



**Bárbara Alexandra
Santos Sousa**

**Estudo Comparativo de Metodologias na Análise de
Amostras Forenses**



**Bárbara Alexandra
Santos Sousa**

**Estudo Comparativo de Metodologias na Análise de
Amostras Forenses**

Relatório de Estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biomedicina Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o apoio prestado para superar todas as etapas, permitindo-me alcançar todos os meus sonhos.

o júri

presidente

Professora Doutora Ana Margarida Domingos Tavares de Sousa
Professora Auxiliar em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

arguente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada C/ Agregação, Universidade de Aveiro

orientador

Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda
Professor Auxiliar em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real e à diretora do serviço Doutora Lisa Sampaio, gostaria de agradecer a oportunidade que me deram de realizar o meu estágio no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

À Doutora Laura Cainé pelo voto de confiança e incentivo para pôr em prática os ensinamentos adquiridos.

À Doutora Benedita Silva por toda a atenção, carinho, dedicação e partilha de conhecimentos, prestada ao longo deste estágio.

A todas as pessoas do serviço que de alguma forma contribuíram com a sua ajuda e atenção ao longo deste estágio.

Agradeço ao Professor Doutor Luís Souto por ter aceitado ser meu orientador e me ter ajudado a alcançar o meu objetivo de trabalhar na área da biologia e genética forense.

À minha família, em especial aos meus pais, que ao longo de todo o meu percurso, me apoiaram e deram força para atingir todos os meus objetivos.

Por fim, quero agradecer, ao meu namorado e aos meus amigos Francisco e Patricia, que sempre me apoiaram.

palavras-chave

Validações, Genética Forense, DNA

resumo

Este relatório de estágio tem como objetivo descrever as atividades realizadas durante o Estágio Curricular no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, entre setembro de 2020 e junho de 2021.

Inicialmente, apresenta-se a Entidade de Acolhimento e os conceitos teóricos importantes para a compreensão das atividades desenvolvidas. De seguida, descrevem-se as validações realizadas e respetivas metodologias utilizadas desde a extração do DNA, à análise dos seus fragmentos.

Por fim, faz-se uma breve discussão relativamente ao trabalho desenvolvido, sendo este a Validação do *kit* de Extração de DNA *PrepFiler Express™* em Amostras de Referência, a Validação do *kit* de Extração de *PrepFiler Express BTA™* em Amostras Difíceis e a Validação do *kit* de Extração de DNA *PrepFiler Express BTA™* em Amostras de Restos Cadavéricos.

keywords

Validations, Forensic Genetics, DNA

abstract

This internship report aims to describe the activities carried out during the Curriculum Internship at the Service of Genetics and Forensic Biology, of the Northern Delegation, of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, between September 2020 and June 2021. Initially, the Host Entity and the important theoretical concepts for understanding the developed activities are presented. The validations carried out and the respective methodologies used from the extraction of the DNA to the analysis of its fragments are described below. Finally, there is a brief discussion regarding the work carried out, namely the Validation of the *PrepFiler ExpressTM* DNA Extraction kit on Reference Samples, the Validation of the *PrepFiler Express BTATM* Extraction kit on Difficult Samples and the Validation of the *PrepFiler Express BTATM* DNA Extraction kit on Cadaveric Remain Samples.

Índice

Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas	xi
Índice de Abreviaturas e Símbolos	xii
Prefácio	1
1. Objetivos.....	1
2. Estrutura do Relatório.....	1
Entidade de Acolhimento	3
1. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.	3
1.1. Organização.....	3
1.2. Serviços Técnicos	4
1.3. Controlo de Qualidade	5
1.4. Validação de Ensaios	6
Introdução Teórica.....	7
1. Conceitos Básicos de Genética	7
1.1. Ácido Desoxirribonucleico, DNA	7
1.2. Replicação do DNA.....	8
1.3. Mutações	9
1.4. Polimorfismos	10
1.4.1. Short Tandem Repeat, STR.....	10
2. Conceitos Básicos de Identificação Genética	11
2.1. Cadeia de Custódia	11
2.2. Tipos de amostras	13
2.3. Extração do DNA	13
2.4. Quantificação do DNA.....	16
2.5. Amplificação do DNA	17
2.6. Análise dos Produtos Amplificados.....	18
Experiência Adquirida	20
1. Metodologias Laboratoriais Realizadas.....	20
1.1. Extração do DNA	20
1.1.1. <i>Prep-n-Go™ Buffer</i>	21
1.1.2. <i>PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	21
1.1.3. <i>PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kit</i>	22

1.2.	Quantificação do DNA.....	24
1.2.1.	<i>Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit</i>	24
1.3.	Amplificação do DNA	25
1.3.1.	<i>GlobalFiler™ PCR Amplification Kit</i>	26
1.3.2.	<i>PowerPlex® Fusion 6C System</i>	26
1.3.3.	<i>YFiler™ Plus PCR Amplification Kit</i>	27
1.4.	Análise dos Produtos Amplificados.....	28
2.	Colaboração no Processo de Validação	29
2.1.	Validação do <i>kit</i> de Extração de DNA <i>PrepFiler Express™</i> em Amostras de Referência 29	
2.2.	Validação do <i>kit</i> de Extração de DNA <i>PrepFiler Express BTA™</i> em Amostras Difíceis 30	
2.3.	Validação do <i>kit</i> de Extração de DNA <i>PrepFiler Express BTA™</i> em Amostras de Restos Cadavéricos.....	31
	Discussão e Conclusão.....	33
	Referências	36

Índice de Figuras

Figura 1: Organigrama das Delegações e Serviços Técnicos do INMLCF, I.P.....	3
Figura 2: Esquematização das funções desempenhadas pelos Serviços Técnicos do INMLCF, I.P. .	4
Figura 3: Estrutura dos constituintes de DNA e como se encontram ligados entre si.....	7
Figura 4: Esquema do processo de replicação do DNA.....	9
Figura 5: Fluxograma das Cadeias de Custódia.....	12
Figura 6: Esquematização do método de captura do DNA com partículas magnéticas.	15
Figura 7: Esquematização do processo de amplificação do DNA e emissão de fluorescência.	16
Figura 8: Esquematização da reação de amplificação por PCR.	17
Figura 9: Esquematização da técnica de eletroforese capilar.	18
Figura 10: Representação gráfica do passo de preparação da recolha do DNA concentrado.....	24

Índice de Tabelas

Tabela 1: Metodologia de preparação das amostras para extração do DNA consoante o suporte utilizado para a sua colheita.	20
Tabela 2: Quantidade de amostra necessária para o processo de extração, de acordo com o protocolo utilizado.....	22
Tabela 3: Quantidade de cada um dos reagentes da solução de lise a adicionar por amostra de acordo com o protocolo utilizado.....	23
Tabela 4: Volume de sobrenadante utilizado no processo de extração automatizada de acordo com o protocolo utilizado.	23
Tabela 5: Serie de diluições para preparação dos <i>Standards</i>	25
Tabela 6: Condições do programa de PCR utilizado para o <i>kit GlobalFiler™</i>	26
Tabela 7: Condições do programa de PCR utilizado para o <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i>	27
Tabela 8: Condições do programa de PCR utilizado para o <i>kit YFiler™ Plus</i>	28
Tabela 9: Preparação da mistura de reagentes a utilizar na eletroforese capilar de acordo com cada <i>kit</i>	29

Índice de Abreviaturas e Símbolos

BSA: Albumina de soro de bovino (do inglês, *bovine serum albumin*).

CODIS: *Combined DNA Index System*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DTT: Ditioneitol (do inglês *Dithiothreitol*)

Fig.: Figura

INMLCF, I.P.: Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

IPAC: Instituto Português de Acreditação

M: Molar

mDNA: DNA mitocondrial

min.: Minutos

mg: Miligrama

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MRC: Materiais de Referência Certificados

n.º: Número

nDNA: DNA nuclear

ng: Nanogramas

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

seg.: Segundos

SGBF: Serviço de Genética e Biologia Forense

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

STR: *Short Tandem Repeat*

TE: Tris-EDTA

UV: Ultravioleta-Visível

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*

°C: graus Celsius

x g: Unidade de medida da Força Centrífuga Relativa ou Força G

µL: Microlitros

®: *Registered Trademark*

™: *Trademark*

Prefácio

Neste relatório encontra-se descrito o Estágio Curricular realizado no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., entre outubro de 2020 e junho de 2021, no âmbito do Mestrado em Biomedicina Molecular da Universidade de Aveiro.

Nos 9 meses de estágio procedeu-se a diversas tarefas que permitiram compreender melhor, e acompanhar o processo de análise das amostras de DNA, desde a sua extração até à obtenção do seu perfil genético.

As tarefas desempenhadas permitiram colaborar no processo de validação de técnicas de extração utilizadas no serviço. Validou-se o *kit* de extração de DNA *PrepFiler Express™* para amostras de referência, o *kit* de extração de DNA *PrepFiler Express BTA™* para amostras difíceis e o *kit* de extração de DNA *PrepFiler Express BTA™* para amostras de restos cadavéricos.

1. Objetivos

O objetivo principal da realização deste Estágio Curricular foi desenvolver competências teóricas e práticas na área das Ciências Forenses, mais especificamente da Genética Forense.

Como objetivos a atingir durante o decorrer do estágio, definiu-se:

- Conhecer a realidade do mercado de trabalho, mais especificamente dentro da área;
- Desenvolver *soft skills* e *hard skills* importantes para trabalhar na área;
- Adquirir mais experiência laboratorial, nomeadamente, aprender novas técnicas.

2. Estrutura do Relatório

Este relatório de estágio encontra-se estruturado em vários capítulos, sendo os principais:

- Entidade de Acolhimento - neste capítulo é descrito a estrutura e organização do INMLCF, I.P. e dos serviços que prestam à comunidade. Também é referido os cuidados de gestão das amostras e controlo de qualidade para garantir a fiabilidade dos resultados.
- Introdução Teórica – neste capítulo é fornecido os conceitos básicos de genética e de identificação genética, essenciais para compreender as atividades desenvolvidas durante o estágio.

- Experiência Adquirida – neste capítulo encontra-se, de forma detalhada as metodologias laboratoriais realizadas ao longo do estágio, bem como, as funções desempenhadas no processo de validação das técnicas de extração.
- Discussão e Conclusão – no final, é apresentada uma análise crítica da experiência do estágio, da importância desta experiência e das competências adquiridas.

Entidade de Acolhimento

1. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

1.1. Organização

O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.) é um laboratório pertencente ao Estado Português, mais especificamente, ao Ministério da Justiça, com diversas funções, nomeadamente, periciais, médico-legais e forenses. O INMLCF, I.P. é considerado instituição nacional de referência. (1)

O INMLCF, I.P. é constituído por três Delegações: Norte, Centro e Sul, que se localizam, respetivamente, no Porto, Coimbra e Lisboa. A Delegação do Centro serve de sede do INMLCF, I.P.. Em cada uma das Delegações pratica-se quatro Serviços Técnicos: Patologia Forense, Clínica Forense, Química e Toxicologia Forenses, e Genética e Biologia Forenses (SGBF) (Fig.1). (2)

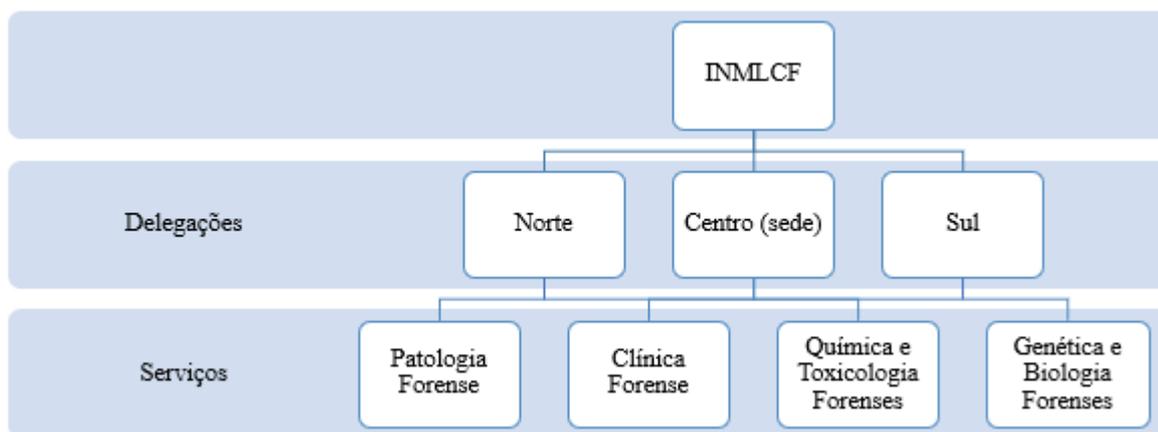


Figura 1: Organograma das Delegações e Serviços Técnicos do INMLCF, I.P..

O INMLCF, I.P. também está organizado em Gabinetes Médico-Legais que funcionam em dependência direta com as Delegações localizadas na sua área geográfica. (1)

1.2. Serviços Técnicos

O INMLCF, I.P. é constituído por quatro Serviços Técnicos que funcionam em cada uma das Delegações: Patologia Forense, Clínica Forense, Química e Toxicologia Forenses, e Genética e Biologia Forenses. (2)

No Serviço de Patologia Forense realiza-se as autópsias médico-legais, exames de anatomia patológica forense e histopatológicos, perícias de identificação de cadáveres e restos humanos, embalsamento, estudo antropológicos e exames do hábito externo de cadáveres (**Fig. 2**). (2,3)

O Serviço de Clínica Forense realiza exames e perícias em pessoas para a avaliação dos danos físicos e psicológicos nos domínios do Direito Penal, Civil, do Trabalho e Administrativo. Entre esses exames e perícias é avaliado o dano corporal e o estado de toxicodependência, é realizado exames sexuais, estudo de doenças profissionais e avaliação do estado de saúde (**Fig. 2**). (2,3)

O Serviço de Química e Toxicologia Forenses assegura a realização de perícias e exames laboratoriais para a determinação de substâncias químicas e toxicológicas, nomeadamente, de álcool etílico, pesticidas, drogas de abuso, metais e metalóides, substâncias medicamentosas, monóxido de carbono e outros produtos voláteis ou não voláteis (**Fig. 2**). (2,3)

Por fim, o serviço de Genética e Biologia Forenses presta serviços para a identificação genética de pessoas, cadáveres ou restos cadavéricos, exames de criminalística a partir da análise de vestígios biológicos ou não biológicos e exames de parentesco (**Fig. 2**). (2,3)



Figura 2: Esquematização das funções desempenhadas pelos Serviços Técnicos do INMLCF, I.P.

1.3. Controlo de Qualidade

No Serviço de Genética e Biologia Forense são realizadas perícias dos quais resultam dados que podem implicar um processo judicial ou uma decisão judicial e por isso, é necessário que todos os procedimentos sejam realizados com precaução, sendo essencial controlos de qualidade dos resultados, dos procedimentos utilizados e da formação dos profissionais.

O Laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, pertence ao conjunto de laboratórios acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), desde 2015 para a atividade laboratorial que desenvolve, de acordo com a norma internacional de referência NP EN ISO/IEC 17025. Esta norma contém linhas orientadoras que promovem as boas práticas laboratoriais, uma melhor qualificação dos profissionais e a adoção de sistemas de gestão e qualidade. (4)

A norma prevê alguns requisitos de gestão, nomeadamente:

- Controlo de documentos;
- Ações corretivas e preventivas;
- Organização do laboratório;
- Adoção de um sistema de gestão que engloba o manual de qualidade;
- Requisitos técnicos que inclui os colaboradores, métodos de ensaios e validação de métodos, equipamento, rastreabilidade das medidas, garantia da qualidade dos resultados, etc. (4)

No serviço são aplicados alguns cuidados para garantir uma boa qualidade dos resultados, evitando contaminações e garantindo que se esta ocorrer, seja possível identificar a sua origem. Alguns exemplos desses cuidados, são a criação de listagens, em que é indicado as amostras que foram processadas ao mesmo tempo, o método usado, os lotes e validade dos reagentes utilizados, os equipamentos e materiais usados (câmaras UV, termociclador, micropipetas...), operador e data de realização. Com toda esta informação é possível rastrear a possível fonte de contaminação, quando esta ocorre.

Outros dos cuidados, é a base de dados com os perfis genéticos de todas as pessoas associadas ao serviço, de forma a garantir, quando surgem amostras mistura, que o segundo perfil genético não se deve a uma possível contaminação pelos operadores, durante o processamento da amostra.

Em todas as etapas de processamento da amostra é adicionado controlos negativos, que são preparados e processados ao mesmo tempo que as amostras, contendo os mesmos reagentes, sendo que apenas, não será incluído amostra. Desta forma, permite perceber se a contaminação, aquando da sua ocorrência, teve origem nos reagentes utilizados.

No serviço é feito o controlo das temperaturas dos frigoríficos e congeladores, de forma a garantir a qualidade dos reagentes utilizados e das amostras e também todos os equipamentos, armários, gavetas e materiais de laboratório, se encontram identificados através de etiquetas com uma nomenclatura interna que permite a sua fácil identificação nos documentos.

O serviço também apresenta documentos internos com instruções técnicas para cada um dos procedimentos realizados, para garantir que todas as pessoas que os executam fazem-no de igual forma.

Estes são alguns exemplos dos cuidados aplicados para garantir uma boa gestão e controlo de qualidade.

1.4. Validação de Ensaio

Como o laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forense é acreditado pelo IPAC, surge a necessidade de validar os procedimentos, técnicas, ensaios e equipamentos, de acordo com as características e o trabalho do laboratório. No serviço, existe um documento interno do qual constam os requisitos mínimos para a validação interna de um novo método de análise de DNA.

Com a validação, pretende-se uniformizar os métodos e critérios utilizados, com o intuito de demonstrar que um procedimento tem as características necessárias para obter resultados válidos, ou seja, que cumprem os requisitos de qualidade, e que o novo procedimento é adequado para o que se pretende realizar e/ou analisar. Após realizada a validação é importante que o novo procedimento seja descrito e caracterizado para que qualquer pessoa que tenha a preparação necessária, o possa realizar de igual forma. (5)

No documento interno é indicado as etapas de validação, a seleção do método e os parâmetros a validar. Como parâmetros é referido que é necessário realizar uma avaliação indireta e uma avaliação direta. Na avaliação indireta pretende-se analisar a Especificidade, Limiares Analíticos, Precisão do método e Contaminação. Na avaliação direta, faz-se a comparação com métodos desenvolvidos, comparação interlaboratoriais e calibração com recurso a materiais de referência certificados (MRC).

Introdução Teórica

1. Conceitos Básicos de Genética

1.1. Ácido Desoxirribonucleico, DNA

É nos ácidos desoxirribonucleicos (DNA), que se encontra toda a informação genética importante para o bom funcionamento e desenvolvimento dos organismos. A informação contida no DNA é transmitida de forma hereditária e se encontra no núcleo das células e em outros organelos celulares, como mitocôndrias.

O DNA é constituído por duas cadeias de nucleótidos. Os nucleótidos do DNA são constituídos por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base azotada, do tipo pirimidina (citosina e timina) ou purina (adenina e guanina). Assim, existem quatro nucleótidos associados ao DNA, deferindo apenas na sua base azotada, sendo representados por letras A, C, G e T (**Fig. 3**). Estes nucleótidos repetem-se ao longo do DNA, formando um código genético único para cada pessoa, devido as inúmeras combinações possíveis.

Estes nucleótidos encontram-se unidos por ligações fosfodiéster entre o carbono 3' da pentose (açúcar) e o carbono 5' da pentose seguinte. As bases azotas estão unidas ao açúcar através de uma ligação N-glicosídica entre o carbono 1' do açúcar e o azoto 9, no caso das bases púricas, ou azoto 1, nas bases pirimídicas. As duas cadeias de DNA encontram-se ligadas uma a outra através de pontes de hidrogénio entre as bases azotadas. As pontes de hidrogénio são formadas entre a adenina de uma cadeia com uma timina da cadeia complementar através de 2 pontes de hidrogénio (A=T) e entre a citosina de uma cadeia com uma guanina da cadeia complementar através de 3 pontes de hidrogénio (C≡G). (**Fig. 3**)

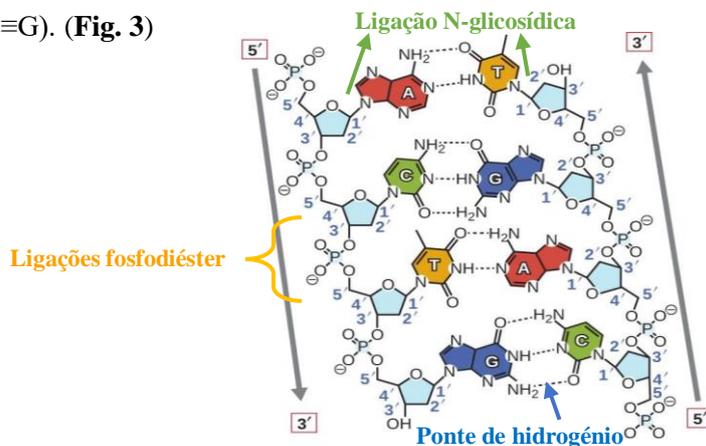


Figura 3: Estrutura dos constituintes de DNA e como se encontram ligados entre si.

O genoma de um indivíduo é constituído por todo o DNA presente nas células. A informação genética está codificada em dois tipos de genomas, o nuclear e o mitocondrial, denominando-se, respetivamente, DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (mtDNA).

O nDNA está presente no núcleo e possui aproximadamente 3 mil milhões de pares de bases (bp), encontrando-se normalmente organizado numa estrutura linear em dupla hélice. O mtDNA encontra-se nas mitocôndrias, normalmente, na forma de dupla cadeia circular, sendo transmitido apenas pela linhagem materna.

1.2. Replicação do DNA

O processo de replicação do DNA ocorre durante a interfase do ciclo celular, sendo um processo importante pois, permite que durante a renovação celular, o perfil genético se mantenha.

Existe dois métodos pelos quais as células se podem multiplicar: a mitose ou a meiose. A mitose ocorrer no processo de divisão nuclear de células somáticas, originando duas células filhas geneticamente iguais entre si e iguais à célula que lhes deu origem. A meiose permite a formação dos gâmetas através de duas divisões celulares consecutivas, originando quatro células filhas haploides. Este processo permite a passagem de informação para a geração seguinte, sendo metade proveniente da mãe e outra metade proveniente do pai.

No processo de replicação, cada cadeia de nucleótidos da dupla hélice é um molde para a formação de uma cadeia complementar. Este é procedido por um complexo de proteínas denominado replissoma. O processo de replicação é semi-conservativo, ou seja, após a replicação as moléculas de DNA obtidas têm uma cadeia pertencente a cadeia molde e outra cadeia acabada de sintetizar. (6)

Uma das proteínas constituintes do replissoma é a enzima DNA polimerase III que tem como principal função a adição de nucleótidos na extremidade 3' de uma cadeia de nucleótidos em crescimento, utilizando a cadeia complementar como molde. A DNA polimerase só adiciona nucleótidos na extremidade 3' o que permite sintetizar de forma contínua apenas uma das cadeias antiparelelas, sendo essa cadeia denominada de *leading*. A outra cadeia é também sintetizada a partir da extremidade 3', no entanto, neste caso, a DNA polimerase liga-se a *primers* de ácido ribonucleico (RNA), formando fragmentos de Okazaki. Estes são pequenos fragmentos de DNA recentemente sintetizados que serão, em seguida, ligados pela enzima DNA ligase. Em seguida, os *primers* são retirados e as lacunas são preenchidas, pela DNA polimerase I, dando origem à cadeia *lagging*, sendo esta cadeia sintetizada de forma descontínua (**Fig. 4**). (6)

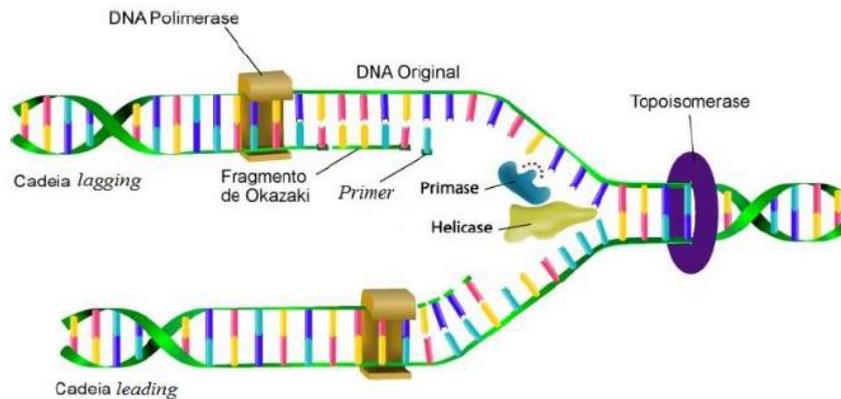


Figura 4: Esquema do processo de replicação do DNA.(7)

1.3. Mutações

As células humanas dividem-se de forma contínua ocorrendo um número elevadíssimo de divisões celulares, sendo enorme a probabilidade de ocorrência de um erro. No entanto as células têm mecanismos extraordinários que permitem reparar os erros que vão ocorrendo ao longo das divisões celulares, persistindo apenas alguns. As alterações permanentes são denominadas de mutações. (8,9)

As mutações são todas as alterações na sequência de pares de bases do DNA. Existe vários tipos de mudanças que podem ocorrer no conteúdo do DNA, nomeadamente deleções de base, substituições de base e inserções de base, sendo estas mutações pontuais, e rearranjos ou trocas na ordem de segmentos de base. (8,9)

As mutações podem ser vantajosas, desvantajosas ou neutras, segundo as consequências funcionais que originam. As mutações neutras, não causam alterações funcionais e nessa situação denominam-se de polimorfismos. Quando isso ocorre, forma-se um novo alelo para esse *locus*. Existem regiões altamente polimórficas, ou seja, regiões que apresentam mais que um alelo por *locus*. (8,9)

1.4. Polimorfismos

O genoma é formado por sequências únicas e por sequências repetitivas que possuem diferentes tamanhos, sendo discriminadas pelo tamanho e quantidade de unidades de repetição. Quando a unidade de repetição tem entre 15-20 pares de bases (pb), é designado por minissatélite ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Quando a unidade de repetição tem entre 2-7 pb são designados de microsatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*). (9,10)

Por fim, quando um locus apresenta vários alelos que diferem entre si apenas numa base azotada, é denominado de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). (9,10)

1.4.1. Short Tandem Repeat, STR

Os STRs são regiões não codificantes do DNA constituídas por unidades de repetição de 2-7 pb, variando em comprimento e composição da unidade de repetição. Dos polimorfismos conhecidos os STRs são os mais utilizados na identificação humana. De entre os STRs, os mais utilizados na área de Genética Forense são os tri, tetra e pentanucleotídicos. (9,10)

Uma das principais razões para a utilização preferencial dos STRs deve-se ao facto dos seus alelos apresentarem tamanhos próximos, possibilitando a análise em multiplex, ou seja, a análise de vários STRs em simultâneo. (9,10)

Outra razão da sua utilização é como são muito abundantes no genoma humano, tem elevado grau de polimorfismo e como os alelos são de tamanho reduzido permite que sejam facilmente analisados por técnicas de PCR. (9,10)

Os STRs utilizados na identificação humana, são seleccionados tendo em conta vários critérios, nomeadamente:

- Elevado poder discriminativo (superior a 0,9);
- Localização em cromossomas distintos (herança independente);
- Robustez e reprodutibilidade dos resultados;
- Baixa taxa de mutação;
- Reduzida formação de artefactos através de análise por eletroforese capilar;
- Tamanho dos alelos entre 90 pb-500 pb. (9,10)

Os STRs podem ser autossómicos ou sexuais, tendo em conta os cromossomas em que se localizam. Normalmente, utiliza-se os cromossomas autossómicos para uma identificação individual, mas se for necessário mais informação recorre-se aos cromossomas sexuais. O cromossoma Y é

utilizado para definir a linhagem paterna em casos de paternidade, ou para identificar o sexo masculino em casos criminais, nomeadamente em amostras mistura de casos como agressões sexuais. O cromossoma X é utilizado em casos de paternidade na ausência do pretense pai. (9,11)

Já existe vários *kits* comerciais que permitem a análise e estudo simultâneo dos STRs utilizados pelo CODIS (*Combined DNA Index System*), em que fornecem uma mistura com vários *primers* marcados com fluoróforos distintos e outra mistura com os restantes componentes da PCR (polimerase, cloreto de magnésio e desoxirribonucleótidos trifosfato). Também fornecem os *ladders* alélicos, sendo estes, misturas de alelos comuns da população, para os STRs em questão. (9,11)

2. Conceitos Básicos de Identificação Genética

Para obter um perfil genético que permita a identificação genética é necessário proceder a várias etapas, desde a recolha da amostra biológica à análise do perfil genético obtido. Todas essas etapas, procedimentos e pessoas que estiveram em contacto com a amostra, encontram-se documentados de forma exaustiva na cadeia de custódia. (5)

Consoante o tipo de amostra é importante escolher procedimentos que tenham os cuidados adequados ao tipo de material a ser processado, de forma a obter DNA de qualidade e com quantidade suficiente para a obtenção de um perfil completo. (5)

As etapas principais para a obtenção de um perfil genético e posterior identificação genética são: Extração, Quantificação, Amplificação e Análise dos Produtos Amplificados. No final, obtém-se um eletroferograma com o perfil genético.

2.1. Cadeia de Custódia

A Cadeia de Custódia considera a preservação das amostras, de forma, a ser mantida a autenticidade e integridade das amostras. Também é constituída pela documentação exaustiva das diversas pessoas que estiveram em contacto com a amostra, desde a sua recolha até à obtenção dos resultados e também indica todos os processos laboratoriais realizados a essa amostra. Esta documentação pode ser utilizada pelo tribunal para chamar os intervenientes à audiência. (9,10)

No local de recolha da amostra, o primeiro passo na cadeia de custódia, é a identificação da amostra. Existem recomendações para a rotulagem adequada dos contentores. O passo seguinte, corresponde ao acondicionamento das amostras nas embalagens apropriadas, consoante a natureza e necessidades de preservação da amostra. (9,10)

De seguida, a amostra terá de ser transportada até ao laboratório forense que irá proceder à sua análise. É necessário que a amostra se faça acompanhar com o requerimento devido, em que descreve a amostra, o tipo de análise solicitada, hora, data e local onde foi colhida, bem como outra informação que seja relevante e que esteja associada à amostra. (10)

No laboratório é utilizado um código de barras ou um número de identificação para cada amostra, para garantir a anonimização das amostras durante o seu processamento laboratorial. No INMLCF, I.P. existem normas de seleção, colheita e acondicionamento das amostras biológicas. (10)

Após a receção das amostras é efetuado a confirmação do material recebido, de acordo com o requerimento que a acompanha. Também se procede à descrição pormenorizada do que foi recebido, e do estado em que se encontra as amostras que foram recebidas. No Serviço de Genética e Biologia Forense ainda se descreve o aspeto das manchas ou outro tipo de amostras tendo em conta a extensão, cor, textura e localização, se estas se encontrarem em peças de vestuário. (10)

Nesta fase do processo é importante que seja realizada uma escolha criteriosa dos vestígios que serão analisados para garantir o sucesso da perícia e evitar análises desnecessárias. Muitas vezes, para ajudar a selecionar o que deverá seguir para análise e que tipo de análise deverá ser realizada, recorre-se a testes preliminares específicos, que permitem identificar, com algum grau significativo de certeza, a presença dos diferentes tipos de produtos biológicos (sangue, sêmen e saliva). (10)

Por fim, na Cadeia de Custódia deverá estar discriminado todo o percurso laboratorial das amostras, indicando as análises que foram realizadas, data, hora, a pessoa que procedeu a essa análise, bem como outra informação que seja relevante. Isto é realizado até à obtenção do resultado requerido, podendo ser necessário proceder à repetição de algum processo para obter os resultados de acordo com as expectativas indicadas nas requisições das perícias. (10)

Na **Fig. 5** encontra-se esquematizado todo o processo que constitui a Cadeia de Custódia.

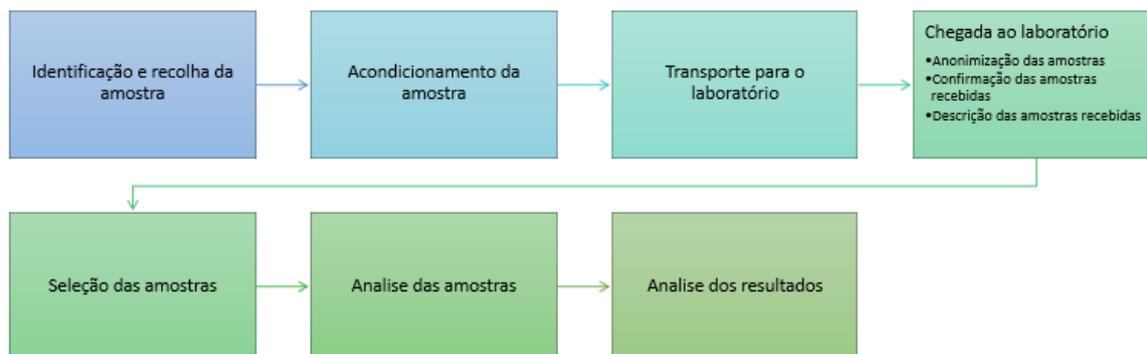


Figura 5: Fluxograma das Cadeias de Custódia.

2.2. Tipos de amostras

Na Genética Forense existem dois tipos principais de amostras: amostras de referência e amostras problema.

As amostras de referência são amostras colhidas para fins de comparação, ou seja, são amostras que vão servir de referência para um determinado indivíduo. Dentro destas amostras, normalmente, encontram-se amostras de base de dados de perfis de DNA, amostras de testes de parentesco e amostras para identificação de restos cadavéricos. Estas amostras são colhidas, geralmente, a indivíduos vivos, sendo normalmente, amostras de sangue ou de saliva. Se a colheita for bem efetuada e a amostra devidamente armazenada, estas amostras apresentam, frequentemente, quantidade e qualidade de DNA suficiente para um perfil genético completo. (10,12,13)

As amostras problema são amostras cuja identificação se pretende estabelecer, muitas vezes por comparação com amostras de referência. São amostras, normalmente provenientes de vestígios numa cena de crime, amostras colhidas em objetos, amostras colhidas em vítimas de crime, amostras provenientes de restos cadavéricos (às vezes num estado avançado de decomposição), entre outras amostras. Estas amostras, geralmente apresentam pequenas quantidades de DNA, podendo conter material genético de origem desconhecida, ou se encontrar degradado. Muitas vezes, devido ao estado destas amostras e ao estarem sujeitas a fatores de degradação que promovem a fragmentação do DNA, não é possível obter um perfil genético. Estas amostras podem ser amostras de sangue, saliva, fluidos sexuais, cabelos, tecidos moles (por exemplo, músculo), ossos, dentes, entre outros. (10,12,13)

Estas amostras, não são analisadas em conjunto, sendo na maioria das vezes utilizadas metodologias diferentes de extração. A quantificação das amostras é realizada dependendo do tipo de amostras.

2.3. Extração do DNA

Com o processo de extração do DNA pretende-se separar o material genético de outros elementos celulares, como por exemplo proteínas, pois esses constituintes podem inviabilizar a análise do DNA. (5)

A técnica de extração a ser utilizada depende de vários aspetos, nomeadamente o tipo de amostra e a quantidade e qualidade do material genético que se pressupõe que a amostra contém. (5)

No Serviço de Genética e Biologia Forense, utilizam-se diferentes tipos de metodologias de extração, consoante o tipo de amostra utilizado. Recorre-se à extração com tampão *Prep-n-Go™*

quando se extrai amostras de referência de saliva, à extração com o kit *PrepFiler Express™* automatizada no equipamento *Automate Express™*, quando se extrai amostras problema de sangue, saliva, sémen, tecidos moles, etc e à extração com o kit *PrepFiler Express BTA™* automatizada no equipamento *Automate Express™*, quando se extrai amostras difíceis, como ossos, dentes e unhas. Para amostras de referência de sangue, normalmente como são colhidas em papel FTA, recorre-se ao método de amplificação direta, não sendo necessário um processo de extração. Quando isso não se verifica recorre-se ao método *Chelex® 100*.

Para um mesmo tipo de amostra (sangue, saliva, ...) a metodologia utilizada é diferente consoante se é amostra problema ou amostra de referência, devido à quantidade e qualidade de DNA que se pressupõem que a amostra contenha. Ou seja, no caso das amostras referência pressupõem-se que ao ser bem executada a colheita e armazenamento da amostra, que estas, frequentemente, apresentam quantidade e qualidade de DNA suficiente para um perfil genético completo, sendo por isso, suficiente um método mais simples que permita a sua análise de forma, rápida e eficiente. Já no caso das amostras problemas, como normalmente apresentam quantidades reduzidas de DNA, podem conter material genético de origem desconhecida, ou até se encontrar degradado, necessita de um método mais rigoroso e eficiente para extrair a maior quantidade possível de DNA.

Os processos de extração baseiam-se em duas etapas: uma primeira fase para a libertação do DNA, através da rotura das membranas celulares e uma segunda fase para a purificação do DNA em solução. (5)

O recurso ao tampão *Prep-n-Go™*, permite extrair amostras de esfregaços bucais para amplificação direta, permitindo assim, a análise de amostras de DNA de forma, mais rápida. Sendo que basta adicionar o tampão *Prep-n-Go™ Buffer* à amostra juntamente com Água *Nuclease-Free* e aquecer a 90°C, de forma, a romper as membranas celulares e destruir as proteínas existentes, ficando o DNA isolado e em solução. (14)

Os kits *PrepFiler™* e *PrepFiler™ BTA* contém um tampão de lise que possui detergentes, como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), e sais caotrópicos como o tiocianato de guanidina (GuSCN), que irão promover a lise celular através da desnaturação das proteínas, libertando assim o DNA. Também utilizam um agente redutor, ditioneitol (DTT), de forma, a inativar as DNases, protegendo assim o DNA. O kit *PrepFiler™ BTA* ainda recorrer ao uso de Proteinase K, uma protease endolítica que digere proteínas, pois é normalmente utilizado para extrair DNA de amostras de tecidos calcificados, como osso e dente. (10,15)

Estes kits recorrem ainda a metodologias de extração sólida, sendo que o substrato sólido utilizado é partículas magnéticas com polímeros incorporados. Com a utilização de partículas magnéticas, pretende-se que estas se liguem ao DNA existente na amostra e recorrendo a ímãs para criar uma carga iónica apropriada, magnetizando essas partículas, fazendo com que estas fiquem

“presas”. Assim é possível efetuar lavagens para eliminar todos os componentes não ligados, em solução, para que no fim, ao retirar-se o imã, fique apenas o DNA purificado em solução. (Fig. 6) (16)

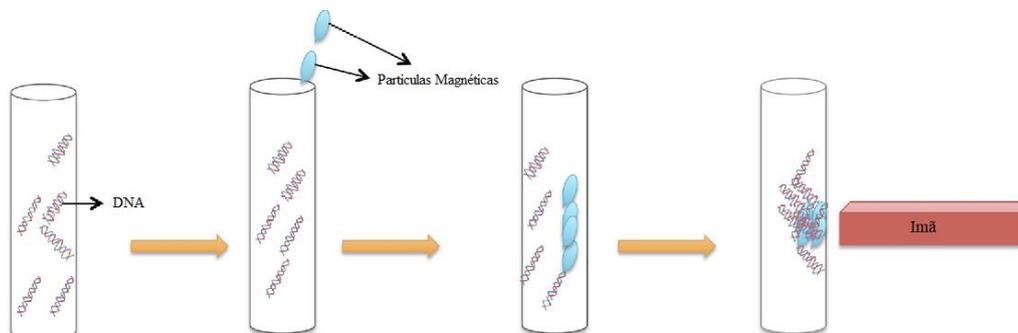


Figura 6: Esquemática do método de captura do DNA com partículas magnéticas. (17)

Este processo ocorre de forma automatizada com recurso ao equipamento *Automate Express™*, em que todos os reagentes necessários se encontram em *cartridges* separados e protegidos, sendo apenas abertos durante o processo de extração, pelo equipamento, num ambiente fechado, sendo descartados após extração. Neste processo é utilizado apenas uma ponta por amostra durante todo o tempo de extração (30 min.), reduzindo assim os resíduos. Sendo o processo automatizado, reduz o risco de contaminação e de erro devido à intervenção humana, para além que aumenta a quantidade de amostras extraídas em menos tempo, pois é possível extrair até 13 amostras por equipamento. (16)

As vezes é necessário concentrar as amostras de DNA obtidas, para isso, recorre-se a um processo de diálise e concentração, através do uso, por exemplo, de filtros de microcentrifuga *Amicon® Ultra*. (10)

O método que recorre à resina quelante *Chelex 100*, é um método rápido, mas pode necessitar de concentrar o DNA antes de proceder a etapa seguinte. O *Chelex* atua como quelante de iões, como o magnésio. Dessa forma, compromete a atividade das nucleases, pois necessitam do magnésio para desempenhar as suas funções. Estando as nucleases inativadas, o DNA fica protegido da degradação. O processo está dividido em duas fases: uma lavagem inicial para remoção de contaminantes e inibidores, como grupo heme e outras proteínas, seguida de aquecimento a 100°C para rotura das membranas celulares e destruição das proteínas celulares, libertando assim o DNA. Para obter o DNA isolado, basta centrifugar, transferindo o sobrenadante para um novo tubo, podendo ser utilizado diretamente na reação de amplificação. (5,10)

Após a extração, as amostras problema são quantificadas, e a partir dos resultados obtidos determina-se a quantidade de amostra a utilizar no processo de amplificação.

2.4. Quantificação do DNA

A etapa de quantificação é uma fase importante no processo de identificação genética, pois permite determinar a quantidade de DNA disponível para amplificação. Deve-se quantificar as amostras problemas, pois a sua quantidade é muito variável e algumas vezes reduzida.

No Serviço de Genética e Biologia Forense, normalmente recorre-se ao *kit* de quantificação *Quantifiler® Trio DNA Quantification*, pois permite a quantificação simultânea da quantidade total de DNA humano e a quantidade de DNA humano de origem masculina presente na amostra. Para determinar a quantidade de DNA recorre-se à técnica *Real-Time PCR*. (18)

Para a realização desta técnica recorre-se a *primers*, que se ligam a sequências de interesse da amostra de DNA. Os *primers* estão ligados a sondas e quando estes se ligam ao DNA, a enzima *Taq polimerase* vai permitir que o DNA seja amplificado, libertando assim a sonda, resultando na emissão de fluorescência devido ao fluorocromo que a constitui. A fluorescência vai ser medida por um sistema ótico, determinando a quantidade de DNA presente na amostra. (Fig.7) (5)

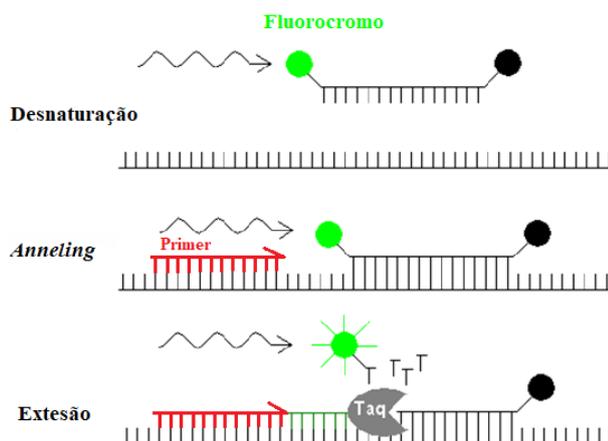


Figura 7: Esquemática do processo de amplificação do DNA e emissão de fluorescência.

Para determinar a quantidade de DNA é necessário proceder ao traçar de curvas de calibração. Para realizar as curvas de calibração, recorre-se a uma serie de diluições a partir de um DNA *standard*, incluído no *kit*. Como as concentrações dos *standards* são conhecidas, as curvas de calibração vão correlacionar a quantidade de DNA presente com a intensidade de fluorescência e dessa forma, através de comparação, determina-se a quantidade de DNA presente nas amostras. (18)

2.5. Amplificação do DNA

A amplificação do DNA é recorrentemente realizada com recurso à técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em Genética Forense. Esta técnica permite, a partir de uma quantidade inicial de DNA, que na grande parte das vezes, não seria suficiente para à análise do perfil genético, obter uma quantidade maior de DNA. (9)

A técnica de PCR consiste na amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA de interesse (*target*). O processo consiste em três fases que ocorrem em vários ciclos térmicos: desnaturação, *annealing* e extensão. A fase de desnaturação ocorre a cerca de 94°C e consiste na separação da cadeia dupla de DNA. Na fase de *annealing* ocorre a hibridização de dois *primers*, por cada fragmento que se pretende amplificar, com as respetivas extremidades 3' da cadeia dupla de DNA, a cerca de 60°C. Por fim, a fase de extensão é executada por uma polimerase (Taq polimerase), a cerca de 72°C, formando assim novas cópias das sequências de DNA de interesse. Para esta última fase é necessário adicionar às amostras, aquando da sua preparação para a amplificação por PCR, dNTPs (nucleótidos necessários à construção das novas cadeias de DNA), polimerase (Taq polimerase), Cloreto de magnésio (MgCl₂) e BSA (do inglês, *bovine serum albumin*). Todos estes componentes, já se encontram em *mixs* que constituem os *kits* de amplificação. (Fig. 8) (9,19)

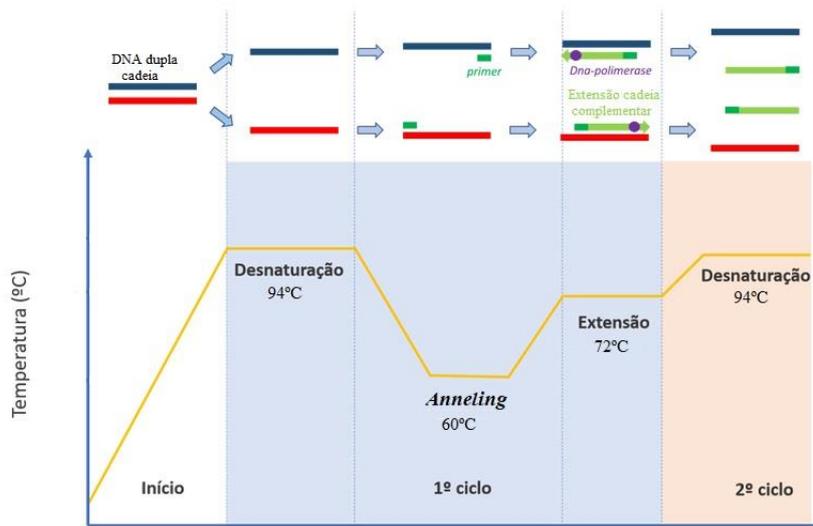


Figura 8: Esquemática da reação de amplificação por PCR.

A quantidade recomendada de DNA a utilizar com os *kits* de amplificação, para que a reação seja bem-sucedida é de 1,0ng de DNA. A partir dos resultados obtidos na etapa de quantificação, calcula-se o volume de amostra a adicionar à reação ou se é necessário proceder à sua diluição. É importante ter em atenção isto, pois DNA em excesso ou em pouca quantidade, pode levar, respetivamente, à formação de múltiplos artefactos ou à perda de alelos no eletroferograma. (5)

2.6. Análise dos Produtos Amplificados

Após a etapa de amplificação, segue-se o último passo laboratorial, a análise dos produtos amplificados. Para isso utiliza-se sequenciadores automáticos, que recorrem, a maioria das vezes, à técnica de eletroforese capilar. Com a utilização dos sequenciadores automáticos, os passos de injeção, separação e detecção são completamente automatizados, podendo ser analisado várias amostras sem intervenção do operador.

A técnica de eletroforese capilar tem por base a separação de moléculas através das diferenças de velocidade de migração quando atravessam um campo elétrico. Essa diferença de velocidade deve-se ao facto de as moléculas apresentarem tamanhos diferentes, sendo que os fragmentos de DNA mais pequenos movimentam-se mais facilmente através do polímero e, por isso, são os primeiros a serem detetados. Como as moléculas de DNA são carregadas negativamente, quando estas são aplicadas no eletrólito, do qual atravessa uma corrente, as moléculas vão migrar do polo negativo (cátodo) para o polo positivo (ânodo). Esta técnica necessita de pouca amostra, o que é vantajoso na área da Genética Forense, pois, por vezes as amostras possuem quantidades reduzidas de DNA. (19)

Durante a eletroforese, os fluorocromos, adicionados no passo de amplificação são excitados por um laser e emitem fluorescência. Posteriormente, a fluorescência será convertida num sinal eletrónico, proporcional ao número de fluorocromos existentes na amostra e à quantidade de luz que emite. Por fim, os sinais são medidos em unidades relativas de fluorescência (RFU) por um *software* adequando, formando os picos constituintes de um eletroferograma. (Fig. 9) (5,9)

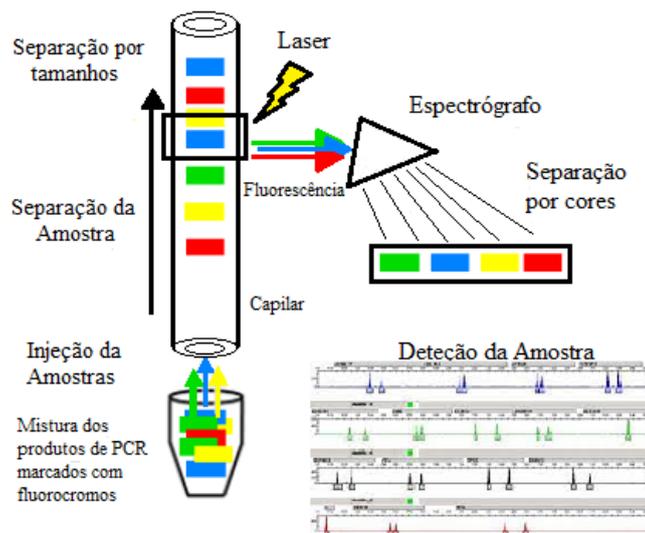


Figura 9: Esquemática da técnica de eletroforese capilar.

Na preparação das placas para aplicar no sequenciador automático, adiciona-se às amostras, formamida, de forma, a facilitar o processo de injeção, pois vai atuar como agente desnaturante, diminuindo os níveis de sais, que iriam competir com o DNA no capilar, e vai desnaturar a dupla cadeia de DNA. Aquando da preparação das placas também é adicionado a todas as amostras o *size standard*, que ao migrar juntamente com o DNA amplificado permite que o *software* determine o tamanho dos fragmentos em pares de base. Isto é possível, porque o *software* através dos tempos de migração dos fragmentos do *size standard* e sabendo os seus tamanhos, traça uma curva de calibração e juntamente com o tempo de migração das amostras, determina o seu tamanho. (5)

Por fim, também é adicionado em alguns poços das placas, que não possuem amostra, o *allelic ladder*, em que os perfis de STRs são conhecidos, e através de comparação vai permitir construir o perfil de DNA das amostras, na forma de eletroferograma. (5,9)

Experiência Adquirida

1. Metodologias Laboratoriais Realizadas

Todos os procedimentos descritos em baixo foram realizados com todos os cuidados necessários, de forma, a prevenir contaminações. Para isso, todos os reagentes e amostras foram manuseados com luvas e bata. Todas as amostras foram preparadas em câmaras de UV, devidamente descontaminadas antes e após a sua utilização, eliminando assim, qualquer possível vestígio de DNA de preparações anteriores.

1.1. Extração do DNA

Antes de recorrer aos diferentes *kits* de extração de DNA é necessário colocar as diferentes amostras em tubos, para posterior adição dos reagentes.

A **Tabela 1** esquematiza o método utilizado para preparar as amostras para o processo de extração de DNA.

Tabela 1: Metodologia de preparação das amostras para extração do DNA consoante o suporte utilizado para a sua colheita.

Tipo de amostra	Suporte/Estado da amostra	Método
Saliva	Zaragatoa Bucal	Corte da ponta da zaragatoa
Saliva/Sangue/Sémen	Papel FTA	Punchs 2 mm
Saliva/Sangue/Sémen	Tecido	Corte de uma porção com 25mm ²
Osso/Dente	Pó	Pesar a quantidade necessária
Unha	Unha	Corte da raiz da unha
Músculo	Músculo	Corte de uma porção com 3×3×5-mm ³

1.1.1. *Prep-n-Go™ Buffer*

A técnica de extração de DNA com o tampão *Prep-n-Go™* é tipicamente utilizada para amostras de saliva colhidas em zaragatoas bucais (*Whatman® FTA® Omni Swab*). O protocolo utilizado, foi o que se encontra em vigor no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do INMLCF, I.P..

Após colocar a amostra num tubo de 1,5mL, como descrito acima, adicionou-se 100µL de *Prep-n-Go™ Buffer* (*ThermoFisher - Applied Biosystems®*) e 100µL de Água *Nuclease-Free*. A cada extração foi adicionado um controlo negativo de extração, contendo apenas os reagentes.

De seguida, após as amostras terem sido agitadas no *vortex* durante 5-10seg., estas foram colocadas num termobloco, pré-aquecido, a 90°C durante 20min.. Por fim, as amostras foram identificadas e deixadas a arrefecer durante 20min. à temperatura ambiente, para posteriormente, serem armazenadas no congelador.

1.1.2. *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit*

A técnica de extração de DNA com o *kit PrepFiler Express™* é normalmente utilizada para amostras problema, estando estas em vários tipos de suporte. O protocolo utilizado, foi o que se em vigor no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do INMLCF, I.P..

Esta metodologia consiste na conjugação da lise celular promovida pelo tampão de lise, com a ligação das moléculas de DNA a um substrato magnético, que permitirá posteriormente, a eluição das moléculas de DNA purificadas e concentradas.

Após a amostra ter sido colocada em colunas *LySep™ Filter Column*, como descrito acima, preparou-se num tubo de *Falcon®* uma solução de lise. Essa solução de lise consiste em 500µL de *PrepFiler™ Lysis Buffer* e 5µL Ditiotreitól (DTT) (1M) por amostra. De seguida, adicionou-se 500µl da solução de lise a cada amostra e colocaram-se as amostras a incubar no termobloco, pré-aquecido, a 70°C, durante 40min., com agitação de 750rpm. A cada extração foi adicionado um controlo negativo de extração, contendo apenas os reagentes.

No período em que as amostras se encontram a incubar, preparou-se o equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System*. Este equipamento, permite realizar os vários passos do procedimento de extração de forma automatizada. Nomeadamente:

- 1) mistura do lisado com vários reagentes e com partículas magnéticas que se ligam ao DNA;

- 2) separação das partículas magnéticas ligadas ao DNA, do lisado com tampões de lavagem, removendo assim possíveis inibidores;
- 3) eluição do DNA concentrado e purificado com o tampão de eluição. (20)

Após a incubação, centrifugou-se as amostras durante 2min. a 10.000xg. Este passo permite separar o lisado do seu suporte (zaragatoa, papel, tecido, ...), ficando o lisado no fundo do tubo e o suporte da amostra na coluna.

De seguida, colocou-se os tubos contendo o lisado no equipamento e procedeu-se à extração, tendo uma duração de ± 30 min.. Por fim, identificou-se e armazenou-se as amostras no congelador.

1.1.3. *PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kit*

A técnica de extração de DNA com o *kit PrepFiler Express BTA™* é geralmente utilizada para amostras de ossos e dentes. Os protocolos utilizados é os definidos pelo fabricante do *kit*. (21)

Como a extração com o *kit PrepFiler Express™*, esta metodologia, também consiste na conjugação da lise celular, com a ligação das moléculas de DNA a um substrato magnético, permitindo assim a eluição das moléculas de DNA purificadas e concentradas.

Tendo em conta o grau de complexidade de extração de DNA em quantidade e qualidade suficiente, o fabricante do *kit* propõe 4 protocolos (Protocolo 1, Protocolo 2, Protocolo 3 e Protocolo 4), em que diferem entre si, na quantidade de cada reagente do *kit* e de amostra a utilizar. Em dois dos protocolos (Protocolo 2 e Protocolo 4) são necessários passos extra, de forma, a concentrar as amostras de DNA obtidas. No processo de validação recorreu-se aos quatro protocolos, propostos pelo fabricante. (22)

Primeiro começou-se por colocar no tubo *PrepFiler™ Bone and Teeth Lysate Tube* a quantidade necessária de amostra para realizar a extração. A **Tabela 2** indica as quantidades utilizadas de cada tipo de amostra de acordo com cada protocolo. (21)

Tabela 2: Quantidade de amostra necessária para o processo de extração, de acordo com o protocolo utilizado. (21,22)

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
	Amostras Fáceis	Amostras Difíceis	Amostras Difíceis	Amostras Muito Difíceis
Pó de Osso (mg)	50	50 x 4 alíquotas	150-200	50 x 4 alíquotas
Pó de Dente (mg)	50	50 x 4 alíquotas	150-200	50 x 4 alíquotas
Unha (mm²)	25	25 x 4 alíquotas	75	25 x 4 alíquotas
Músculo (mm²)	25	25 x 4 alíquotas	75	25 x 4 alíquotas

De seguida, preparou-se a solução de lise para cada um dos protocolos num tubo de *Falcon*[®]. As quantidades de reagentes utilizada para cada um dos protocolos encontra-se descrita na **Tabela 3**. A cada tubo *PrepFiler™ Bone and Teeth Lysate Tube* foi colocado o volume de solução de lise indicado para cada protocolo. A cada extração foi adicionado um controlo negativo de extração, contendo apenas os reagentes. (22)

Tabela 3: Quantidade de cada um dos reagentes da solução de lise a adicionar por amostra de acordo com o protocolo utilizado. (22)

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
	Amostras Fáceis	Amostras Difíceis	Amostras Difíceis	Amostras Muito Difíceis
<i>PrepFiler BTA™ Lysis Buffer</i> (µL)	220	220	660	220
<i>Proteinase K</i> (µL)	7	7	21	14
DTT (1M) (µL)	3	3	9	6
Volume Total (µL)	230	230	690	240

Agitou-se as amostras no *vortex* durante 5-10seg., e de seguida, todas as amostras, independentemente do protocolo a que correspondem, ficaram a incubar durante 2 horas, a 56°C, com agitação de 1.100rpm, no termobloco. Após o período de incubação, centrifugou-se todas as amostras durante 1min. a 10.000xg.

Transferiu-se o sobrenadante para um tubo *PrepFiler™ Sample Tube* tendo o cuidado de evitar o contacto com o sedimento, evitando assim, a existência de partículas de pó na amostra que pudessem prejudicar o processo de extração automatizado. Também se verificou que o volume transferido era o indicado para cada protocolo, para evitar a formação de bolhas no processo de extração automatizado. O volume indicado para cada protocolo, encontra-se estipulado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Volume de sobrenadante utilizado no processo de extração automatizada de acordo com o protocolo utilizado.

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
	Amostras Fáceis	Amostras Difíceis	Amostras Difíceis	Amostras Muito Difíceis
Volume de sobrenadante (µL)	200	200	500	200

No período em que as amostras se encontram a incubar, preparou-se o equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System*. Este equipamento, permite realizar os vários passos do procedimento de extração de forma automatizada. (20)

Colocou-se os tubos contendo o sobrenadante no equipamento e iniciou-se o processo de extração automatizada que tem a duração de ± 30 min..

Após os 30min. as amostras correspondentes ao Protocolo 1 e 3 foram identificadas e armazenadas no congelador. As amostras associadas ao Protocolo 2 e 4 seguem para o passo de concentração da amostra de DNA. Para isso, recorre-se aos filtros *Amicon® Ultra 0.5mL 100k*. (22)

Como no Protocolo 2 e 4 preparou-se 4 alíquotas, adicionou-se o volume obtido nas 4 alíquotas num único filtro *Amicon® Ultra-0.5*, inserido num tubo de microcentrifuga, obtendo assim cerca de 200 μ L de amostra. De seguida, coloca-se a centrifugar durante 8min. a 14.000xg. (23)

Posteriormente, retirou-se o filtro e virou-se ao contrário para um novo tubo de microcentrifuga (como indicado na **Fig.10**), e voltou-se a centrifugar durante 2min. a 1.000xg, obtendo um volume final 10-20 μ L. Por fim, identificou-se e armazenou-se as amostras no congelador. (23)

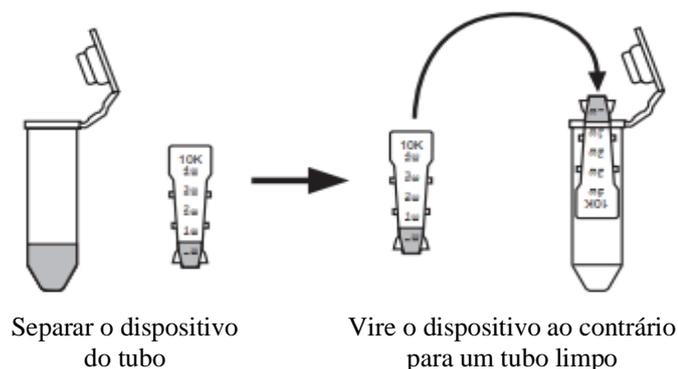


Figura 10: Representação gráfica do passo de preparação da recolha do DNA concentrado. (23)

1.2. Quantificação do DNA

1.2.1. *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit*

A quantificação das amostras de DNA foi realizada com o kit *Quantifiler™ Trio DNA Quantification*. O protocolo utilizado foi o que se encontra em vigor no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do INMLCF, I.P..

Primeiro preparou-se os *standards* para o traçar da curva de calibração, em tubos de microcentrifuga devidamente identificados. Para isso, fez-se uma serie de diluições com 5 concentrações distintas, como descrito na **Tabela 5**. Entre cada diluição agitou-se o *standard* no *vortex* durante 5-10seg..

Tabela 5: Serie de diluições para preparação dos *Standards*.

<i>Standard</i>	Concentração (ng/μL)	Volumes	Fator diluição
1	50	5μL <i>DNA Dilution Buffer</i> + 5μL <i>DNA Standard</i>	2x
2	5	5μL <i>Standard 1</i> + 45μL <i>DNA Dilution Buffer</i>	10x
3	0,5	5μL <i>Standard 2</i> + 45μL <i>DNA Dilution Buffer</i>	10x
4	0,05	5μL <i>Standard 3</i> + 45μL <i>DNA Dilution Buffer</i>	10x
5	0,005	5μL <i>Standard 4</i> + 45μL <i>DNA Dilution Buffer</i>	10x

De seguida, num tubo de 2mL, preparou-se uma solução de mistura com 10μL/amostra de *Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix* e 8μl/amostra de *Quantifiler™ Trio Primer Mix*. Após a adição dos reagentes, agitou-se a solução de mistura no *vortex* e adicionou-se 18μL a cada poço da *Optical 96-Well Reaction Plate* a ser utilizado com *standards*, amostras e controlos. A cada quantificação adicionou-se um controlo negativo contendo apenas a solução de mistura e dois controlos positivos com concentrações diferentes (0,1ng/μL e 2,0ng/μL).

Adicionou-se 2μL de *standard*, amostra e controlo, no poço com a coordenada que lhe corresponde. Tapou-se a placa com uma película adesiva *Optical Adhesive Film* e com o auxílio de um utensílio apropriado.

Por fim, colocou-se a placa no equipamento *7500 Real-Time PCR System* e obteve-se os resultados recorrendo ao *software HID Real-Time PCR Analysis Software* versão 1.2.

1.3. Amplificação do DNA

A amplificação de DNA foi realizada, para as primeiras duas validações, apenas com o *kit GlobalFiler™*. Para a última validação com o *kit GlobalFiler™*, com o *kit PowerPlex® Fusion 6C* e com o *kit YFiler™ Plus*. Em todas as amplificações realizadas, o protocolo utilizado foi o atualmente aplicado no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do INMLCF, I.P. de acordo com cada *kit* de amplificação.

1.3.1. *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit*

Este *kit* de amplificação é um dos mais utilizado devido ao seu grande poder de discriminação, pois é constituído por 24 marcadores, e por isso, foi utilizado em todas as validações. Este *kit* permite amplificar 22 STRs (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, DYS391, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338) em conjunto com a amelogenina e o *Y Indel*. (24)

Começa-se por preparar uma mistura que contém 3,75µL/amostra de *GlobalFiler™ Master Mix* e 1,25µL/amostra de *GlobalFiler™ Primer Set*. De seguida, adiciona-se 5µL da mistura a cada tubo *MicroAmp® Reaction tubes* a ser utilizado.

Através dos resultados da quantificação, foi definida a quantidade de DNA que deve ser adicionada à reação de amplificação, de forma, a perfazer um *input* de 1ng/µL. Quando necessário, adicionou-se *low TE* (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8.0) até perfazer um volume de 12,5µL.

A cada reação de amplificação foi adicionado um controlo positivo (5µL de mistura + 5µL de DNA *Control 007* (0,1ng/µL) + 2,5µL de *low TE*) e um controlo negativo (5µL de mistura + 7,5µL de *low TE*).

Selou-se com *MicroAmp® Caps* e colocou-se num termociclador *GeneAmp® PCR System 9700*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do *kit*, utilizando o programa de 26 ciclos. Na **Tabela 6** encontra-se especificado as condições do programa de PCR.

Tabela 6: Condições do programa de PCR utilizado para o *kit GlobalFiler™*. (24)

Incubação	26 ciclos		Extensão Final	Final
	Desnaturação	Annealing		
95°C	94°C	59°C	60°C	4°C
1 minuto	10 segundos	90 segundos	10 minutos	∞

1.3.2. *PowerPlex® Fusion 6C System*

Este *kit* de amplificação também é bastante discriminativo, sendo constituído por 27 marcadores. Este *kit* permite amplificar 26 STRs (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, **Penta E**, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, **Penta D**, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, SE33, D22S1045, DYS391, FGA, **DYS576**, **DYS570**) em conjunto com a amelogenina. Como parte dos *loci* analisados são em comum

com o *kit GlobalFiler™* isso permite aumentar o grau de confiança dos resultados obtidos, para além de aumentar a informação sobre o perfil de DNA das amostras. Sendo esse aspeto importante, quando se trata de amostras de restos cadavéricos, em que é difícil obter um perfil completo. (25)

Começa-se por preparar uma mistura que contém 2,5µL/amostra de *PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix* e 2,5µL/amostra de *PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix*. De seguida, adiciona-se 5µL da mistura a cada tubo *MicroAmp® Reaction tubes* a ser utilizado.

A partir dos resultados da quantificação, definiu-se a quantidade de DNA a adicionar à reação de amplificação, perfazendo um *input* de 1ng/µL. Quando necessário, adicionou-se *Water, Amplification Grade* até perfazer um volume de 12,5µL.

A cada reação de amplificação foi adicionado um controlo positivo (5µL de mistura + 1µL *2800M Control DNA* (10ng/µL) + 6,5µL de *Water, Amplification Grade*) e um controlo negativo (5µL de mistura + 7,5µL de *Water, Amplification Grade*).

Selou-se com *MicroAmp® Caps* e colocou-se num termociclador *GeneAmp® PCR System 9700*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do *kit*, utilizando o programa de 26 ciclos. Na **Tabela 7** encontra-se especificado as condições do programa de PCR.

Tabela 7: Condições do programa de PCR utilizado para o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*. (25)

Incubação	26 ciclos		Extensão Final	Final
	Desnaturação	Annealing		
96°C	96°C	60°C	60°C	4°C
1 minuto	5 segundos	1 minuto	10 minutos	∞

1.3.3. *YFiler™ Plus PCR Amplification Kit*

Este *kit* de amplificação permite identificar 25 Y-STRs (**DYS576**, **DYS389I**, **DYS635**, **DYS389II**, **DYS627**, **DYS460**, **DYS458**, **DYS19**, **YGATAH4**, **DYS448**, **DYS391**, **DYS456**, **DYS390**, **DYS438**, **DYS392**, **DYS518**, **DYS570**, **DYS437**, **DYS385 a/b**, **DYS449**, **DYS393**, **DYS439**, **DYS481**, **DYF387S1**, **DYS533**). Como todos os *loci* analisados são do cromossoma Y, permite traçar um perfil desse cromossoma. Isso é importante, pois pode ser utilizado para a identificação de restos cadavéricos, que por norma, são amostras em que o DNA já se encontra degradado, pois o cromossoma Y, devido ao seu tamanho reduzido, dura mais tempo sem ser degradado. Também permite a identificação através de amostras de referência de familiares diretos do sexo masculino, na ausência de amostras de referência da pessoa que se pretende identificar. (26)

Primeiro preparou-se uma mistura que contém 5,0µL/amostra de *YFiler PlusTM Master Mix* e 2,5µL/amostra de *YFiler PlusTM Primer Set*. Adiciona-se 7,5µL da mistura a cada tubo *MicroAmp[®] Reaction tubes* a ser utilizado.

Com os resultados da quantificação, calculou-se a quantidade de DNA a adicionar à reação de amplificação, de forma a ter *input* de 1ng/µL. Quando necessário, acrescentou-se *Water, Amplification Grade* até obter um volume final de 12,5µL.

Adicionou-se à reação de amplificação um controlo positivo (7,5µL de mistura + 1µL *DNA Control 007* (2,0ng/µL) + 4µL de *Water, Amplification Grade*) e um controlo negativo (7,5µL de mistura + 5µL de *Water, Amplification Grade*).

Por fim, selou-se com *MicroAmp[®] Caps* e colocou-se num termociclador *GeneAmp[®] PCR System 9700*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do *kit*, utilizando o programa de 26 ciclos. Na **Tabela 8** encontra-se especificado as condições do programa de PCR.

Tabela 8: Condições do programa de PCR utilizado para o *kit YFilerTM Plus*. (26)

Incubação	26 ciclos		Extensão Final	Final
	Desnaturação	Annealing		
95°C	94°C	61,5°C	60°C	4°C
1 minuto	4 segundos	1 minuto	22 minutos	∞

1.4. Análise dos Produtos Amplificados

Após o processo de amplificação é necessário que os produtos obtidos sejam separados e posteriormente, analisados, permitindo assim a distinção entre alelos e a obtenção de um perfil genético. Para separar os produtos obtidos, recorre-se à eletroforese capilar no sequenciador *3500 Genetic Analyser*.

O protocolo utilizado é o aplicado pelo Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, do INMLCF, I.P.. Para os três *kits* de amplificação o protocolo, nesta etapa, é bastante idêntico, deferindo apenas nos reagentes que são adicionados.

Começou-se por preparar uma mistura de reagentes num tubo de 2mL, de acordo com a informação apresentada pela **Tabela 9**.

Tabela 9: Preparação da mistura de reagentes a utilizar na eletroforese capilar de acordo com cada *kit*. (24–26)

Quantidade (µL/amostra)	Tipo de reagente	<i>Kit GlobalFiler™</i>	<i>Kit Powerplex® Fusion 6C</i>	<i>Kit YFiler™ Plus</i>
12,5		<i>Hi-Di™ formamide</i>		
0,5	<i>Size Standard</i>	<i>600 LIZ™</i>	<i>WEN ILS 500</i>	<i>600 LIZ™</i>

De seguida, a cada poço da *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* a ser utilizado, transferiu-se 13µL da mistura preparada especificamente para cada *kit* e 1µL do produto amplificado ou do *Ladder* Alélico específico para cada *kit*.

A placa foi colocada no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* para as amostras serem desnaturadas a 95°C durante 3min., sendo logo de seguida aplicadas no sequenciador automático *3500 Genetic Analyser*.

A análise dos resultados obtidos foi feita com recurso ao *software GeneMapper™ ID-X Software*, versão 1.4.

2. Colaboração no Processo de Validação

2.1. Validação do *kit* de Extração de DNA *PrepFiler Express™* em Amostras de Referência

No Serviço de Genética e Biologia Forense as metodologias validadas e utilizadas para a extração de DNA de amostras de referência são, a utilização do tampão *Prep-n-Go™ Buffer* para amostras de referência de saliva e amplificação direta, através de *punch* adicionando assim as amostras de sangue em papel FTA (*Whatman® FTA® Card*) diretamente na reação de amplificação.

Com esta validação, pretendeu-se demonstrar que o *kit* de extração de DNA *PrepFiler Express™*, também permite extrair essas mesmas amostras de DNA, obtendo perfis genéticos com a qualidade com que se obtém com as metodologias anteriormente validadas.

Para realizar esta validação, recorreu-se a amostras de sangue já utilizadas em perícias anteriores, sendo que se utilizou amostras de sangue de testes de paternidade e amostras de sangue de referência para restos cadavéricos, em papel FTA (*Whatman® FTA® Card*). Também se utilizou amostras de saliva colhidas voluntariamente através de zaragatoas bucais (*Whatman® FTA® Omni Swab*) fazendo uma raspagem da mucosa bucal a familiares. De forma a garantir a qualidade dos

resultados, também se extraiu o DNA de amostras de sangue de Materiais de Referência Certificados (MRC). Nenhuma das amostras utilizadas foi colhida ou utilizada sem o consentimento prévio. De forma, a garantir a anonimização das amostras, foi atribuído um código a todas amostras, sendo este utilizado ao logo de todo o processo de validação.

As amostras de controlo de qualidade e as amostras de testes de paternidade apenas se extraiu o DNA com o *kit PrepFiler Express™*, sendo os resultados obtidos para as amostras de paternidade comparados com os resultados obtidos anteriormente por amplificação direta.

As amostras de referência para restos cadavéricos e as amostras de saliva foram extraídas com o tampão *Prep-n-Go™ Buffer* e com o *kit PrepFiler Express™*, sendo os resultados obtidos para ambos os *kits* comparados entre si.

Todas as amostras foram amplificadas com o *kit GlobalFiler™* e procedidos à análise dos produtos amplificados. Não foi necessário realizar a etapa de quantificação, porque todas as amostras têm carácter de amostras de referência e como tal foi considerado que todas elas continham DNA em quantidade e qualidade suficiente para prosseguir com a amplificação.

2.2. Validação do kit de Extração de DNA *PrepFiler Express BTA™* em Amostras Difíceis

No Serviço de Genética e Biologia Forense, o DNA é extraído nas amostras problemas de sangue, saliva e fluidos vaginais, com recurso ao *kit PrepFiler Express™*, sendo que esta metodologia já se encontra validada.

Com esta validação, pretendeu-se demonstrar que extraíndo o DNA, destas mesmas amostras, mas com recurso ao *kit PrepFiler Express BTA™* com o protocolo proposto para amostras fáceis, se obteria perfis genéticos, com a qualidade com que se obtém extraíndo com o *kit PrepFiler Express™*.

Para esta validação recorreu-se a amostras de referência de sangue de testes de paternidade e amostras de sangue de referência para restos cadavéricos, sendo as mesmas que se utilizou na validação anterior. Também se recorreu a amostras de saliva colhidas voluntariamente através de zaragatoas bucais (*Whatman® FTA® Omni Swab*) fazendo uma raspagem da mucosa bucal a familiares. De forma, a garantir a qualidade dos resultados, também se extraiu o DNA de amostras de sangue de Materiais de Referência Certificados (MRC). Para simular as amostras problemas que muitas vezes surgem em perícias criminais, aproveitou-se amostras de sangue, saliva e sémen, em tecidos, de trabalhos anteriores, sendo os tecidos de vários tipos, como ganga, lã, poliéster, etc. Para o mesmo tecido existia mancha de sangue, mancha de saliva e mancha de sémen, tendo cada uma

das amostras três versões, manchas originais, lavagem com detergente e lavagem com lixívia. Nenhuma das amostras utilizadas foi colhida ou utilizada sem o consentimento prévio. De forma, a garantir a anonimização das amostras, foi atribuído um código a todas amostras, sendo este utilizado ao logo de todo o processo de validação.

De forma, a avaliar a sensibilidade do método, também se utilizou manchas de sangue, saliva e sémen em papel FTA (*Whatman® FTA® Card*), sendo que se utilizou para cada material biológico uma serie de diluições: Original, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:5000 e 1:10.000. Estas amostras também foram reaproveitadas de trabalhos anteriores.

Também se procedeu a avaliação da reprodutibilidade do método através de várias extrações das amostras de sangue de referência para restos cadavéricos em dias diferentes, de forma, a demonstrar que obtém-se sempre quantidades idênticas de DNA para uma mesma amostra.

Todas as amostras foram extraídas com o *kit PrepFiler Express™* e com o *kit PrepFiler Express BTA™*, quantificadas com o *kit Quantifiler™ Trio*, e tendo em conta os resultados obtidos na quantificação, foram amplificadas com o *kit GlobalFiler™* e procedida á sua análise dos produtos amplificados.

Para todas as amostras, comparou-se os resultados obtidos, na etapa de quantificação e na análise dos produtos amplificados, das amostras extraídas com o *kit PrepFiler Express™* com os resultados obtidos, nas mesmas etapas, para as amostras extraídas com o *kit PrepFiler Express BTA™*.

2.3. Validação do *kit* de Extração de DNA *PrepFiler Express BTA™* em Amostras de Restos Cadavéricos

No Serviço de Genética e Biologia Forense, o DNA de amostras provenientes de cadáveres e restos cadavéricos, é extraído com recurso ao *kit PrepFiler Express BTA™*. Como tal foi necessário proceder à validação do método, bem como à validação da utilização deste método para amostras provenientes de restos cadavéricos.

Para esta validação recorreu-se a amostras de ossos, dentes, unhas e músculo de perícias anteriores para identificação de cadáveres e restos cadavéricos. As amostras de ossos e dentes, como já tinham sido utilizadas anteriormente, já se encontravam em pó, não tendo sido necessário proceder à sua preparação, podendo ser logo extraído o DNA. De forma, a garantir a anonimização das amostras, foi atribuído um código a todas amostras, sendo este utilizado ao logo de todo o processo de validação.

Todas as amostras foram extraídas com o *kit PrepFiler Express BTA™*. As amostras de osso, músculo e uma das amostras de dente foram extraídas com os 4 protocolos propostos. Uma das amostras de dente, como não tinha quantidade suficiente, foi apenas extraída com o Protocolo 1. As amostras de unhas, como eram 4 Protocolos e 4 amostras diferentes, foi extraído por protocolo uma amostra diferente, ou seja, Unha 1 extraiu-se com o Protocolo 1, Unha 2 com o Protocolo 2, Unha 3 com o Protocolo 3 e Unha 4 com o Protocolo 4.

Todas as amostras foram quantificadas com o *kit Quantifiler™ Trio* e tendo em conta os resultados para o DNA humano e DNA masculino obtidos foram amplificadas com os *kits GlobalFiler™, PowerPlex® Flusion 6C e YFiler™ Plus*. Posteriormente, procedeu-se à análise dos produtos amplificados.

Os resultados da quantificação obtidos para as amostras extraídas, com os 4 protocolos, foram comparados entre si. No caso dos resultados obtidos para a análise de fragmentos, ou seja, os perfis genéticos obtidos, procedeu-se a três comparações distintas, para cada uma das amostras:

- Comparou-se para um mesmo *kit* de amplificação, os resultados obtidos com os 4 protocolos de extração;
- Comparou-se para um mesmo protocolo de extração, os resultados obtidos para cada um dos *kits* de amplificação;
- Comparou-se os resultados obtidos, com os perfis obtidos durante a perícia de identificação de cadáver ou restos cadavéricos.

Discussão e Conclusão

Durante o período de estágio, procedeu-se a vários processos de validação, sendo descrito e discutido a parte laboratorial associada. Nas validações recorreu-se a metodologias de extração de DNA distintas, tendo se comparado os resultados obtidos, com as diferentes metodologias, para as mesmas amostras.

Na primeira validação, extraiu-se o DNA das amostras de referência de saliva com o tampão *Prep-n-Go™ Buffer* e com o kit *PrepFiler Express™*. A metodologia que recorre ao uso do tampão *Prep-n-Go™ Buffer* permite obter o DNA das amostras, para posterior análise, de uma forma mais rápida e fácil, mas como não requer a filtração da amostra, de forma, a retirar o suporte da amostra, faz com que a amostra extraída contenha algumas impurezas. Já isso não ocorre na metodologia que recorre ao kit de extração de DNA *PrepFiler Express™*, pois após a reação de lise, as amostras são centrifugadas, fazendo com que o lisado atravesse uma coluna, separando assim, o lisado do suporte da amostra. Também na metodologia com o kit de extração *PrepFiler Express™*, como os últimos passos ocorrem de forma automatizada e recorrendo a partículas magnéticas, isso torna-o um método mais vantajoso, pois reduz os erros originados pelo operador e obtém uma amostra com menos impurezas e inibidores da reação de PCR. Isso também é observado nos eletroferogramas obtidos para cada um dos kits, pois os obtidos para as amostras extraídas com o kit *PrepFiler Express™* encontravam-se mais “limpos”. A desvantagem da utilização do kit *PrepFiler Express™* é que é um método mais demorado, uma metodologia ligeiramente mais complexa e requer o uso de equipamentos, que por si só, tem custos inerentes, para além que requer o uso de muito material de uma só utilização, sendo descartado após utilização.

Na segunda validação, extraiu-se o DNA de amostras de referência de sangue, sémen e saliva e amostras de sangue, sémen e saliva em tecido (simulação de amostras problema de perícias criminais) com o kit *PrepFiler Express™* e com o kit *PrepFiler Express BTA™*. A metodologia para cada um dos kits é muito idêntica, sendo que as maiores diferenças é que com o kit *PrepFiler Express BTA™* é necessário adicionar um reagente extra (Proteinase K) à reação de lise e que esta é muito mais demorada. Para ambos os kits a quantidade de DNA obtido para a mesma amostra é semelhante, assim como a quantidade de alelos identificados nos eletroferogramas obtidos e a exatidão com que eram identificados, sendo que os alelos identificados, quando para o mesmo STR, eram iguais para ambos os kits de extração. Ou seja, os kits são muito semelhantes sendo apenas desvantajoso a utilização do kit *PrepFiler Express BTA™* porque requer mais tempo, obtendo no final resultados análogos ao kit *PrepFiler Express™*.

Na última validação, extraiu-se o DNA de amostras de restos cadavéricos com 4 protocolos propostos pelo fabricante para o kit *PrepFiler Express BTA™*, como descrito no tópico relativo a este

kit, no capítulo “Experiência Adquirida”. Os 4 protocolos apresentam algumas diferenças na sua metodologia, nomeadamente, na quantidade de cada reagente que é adicionada, a quantidade de amostra, o número de alíquotas, o tempo da reação de lise e a necessidade ou não de proceder à concentração das amostras. O Protocolo 4 foi desenvolvido com o intuito de extrair o DNA de amostras muito difíceis e para tal necessita de mais quantidade de cada reagente, de uma maior quantidade de amostra, pois é necessário realizar pelo menos 4 alíquotas para posteriormente, se puder proceder à sua concentração. Este protocolo também pode necessitar um maior tempo de reação de lise, podendo ficar a reagir *overnight*. Mesmo apresentando desvantagens, como a necessidade de mais reagentes e de amostra, a necessidade de passos extra para concentrar as amostras e requerer de mais tempo, o Protocolo 4 é vantajoso porque permite obter eletroferogramas com mais alelos identificados, para os 3 *kits* de amplificação. Já o Protocolo 1, é o oposto do Protocolo 4 pois, necessita de menos reagentes, menos amostra e menos tempo de reação de lise, para além de não ser necessário concentrar as amostras, mas em termos de resultados no eletroferograma é o que apresenta menos alelos identificados. Os Protocolos 2 e 3, são equivalentes entre si e considerando os aspetos mencionados, são um intermédio entre o Protocolo 1 e o Protocolo 4. Resumindo, os 4 protocolos têm as suas vantagens e desvantagens e por isso, é importante antes de proceder à extração do DNA das amostras, seleccionar qual dos protocolos, melhor se adequa as amostras que se pretende extrair o DNA. Por exemplo, se a amostra que se pretende extrair é um osso e contém quantidade suficiente para se extrair com o Protocolo 4, é preferível esta opção, pois os ossos, são considerados amostras difíceis. Por outro lado, se a amostra for uma unha, do qual se verificou que com todos os protocolos se obteve bons resultados (quando estas não se encontravam bastante degradadas), é suficiente extrair com o Protocolo 1.

Durante a realização das validações ficou evidente a existência e o cumprimento de todas as normas que permitem uma boa gestão e controlo de qualidade, do Serviço de Genética e Biologia Forense. Também foi notório a implementação de cuidados para garantir a protecção dos dados associados as amostras, desde a sua anonimização, através da atribuição de um número a cada uma das amostras, que servirá para as identificar ao longo de todo o processo de análise. Outro aspeto que demonstra os cuidados aplicados para garantir a protecção da informação e das pessoas associadas as amostras, é a necessidade de todas as pessoas com autorização para realizar estágio ou estudos de investigação, assinem um termo de responsabilidade onde garantam o completo sigilo de toda a informação a que poderão ter acesso, associada a alguma perícia. Outro aspeto positivo a salientar, é a boa organização do Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Norte, sendo isso observado, na arrumação e identificação de todos os materiais, equipamentos e reagentes; no facto de ser atribuído a cada profissional determinadas funções; no cuidado em registar todo o material aberto, utilizado, e acabado na preparação das amostras; entre outras coisas.

Este Estágio Curricular permitiu acompanhar o dia a dia do Serviço de Genética e Biologia Forense, realizar uma grande parte das metodologias utilizadas, acompanhar todos os passos associados à análise das amostras, desde a sua extração, à análise dos seus fragmentos, para além de melhorar os conhecimentos tanto teóricos como práticos na área da Genética Forense. O estágio também permitiu desenvolver *soft skills* como a comunicação e postura junto de colegas de trabalho e superiores hierárquicos e a responsabilidade e rigor a ter, ao proceder ao processamento e análise dos resultados das amostras. O estágio também permitiu aprender como trabalhar com *softwares* de análise como o *HID Real-Time PCR Analysis Software* e *GeneMapper ID-X Software*, permitiu trabalhar com equipamentos como sequenciadores, robôs de extração automatizada e equipamentos para Real-Time PCR.

Em retrospectiva a experiência destes 9 meses a estagiar no Serviço de Genética e Biologia Forense foi bastante enriquecedora, sendo uma mais-valia para o curso, pois permite complementar os conhecimentos lecionados.

Referências

1. Ministério da Justiça. Decreto de Lei n.º 166/2012 [Internet]. Diário da República, N.º147; 2012 p. 3951–7. Available from: <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/166/2012/07/31/p/dre/pt/htm>
2. Ministério das Finanças e da Justiça. Portaria n.º 19/2013 [Internet]. Diário da República, N.º14; 2013 p. 427–31. Available from: <https://data.dre.pt/eli/port/19/2013/01/21/p/dre/pt/html>
3. INMLCF. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses [Internet]. 2014. Available from: <https://www.inmlcf.mj.pt/>
4. NP EN ISO/IEC17025. Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaios e Calibração. 2018.
5. John M. Butler. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Elsevier; 2011.
6. A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, S. B. Carroll JD. Introdução à Genética, Cap.7. 11ª edição. Guanabara Koogan; 2009.
7. Shutterstock. Portfólio de fotos e imagens [Internet]. 2003. Available from: <https://www.shutterstock.com/pt/g/designua>
8. Pinheiro, Maria de Fátima et. al. CSI criminal, Cap. 4. Universidade Fernando Pessoa; 2008. 83–94 p.
9. Pinheiro, Maria de Fátima Terra et. al. Genética Forense: Perspectivas da Identificação Genética. Universidade Fernando Pessoa; 2010.
10. Pinheiro, Maria de Fátima Terra et. al. CSI criminal, Cap.1. 1ª edição. Pessoa UF, editor. Universidade Fernando Pessoa; 2008. 11–40 p.
11. John M. Butler. Forensic DNA Typing. 2ª edição. Elsevier; 2005.
12. Corte-Real F, Vieira DN. Princípios de genética forense [Internet]. Imprensa da Universidade de Coimbra, editor. 2015. Available from: <http://hdl.handle.net/10316.2/38492%0D>

13. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses IP. Normas Específicas de Recolha de Amostras no âmbito da Base de Dados de Perfis de ADN (NP-INMLCF-002). 2013.
14. Applied Biosystems. AmpFlSTR™ Identifiler™ Direct PCR Amplification Kit. Thermo Fisher Scientific; 2018.
15. Applied Biosystems. Ficha de Dados de Segurança: 4441405. Thermo Fisher Scientific; 2020.
16. Caldeira MJE. Avaliação dos níveis de ADN recuperado de amostras ósseas forenses através da otimização do método de extração semi-automatizado [Internet]. Universidade de Aveiro; 2018. Available from: <http://hdl.handle.net/10773/25439>
17. Topçu AA, Aşır S, Türkmen D. DNA Purification by Solid Phase Extraction (SPE) Methods. Vol. 44. Hacettepe J. Biol. & Chem.; 2016. p. 259–66.
18. Applied Biosystems. Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits. Thermo Fisher Scientific; 2018.
19. John M. Butler. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Elsevier; 2009.
20. Applied Biosystems. AutoMate Express™ Instrument User Guide. Thermo Fisher Scientific; 2019.
21. Applied Biosystems. PrepFiler Express™ and PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kits. Thermo Fisher Scientific; 2010.
22. Applied Biosystems. Protocol for DNA extraction from Bone Powder using the PrepFiler™ BTA Express Kit. Thermo Fisher Scientific;
23. Millipore. Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices. 2011.
24. Applied Biosystems. GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits. Thermo Fisher Scientific; 2019.
25. Promega Corporation. PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers. 2018.
26. Applied Biosystems. YFiler™ Plus PCR Amplification Kit. 2019.