA, como um resultado da degradação do DNA. Conclui-se igualmente que o método pode também ser adequado para determinar a proporção da dmtDNA para estimar a idade de um indivíduo numa abordagem forense ou para investigar a relação entre o mtDNA mutado e as doenças específicas sob aspetos patológicos (Wurmb-Schwark *et al*, 2002; Wu & Csako, 2006; Schwark *et al*, 2006; Wurmb-Schwark *et al*, 2006).

Além do DNA, o RNA também foi explorado para aplicações forenses. Usando RT-PCR quantitativa em tempo real, a quantidade de surfactante pulmonar apoproteína A do mRNA foi medida e usada para evidenciar desconforto respiratório como causa de morte. Numa outra aplicação o ensaio RT-PCR, em tempo real, foi utilizado para quantificar os níveis de mRNA do recetor opioide humano com potencial para estabelecer a causa toxicológica da morte. Outro estudo com a RT-PCR quantitativa em tempo real proporcionou não só marcadores de mRNA adequados para a identificação de células de pele,

incluindo quantidades mínimas de material de pele, como também contribuiu para o estudo do mRNA, utilizando uma metodologia multiplex adequada para aplicações forenses como a qPCR (Ishida *et al*, 2000; Becker *et al*, 2003; Wu & Csako, 2006; Visser *et al*, 2011).

A possibilidade de efetuar *multiplex* é também uma vantagem que a real-time PCR oferece em investigações forenses, o que foi claramente evidenciado ao longo da presente revisão bibliográfica, uma vez que uma maioria de autores desenvolveram ensaios *multiplex* (Andréasson *et al*, 2002; Alonso *et al*, 2003; Nicklas & Buel, 2003; Alonso *et al*, 2004; Schlenk *et al*, 2004; Vallone *et al*, 2004; Timken *et al*, 2005; Andréasson *et al*, 2006; Wu & Csako, 2006; Butler, 2007; Niederstatter *et al*, 2007; Whittle & Sumita, 2008; Coble *et al*, 2009; Fregel *et al*, 2011)

Atualmente, é possível amplificar e quantificar até cinco alvos num único tubo, dependendo das características do equipamento de PCR em tempo real. *Multiplex* confere as seguintes vantagens sobre reações *singleplex*:

- Redução da quantidade de *template* inicial necessário, o que é importante quando a quantidade de material inicial é limitada
- Redução de falsos negativos, se a amostra controlo é amplificada dentro de cada amostra
- Aumento da taxa de transferência de laboratório com uma concomitante redução nos custos de reagentes
- Minimização da manipulação da amostra e oportunidades associadas a contaminação laboratorial (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

A aplicação da análise HRM na técnica de real-time PCR, mostrou algumas vantagens que tornam a análise HRM um bom previsor da zigosidade, detetor de mutações heterozigóticas e na maioria mutações homozigóticas, genotipagem de SNPs, análise do mtDNA, mostrando assim algum potencial para funcionar como um método rápido e barato para a pré-triagem de amostras de DNA forenses, bem como o facto de poder vir a ser útil na identificação de indivíduos (Palais *et al*, 2005; Reed *et al*, 2007; Erali *et al*, 2008; Dobrowolski *et al*, 2009; Gidlöf *et al*,

2009). No entanto, o facto de existirem apenas algumas publicações acerca desta técnica na área forense, coloca alguma reticência. Apesar disso, não restam dúvidas que esta técnica em poucos trabalhos ou publicações demonstrou uma grande utilidade no que toca a aplicações forenses.

Como perspectivas futuras, por exemplo, a avaliação do mRNA através de PCR em tempo real é uma técnica que pode oferecer um nível de confiança e expandir o conhecimento alheio dos materiais que rotineiramente são examinados, e juntamente com o poder de *multiplex* por real-time PCR para análise forense e a análise HRM, poderá vir a ser muito útil para uma otimização do fluxo de trabalho e viabilidade de automatização, assim sendo, uma hipótese seria a implementação destes métodos em todos os laboratórios forenses, adicionalmente às comuns análises forenses do mtDNA e nDNA e respetivos polimorfismos.

A aplicação da análise de DNA no laboratório forense tem sido um grande benefício para a comunidade da justiça criminal e ciências forenses, e a pesquisa forense utilizando a PCR em tempo real visa encontrar métodos mais rápidos e mais eficientes que funcionem perfeitamente em amostras forenses de DNA. O objetivo é desenvolver métodos que ampliem as aplicações da PCR em tempo real e investigar novas tecnologias que possam mudar radicalmente a análise de amostras forenses.

CAPITULO 4 Referências Bibliográficas

Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., Simón, L. F. d., Garcia-Hirschfeld, J., Sancho, M., d. I. 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, 141-149.

Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., Primorac, D., Simón, L. F. d., Garcia-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.

Andréasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-Time DNA Quantification of Nuclear and Mitochondrial DNA in Forensic Analysis. *BioTechniques*, 33, 402-411.

Andréasson, H., Nilsson, M., Budowle, B., Lundberg, H., & Allen, M. (2006). Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International*, 164, 56-64.

Anwar, N., Goodman, M., Hulme, P., Elsmore, P., Greenhalgh, M., & McKeown, B. (2006). Amelogenin as a target for real time PCR quantitation of forensic templates. *International Congress(1288)*, 768-770.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic Principles of real-time quantitative PCR. *Rev. Mol. Diagn.*, 5(2), 209-219.

Becker, J., Schmidt, P., Fitzenreiter, M., Musshoff, F., & Madea, B. (2003). The regional pattern of u-opioid receptor (MOR1) mRNA in human brain: a real-time PCR assay. *International Congress(1239)*, 737-739.

Bio-Rad Laboratories, I. (2006). *Real-Time PCR Application Guide*.

- Budowle, B., Allard, M., R. Wilson, M., & Chakraborty, R. (2003). FORENSICS AND MITOCHONDRIAL DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 4(1), 19-41.
- Budowle, B., & Daal, A. v. (2008). Forensically relevant SNP classes. *BioTechniques*, 44, 603-610.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA Typing* (2 ed.): Elsevier, 241-255.
- Butler, J. M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques* (43), Sii-Sv.
- Butler, J. M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier, 55-85, 371-444.
- Carracedo, A. (2005). *Methods in Molecular Biology - Forensic DNA Typing Protocols* (Vol. 297): Humana Press.
- Coble, M. D., Just, R. S., O'Callaghan, J. E., Letmanyi, I. H., Peterson, C. T., Irwin, J. A., & Parsons, T. J. (2004). Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med*, 118, 137-146.
- Coble, M. D., Loreille, O. M., Wadhams, M. J., Edson, S. M., Maynard, K., Meyer, C. E., Niederstatter, H., Berger, C., Berger, B., Falsetti, A. B., Gill, P., Parson, W., Finelli, L. N. (2009). Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *PLoS ONE*, 4(3).
- 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 AmpF_STRR_IdentifierR_PCR Amplification Kit. *J Forensic Sci*, 49(6).
- Costello, M. T., & Schumm, J. W. (2006). A single assay for human-specific quantification of less 1 pg DNA and detection of the presence of PCR inhibitors in forensic samples. *International Congress(1288)*, 753-755.

Dobrowolski, S. F., Gray, J., Miller, T., & Sears, M. (2009). Identifying Sequence Variants in the Human Mitochondrial Genome Using High Resolution Melt (HRM) Profiling. *Human Genome Variation Society*.

Dolinsky, L. C., & Pereira, L. M. C. V. (2007). DNA Forense - Artigo de Revisão. *Saude & Ambiente em Revista, 2(2)*, 11-22.

Erali, M., Voelkerding, K. V., & Wittwer, C. T. (2008). High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. *Exp Mol Pathol, 85(1)*, 50-58.

Fregel, R., Almeida, M., Betancor, E., Suárez, N. M., & Pestano, J. (2011). Reliable nuclear and mitochondrial DNA quantification for low copy number and degraded forensic samples. *Forensic Science International, Genetics Supplement Series 3*, 303-304.

Gidlöf, O., Burvall, S., Edvinsson, L., Montelius, M., Allen, M., & Molin, M. (2009). Complete discrimination of six individuals based on high-resolution melting of hypervariable regions I and II of the mitochondrial genome. *Biotechniques., 47(2)*, 671-672, 674, 676.

Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics* (1 ed.): Wiley. John Wiley & Sons, Ltd.

Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An introduction to Forensic Genetics* (2 ed.): Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Ltd.

Green, R. L., Roinestad, I. C., Boland, C., & Hennessy, L. K. (2005). Developmental Validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. *J Forensic Sci, 50(4)*.

Gunn, A. (2009). *Essential Forensic Biology* (2 ed.): Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Ltd., 112-114.

Hanawalt, P. C. (2004). Density matters: The semiconservative replication of DNA. *The National Academy of Sciences of the USA, 101(52)*, 17889-17894.

- Holland, M. M., & Parsons, T. J. (1999). Mitochondrial DNA Sequence Analysis - Validation and Use for Forensic Casework. *Forensic Science Review*, 11(1).
- Ihrig, J., Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2006). Application of the DNA-specific dye EvaGreen for the routine quantification of DNA in microplates. *Analytical Biochemistry*(359), 265-267.
- Ishida, K., Bao-Li Zhu, & Maeda, H. (2000). Novel approach to quantitative reverse transcription PCR assay of mRNA component in autopsy material using the TaqMan fluorogenic detection system: dynamics of pulmonary surfactant apoprotein A. *Forensic Science International*, 113(1-3), 127-131.
- Koch, A., & Andrade, F. M. (2008). A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. *RBAC*, 40(1), 17-23.
- Komar, A. A. (2009). *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols* (2 ed. Vol. 578): Humana Press, 3.
- Kumar, V. (2011). *Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das doenças* (8 ed.): Elsevier Health Sciences.
- Lewis, R. (2011). *Human Genetics - The basics* (1 ed.). Taylor & Francis e-Library: Routledge, 4-16.
- Malmstrom, H., Gilbert, M. T. P., Thomas, M. G., Brandstrom, M., Stora, J., Molnar, P., Andersen, P. K., Bendixen, C., Holmlund, G., Gotherstrom, A., Willerslev, E. (2009). Ancient DNA Reveals Lack of Continuity between Neolithic Hunter-Gatherers and Contemporary Scandinavians. *Current Biology*, 19, 1758-1762.
- Nicklas, J. A., & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Anal Bioanal Chem*(376), 1160-1167.
- Niederstätter, H., Coble, M. D., Grubwieser, P., Parsons, T. J., & Parson, W. (2006). Characterization of mtDNA SNP typing and mixture ratio assessment with

simultaneous real-time PCR quantification of both allelic states. *Int J Leg Med*, 120, 18-23.

Niederstatter, H., Kochl, S., Grubwieser, P., Pavlic, M., Steinlechner, M., & Parson, W. (2007). A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA. *Forensic Science International, Genetics* 1, 29-34.

Nussbaum, R. (2008). *Thompson & Thompson Genética Médica* (7 ed.): Elsevier Health Sciences.

Palais, R. A., Liew, M. A., & Wittwer, C. T. (2005). Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Analytical Biochemistry*(346), 167-175.

Pena, S. D. J. (2009). O DNA como (Única) Testemunha em Determinação de Paternidade. *Revista Bioética*, 5(2).

Petkovski, E., Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E., Hienne, R., & Ludes, B. (2006). MALDI-TOF MS analysis of Y-SNPs in ancient samples. *International Congress*(1288), 25-27.

Pontes, M. L., & Pinheiro, M. F. (2008). Y-SNPs analysis using two different approaches in a Northern Portugal male population sample. *Forensic Science International*(1), 192-194.

Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High resolution melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597-608.

Regateiro, F. J. (2007). *Manual de Genética Médica*: Imprensa da Universidade de Coimbra.

Ricci, U., Marchi, C., Previderè, C., & Fattorini, P. (2006). Quantification of human DNA by real-time PCR in forensic casework. *International Congress Series*, 1288, 750-752.

Schlenk, J., Seidl, S., Braunschweiger, G., Betz, P., & Lederer, T. (2004). Development of a 13-locus PCR multiplex system for paternity testing. *Int J Legal Med*(118), 55-61.

Schnerr, H., Niessen, L., & Vogel, R. F. (2001). Real time detection of the tri5 gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR®Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 53-61.

Schwark, T., Fisch-Kohl, C., & Wurmb-Schwark, N. v. (2006). A novel method to quantify deleted mitochondrial. *International Congress*(1288), 756-758.

Sobrino, B., Brión, M., & Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154, 181-194.

Soejima, M., Hiroshige, K., Yoshimoto, J., & Koda, Y. (2011). Selective quantification of human DNA by real-time PCR of FOXP2. *Forensic Science International*.

Symeonidou, I.-E., Taraviras, S., & Lygerou, Z. (2012). Control over DNA replication in time and space. *FEBS Letters* 586(586), 2803-2812.

Timken, M. D., Swango, K. L., Orrego, C., & Buoncristiani, M. R. (2005). A Duplex Real-Time qPCR Assay for the Quantification of Human Nuclear and Mitochondrial DNA in Forensic Samples: Implications for Quantifying DNA in Degraded Samples. *Forensic Science International*, 50(5).

Vallone, P. M., Just, R. S., Coble, M. D., Buttler, J. M., & Parsons, T. J. (2004). A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Leg Med*(118), 147-157.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR gene expression analysis. *BioTechniques*, 44, 619-626.

Visser, M., Zubakov, D., Ballantyne, K. N., & Kayser, M. (2011). mRNA-based skin identification for forensic applications. *Int J Legal Med*, 125, 253-263.

Westermeier, R. (2005). *Electrophoresis in Practice* (4 ed.): Wiley-Vch Verlag GmbH & Co., 17-20.

Whittle, M. R., & Sumita, D. R. (2008). Quadruplex real-time PCR for forensic DNA quantitation. *Forensic Science International, Supplement Series 1*, 86-88.

Wittwer, C. T. (2009). High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. *Human Mutation - Human Genome Variation Society*, 30, 857-859.

Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6), 853-860.

Wu, Y. Y., & Csako, G. (2006). Rapid and/or high-throughput genotyping for human red blood cell, platelet and leukocyte antigens, and forensic applications. *Clinica Chimica*(363), 165 - 176.

Wurmb-Schwark, N. v., Bosinski, H., & Ritz-Timme, S. (2006). What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis? *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 14(1), 27-30.

Wurmb-Schwark, N. v., Higuchi, R., Fenech, A. P., Elfstroem, C., Meissner, C., Oehmichen, M., & Cortopassi, G. S. (2002). Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic Science International*(126), 34-39.

Wurmb-Schwark, N. v., Jelkmann, I., Bruhn, H. D., & Oehmichen, M. (2006). Variability of mitochondrial DNA mutagenesis in human blood. *International Congress*(1288), 112-114.

ANEXOS

Anexo 1

QUANTIFICAÇÃO

Qubit:

- Pipetas 10-100 μ l e 100-1000 μ l
 - Pontas Amarelas e Azuis
 - 2 Reagentes STD1 e STD2 e 1 Tampão
-
- Identificar os Tubos de quantificação Qubit (STD1, STD2 e Amostra x)
 - Centrifugar a amostra a 16000 rpm durante 2 minutos
-
- 190 μ l de tampão para cada Tubo
 - 10 μ l de Reagente 1, Reagente 2 e Amostra x nos tubos STD1, STD2 e Amostra x, respetivamente
- 200 μ l Mix (diluição de 1:20 da amostra)

Amostra= 49,7 ng/ml na diluição de 1:20

Em 10 μ l de amostra= 0,994 μ g/ml

TEMPERATURA DE MELTING E TEMPERATURA DE ANNEALING

Primer 9824

9824 F ->5' TTTTGTAGCCACAGGCTTCC 3'

9824 R ->5' GAGGAAAGTTGAGCCAATAATGA 3'

TM: Cálculo da Temperatura de Melting

$4^{\circ}\text{C} (\text{C}+\text{G}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{A}+\text{T})$

TM pf = 52 °C

TM pr = 52,1 °C

TA: Cálculo da Temperatura de Annealing

$\text{TM} - 8^{\circ}\text{C} = \text{TA}$

$52^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C} = 44^{\circ}\text{C}$

(Real-Time Software: Tools -> TA calculate)

DILUIÇÕES E REAL-TIME PCR

- Retirar tubos do congelador
 - EvaGreen (protocolo EvaGreen: Anexo 2)
 - Amostra
 - Primers
- LAYOUT da microplaca:

B	ND	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
B	ND	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
B	ND	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵

- Descongelar amostra e centrifugar a 14000 rpm durante 2 minutos
- Quantidade de Reagentes:

10 µl de EvaGreen x 25 = 250 µl

1 ul Primer F x 25 = 25 µl

1 ul Primer R x 25 = 25 µl

7 µl de H₂O x 25 = 175 µl

19 µl de Reagentes (Mix) + 1 µl de DNA em cada Tubo

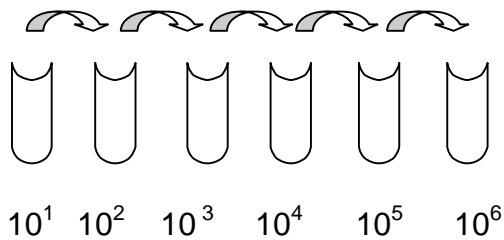
- Levar todo o material para a sala de esterilização

- 23 Tubos de Microplaca
- 6 Tubos de diluições + 6 Tubos extra
- 2 Tubos grandes (1 para Mix e 1 extra)
- Alíquota de H₂O para PCR
- 1 Microseal
- Luvas Latex

Câmara de Esterilização durante 20 minutos

- Colocar máscara
- Colocar os Reagentes e amostras do lado da câmara de esterilização
- Levantar a tampa e colocar as luvas
- Distribuir H₂O pelo tubo do Mix e pelos tubos de diluição

- Fazer o Mix
 - EvaGreen
 - Primer F
 - Primer R
 - Levar ao vórtex
- Fazer as diluições
 - Diluições:



1 µl de DNA + 9 µl de H₂O no tubo 1: C=10¹

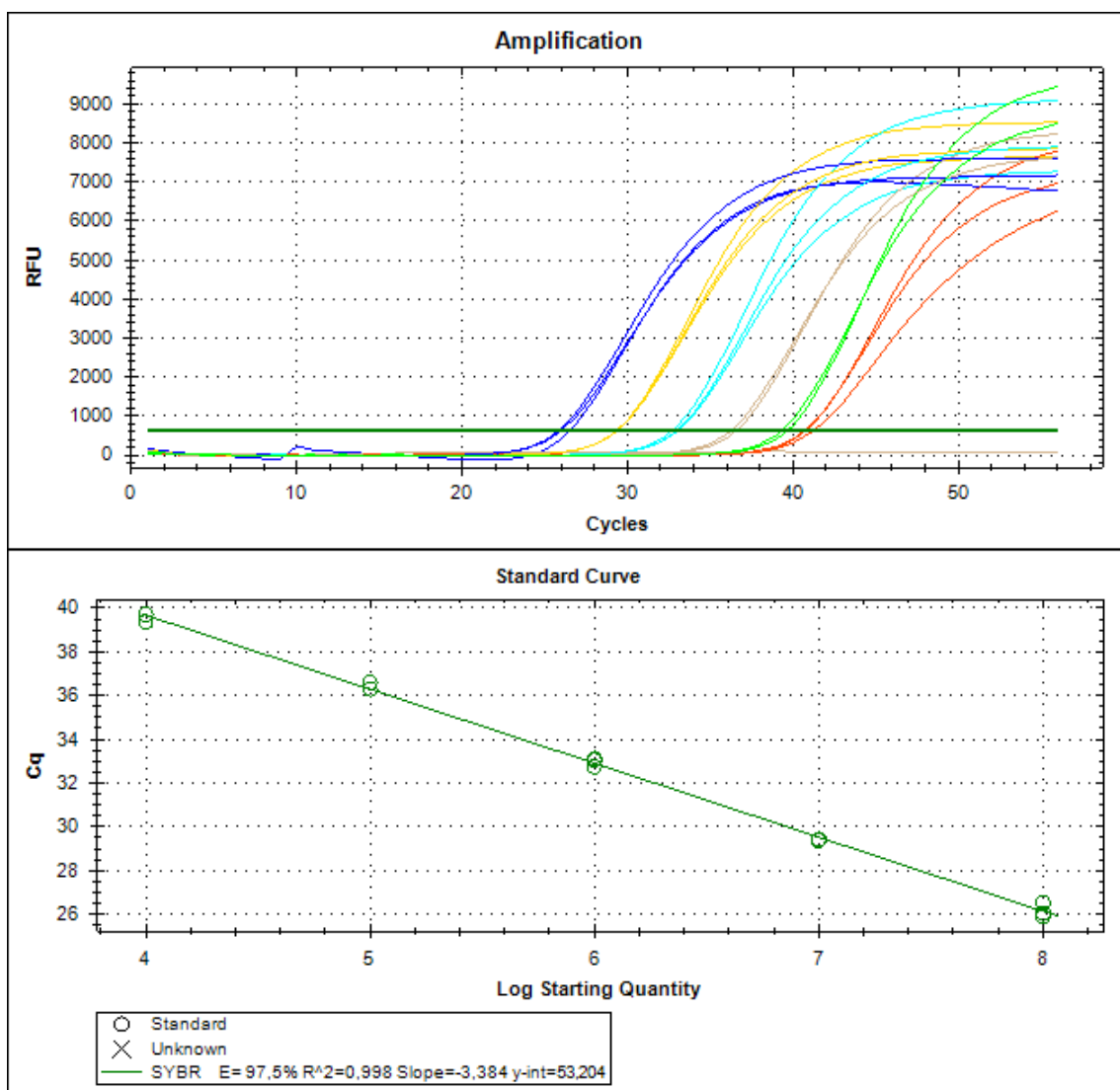
Antes da transferência de 1 µl de tubo para tubo colocar 9 µl de H₂O em todos os tubos de diluição.

- Distribuir as soluções e reagentes pelos poços da Microplaca
 - 19 µl de Mix em cada poço
 - 1 µl de DNA original (Não Diluído-ND) nos poços ND
 - 1 µl de H₂O nos poços B (Tubo Branco- sem amostra)
 - 1 µl de cada diluição em cada poço correspondente
- Colocar o microseal
- Levar a microplaca para a sala da Real-Time PCR
- Colocar a placa no termociclador
- Programar a Real-Time PCR de acordo com o protocolo EvaGreen
 - 98°C – 2min
 - 98°C – 5seg
 - 56°C – 10seg
 - X 40 ciclos
 - 65°C com um aumento de 0.5°C num intervalo de 5seg até aos 95°C
- Correr as amostras

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspetos diferentes devem ser tidos em conta para determinar qual a tecnologia mais adequada para fins forenses, tais como a sensibilidade, a reprodutibilidade, a precisão, a capacidade de multiplex e do nível de transferência. Também é importante ter em mente a flexibilidade da tecnologia, o tempo de consumo e do custo, considerando-se ambos os equipamentos necessários e o custo por genótipo (Sobrino, B. *et al.*, 2005).

Na Figura está representada uma corrida de várias diluições de uma amostra



conhecida e respetiva curva padrão, indicando resultados muito exatos e precisos: $E = 97,5\%$; $R^2 = 0,998$; $Slope = -3,384$

As características de um ensaio qPCR otimizado são uma curva padrão linear ($R^2 > 0,980$ ou $r > | -0,990 |$), alta eficiência de amplificação (90-105%), coerência entre reações idênticas, ou seja, espaços idênticos entre cada curva de amplificação (uma inclinação ótima da curva padrão seria -3,32). Os resultados apresentam uma boa qualidade em termos de precisão e exatidão, portanto agora esta curva padrão irá ser utilizada para estudar amostras conhecidas e por isso espera-se que os resultados sejam coincidentes com pontos dentro da reta para poder caracterizar novas, e desconhecidas, amostras.

Anexo 2

SsoFast™ EvaGreen® Control Assay Instructions

About the Assay

The SsoFast EvaGreen control assay is a pre-designed kit for training new users on real-time PCR or verifying the performance of your real-time PCR system.

- Demonstrates a broad dynamic range from 10^2 to 10^8 copies
- Validated for use on the CFX96™, CFX384™, MiniOpticon™, and MyiQ™2 real-time PCR detection systems
- Includes instructions for setting up a dilution series to create a standard curve

Storage and Stability

Store at -20°C . After thawing, remaining stock reagents may be stored at 4°C for up to 6 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Unused master mix and template DNA dilutions should be discarded.

Kit Contents

The SsoFast EvaGreen control assay includes enough reagents to run the dilution series three times (Table 1).

Table 1. SsoFast EvaGreen control assay kit contents.

Component	Concentration	Volume
SsoFast EvaGreen supermix	2x	Two 1 ml tubes
Control assay template	10^8 copies/ μl	70 μl
Control assay primer mix	100x (50 μM each primer)	60 μl
Nuclease-free water	NA	Two 1.5 ml tubes

Additional Materials Required

- Sterile, nuclease-free 1.5 ml tubes for dilutions
- Sterile, nuclease-free Tris-EDTA (TE) buffer for dilutions (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0 is recommended)*
- Compatible 48-well, 96-well, or 384-well PCR plate and sealer, as recommended for your real-time PCR detection system
- Pipets and filtered pipet tips to prevent cross-contamination
- UV hood to prevent cross-contamination (optional)

* If TE buffer is not available, use sterile, nuclease-free water.



IF THIS ASSAY WAS SENT TO YOU BY TECHNICAL SUPPORT, PLEASE FOLLOW THE INSTRUCTIONS EMAILED TO YOU.

Preparing the Template DNA Dilutions

1. Pipet 90 μl of TE buffer into seven 1.5 ml tubes labeled 2–8.
2. Prepare the dilution series according to the directions in Table 2. After adding the template DNA to each tube, mix by repeatedly pipeting up and down ten times. Do not vortex the DNA dilutions.
3. Continue with the 96-Well or 384-Well Plate Standard Curve Setup section appropriate for your instrument.

Table 2. Preparation of dilution series.

Tube	TE Buffer, μl	Template DNA	Final [DNA], copies/ μl
1	—	Control assay template stock	10^8
2	90	10 μl from Tube 1	10^7
3	90	10 μl from Tube 2	10^6
4	90	10 μl from Tube 3	10^5
5	90	10 μl from Tube 4	10^4
6	90	10 μl from Tube 5	10^3
7	90	10 μl from Tube 6	10^2
8	90	—	No template control (NTC)

Note: Tube 1 does not require dilution. Tube 1 is the control assay template stock that comes with the kit.

96-Well Plate Standard Curve Setup

Preparing the Master Mix

1. Thaw all the components. Gentle rocking will help dissolve the SsoFast EvaGreen supermix. Take care not to generate bubbles or foam.
2. Add the components listed in Table 3 to a 1.5 ml tube and mix thoroughly, but gently.

Table 3. Volumes of components for standard curve setup.

Component	Volume, μl
SsoFast EvaGreen supermix (2x)	650
Control assay primer mix (100x)	13
Nuclease-free water	572
Total volume of master mix	1,235

Preparing the Reactions

1. Label eight 1.5 ml tubes 1–8.
2. Pipet 133 μl of the master mix into each tube.
3. Pipet 7 μl of the corresponding template DNA dilution into each tube.
4. Mix contents thoroughly by vortexing gently.
5. Briefly centrifuge the tubes.

Pipeting the Reactions into a Plate

1. Pipet four replicates of each reaction into a 96-well plate using 20 μl per well (Figure 1). Start pipeting the lowest concentration first, ending with the highest concentration. A 100 μl electronic repeat pipeter is helpful, but is not required.
2. Completely seal the plate with a compatible sealer.
3. Centrifuge the plate to settle its contents.
4. Run the plate using the protocol specified in the Thermal Cycling Conditions section.

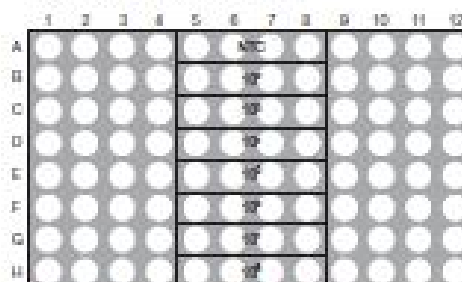


Fig. 1. 96-well plate layout — 20 μl /well.

384-Well Plate Standard Curve Setup

Preparing the Master Mix

1. Thaw all the components. Gentle rocking will help dissolve the SsoFast EvaGreen supermix. Take care not to generate bubbles or foam.
2. Add the components listed in Table 4 to a 1.5 ml tube and mix thoroughly, but gently.

Table 4. Volumes of components for standard curve setup.

Component	Volume, μ l
SsoFast EvaGreen supermix (2x)	450
Control assay primer mix (100x)	9
Nuclease-free water	351
Total volume of master mix	810

Preparing the Reactions

1. Label eight 1.5 ml tubes 1–8.
2. Pipet 90 μ l of the master mix into each tube.
3. Pipet 10 μ l of the corresponding template DNA dilution into each tube.
4. Mix contents thoroughly by vortexing gently.
5. Briefly centrifuge the tubes.

Pipetting the Reactions into a Plate

1. Pipet six replicates of each reaction into a 384-well plate using 10 μ l per well (Figure 2). Start pipetting the lowest concentration first, ending with the highest concentration. A 100 μ l electronic repeat pipeter is helpful, but is not required.
2. Completely seal the plate with a compatible sealer.
3. Centrifuge the plate to settle its contents.
4. Run the plate using the protocol specified in the Thermal Cycling Conditions section.

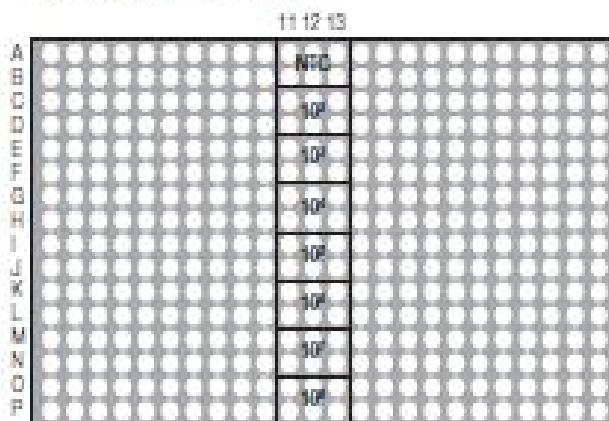


Fig. 2. 384-well plate layout – 10 μ l/well.

Thermal Cycling Conditions

1. Program the real-time PCR instrument using the appropriate plate layout (Figure 1 or 2) and the appropriate thermal cycling protocol for your instrument (Table 5).
2. Place the plate in the real-time PCR instrument and run the program.

Table 5. Thermal cycling protocols for real-time PCR detection systems.

CFX96 and CFX384 Protocol	MyIQ2 Protocol	MiniOpticon Protocol
95°C for 30 sec	95°C for 30 sec	95°C for 30 sec
95°C for 1 sec, then 60°C for 5 sec (x-40 cycles)	95°C for 1 sec, then 60°C for 10 sec (x-40 cycles)	95°C for 5 sec, then 60°C for 10 sec (x-40 cycles)
Default melt curve from 60–95°C	Melt curve from 60–95°C, 30 sec hold	Melt curve from 60–95°C, 5 sec hold

Analyzing the Data

1. Analyze the data using the default automatic baseline option.
2. With the fluorescence data in log scale view, adjust the threshold such that it is in the linear range of the amplification traces and the reaction efficiency is relatively insensitive to the exact threshold setting (Figure 3).
3. Note the efficiency and R² value of the standard curve.

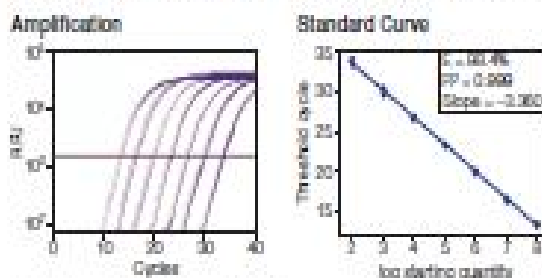


Fig. 3. Sample data for a standard curve on a CFX96 real-time PCR detection system. RFL, relative fluorescence units.

EvaGreen is a trademark of Biorum, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Biorum, Inc. to sell reagents containing EvaGreen dye for use in real-time PCR, for research purposes only.

Purchase of this product includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

Bio-Rad's real-time thermal cyclers are licensed real-time thermal cyclers under Applera's United States Patent Number 6,914,934 B1 for use in research, human in vitro diagnostics, and all other fields except veterinary diagnostics.

Bio-Rad's real-time thermal cyclers are covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts owned by Eppendorf AG: U.S. Patent Numbers 6,767,512 and 7,074,367.



Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Web site: www.bio-rad.com USA: 800-424-6723 Australia: 61 2 9634 3600 Austria: 01 877 66 01 Belgium: 09 265 25 11 Brazil: 05 21 5696 6600 Canada: 905 264 2400 China: 86 20 6320 2228 Czech Republic: 420 241 420 522 Denmark: 44 52 10 00 Finland: 09 264 22 00 France: 01 47 65 65 00 Germany: 069 27 664 0 Greece: 30 210 777 4000 Hong Kong: 852 2788 2000 Hungary: 36 7 456 6100 India: 01 244 400000 Israel: 03 623 2000 Italy: 39 02 216381 Japan: 81 3 6361 7000 Korea: 82 2 5473 4400 Mexico: 52 555 465 7670 The Netherlands: 0110 240000 New Zealand: 0509 625 500 Norway: 22 26 41 00 Poland: 48 22 321 00 00 Portugal: 351 21 472 7200 Russia: 7 495 721 14 04 Singapore: 65 6733 2100 South Africa: 27 011 246 200