



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Paula Mihaiu

ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES
SUPORTES DE COLHEITA PARA
AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Dissertação no âmbito do Mestrado de Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pela Senhora Doutora Vanessa Raquel Branco Bogas e pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Novembro de 2020

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Paula Mihaiu

ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES SUPORTES DE COLHEITA PARA AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Dissertação no âmbito do Mestrado de Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pela Senhora Doutora Vanessa Raquel Branco Bogas e pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Novembro de 2020

Agradecimentos

A presente dissertação teve por base o contributo direto e indireto de inúmeras pessoas, cujo incentivo e dedicação foram fulcrais para a sua concretização.

Declaro os meus perenes e estimados agradecimentos:

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves, orientador e coordenador do Mestrado de Medicina Legal e Ciências Forenses, pelo acompanhamento, disponibilidade cordial e apreciação científica e exigente do projeto.

À coorientadora Doutora Vanessa Vogas, pela sua incessante devoção e paciência, bem como pelas recomendações científicas e conhecimentos enriquecedores proporcionados, imprescindíveis para a finalização deste projeto, à qual expresso a minha eterna gratidão.

À Dra. Filipa Balsa, pela sua sincera dedicação, incentivo, orientação e conselhos insubstituíveis, aos quais estarei, para sempre, grata.

À Diretora do Serviço de Genética e Biologia Forenses, Lisa Sampaio, pela sua integração no laboratório e auxílio prestado no decorrer da realização desta dissertação.

Ao Dr. Armando Serra, Dra. Ana Margarida Bento, Dra. Maria João Porto, Dra. Virgínia Lopes, Dra. Marta São-Bento e aos restantes colaboradores, pela sabedoria transmitida e pelo auxílio prestado neste meu percurso académico.

À Fátima Cristina da Silva, pelo seu incentivo perseverante e motivação ímpar, que pintou este meu trilho com coragem, força e energias positivas.

Ao Afonso Brito Costa, pelo carinho, companhia e apoio incondicional.

Um agradecimento especial à minha família, pelo amor absoluto e pela confiança em mim depositados. Serão sempre a minha fonte de inspiração e perseverança para a aquisição de todos os meus sonhos.

Agradeço ao Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP., pela oportunidade de realizar o estágio no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Resumo

A colheita de evidências forenses e a extração do material genético nestas contido são os passos mais relevantes do processo de determinação do perfil genético de um indivíduo.

Com este trabalho, pretendeu-se verificar a rentabilidade de extração do *Kit Casework Direct* (PROMEGA), comparativamente ao *Kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (AB)*, verificar a compatibilidade com a química dos reagentes envolvidos nos diversos passos da obtenção de um perfil genético, como a extração diferencial, testes de orientação e confirmação para sémen, quantificação, amplificação, separação e deteção de produtos amplificados e otimizar protocolos para adaptação deste *kit* à rotina de laboratórios forenses. Teve ainda por objetivo verificar o desempenho da zaragatoa de nylon, como dispositivo de colheita para evidências forenses de natureza sexual, em comparação à zaragatoa viscosa utilizada para recolha pelo INMLCF.

O *Kit Casework Direct* demonstrou ser compatível com o teste de orientação (*SERATEC PSA Semiquant*) e confirmação (Técnica de Coloração *Christmas Tree*) para sémen e com os sistemas *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction*, *Quantifiler Trio DNA Quantification* e *Powerplex Fusion 6C System*. Todavia, demonstrou ser incompatível com o *kit* de extração diferencial *I-sep*. Embora utilize um protocolo mais simplificado e menos duradouro, o *Kit Casework Direct* não é adequado para amostras forenses com reduzida quantidade de material genético. O *Kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction* mostrou ser mais adequado para este tipo de amostras, apresentando um rendimento muito superior. A introdução de água destilada otimizou o processo de extração, e o percurso da amostra na cassette de *SERATEC*. Além disso, a mistura de *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen apresentou testes preliminares viáveis até duas semanas de armazenamento.

Relativamente às zaragatoas testadas, a zaragatoa de nylon apresentou uma maior eficácia na eluição do material genético para a solução, em comparação à zaragatoa de viscosa.

PALAVRAS-CHAVE: *Kit Casework Direct*; *Kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction*; Zaragatoa de nylon; Zaragatoa de viscosa; Sémen; Agressão sexual.

Abstract

The collection of forensic evidence and the extraction of the genetic material contained therein are the most relevant steps in the process of determining the genetic profile of an individual.

This work aimed to verify the extraction effectiveness of the Casework Direct Kit (PROMEGA), compared to the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (AB) Kit, to verify the compatibility with the chemistry of the reagents involved in the various steps of obtaining a genetic profile, such as differential extraction, orientation and confirmation tests for semen, quantification, amplification, separation and detection of amplified products and optimize protocols for adapting this kit to the routine of forensic laboratories. It also aimed to verify the performance of the nylon swab as a collection device for forensic evidence of a sexual nature, in comparison to the viscose swab used for collection by the INMLCF.

The Casework Direct kit proved to be compatible with the orientation (SERATEC PSA Semiquant) and confirmation (Christmas Tree Coloring Technique) tests for semen with the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (the Automate Express Forensic DNA Extraction), Quantifiler Trio DNA Quantification and Powerplex Fusion 6C System. However, it proved to be incompatible with the I-sep differential extraction kit. Although using a simplified and less durable protocol, the Casework Direct Kit is not suitable for forensic samples with a reduced amount of genetic material. The PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit proved to be more suitable for this type of samples, presenting a much higher yield. The introduction of distilled water optimized the extraction process and the run on the SERATEC cassette. In addition, the mixture of Casework Direct Reagent, distilled water and semen showed viable preliminary tests up to two weeks of storage.

Regarding the swabs tested, the nylon swab showed greater efficiency in eluting the genetic material into the solution, compared to the viscose swab.

KEYWORDS: Casework Direct Kit; PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit; Nylon swab; Viscose swab; Semen; Sexual assault.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Índice de Gráficos	xxi
Lista de Siglas e Abreviaturas	xxiii
1 Introdução	1
1.1 Princípios da Genética Forense	1
1.1.1 Introdução à tipagem de DNA	1
1.2 Determinação de perfis de DNA	2
1.2.1 Fluxo de trabalho laboratorial das amostras.....	2
1.2.2 Extração de DNA de amostras problema	3
1.2.3 Extração diferencial de DNA	5
1.2.4 Quantificação DNA extraído.....	5
1.2.5 Amplificação de DNA por PCR.....	8
1.2.6 Separação e detecção de produtos amplificados.....	9
1.3 Amostras em contexto forense	11
1.3.1 Contextualização	11
1.3.2 Evidências forenses: sémen	11
1.3.3 Testes de orientação e de confirmação do sémen	13
1.4 Zaragatoas de nylon vs zaragatoas de viscose	14
2 Justificação e Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Especificos	17
3 Material e Métodos	19
3.1 Preparação de amostras	19
3.1.1 Preparação das amostras de sémen.....	19
3.1.2 Preparação das amostras mistura, contendo saliva e sémen.....	20
3.2 Metodologias de extração	20

3.2.1	Extração com o <i>Kit Casework Direct</i>	20
3.2.2	Extração com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> , no <i>Automate Express Forensic DNA Extraction System</i> , <i>Applied Biosystem</i>	22
3.3	Metodologia de extração diferencial	24
3.3.1	Protocolo controlo: Extração diferencial <i>I-sep</i> , da <i>Biotype</i> , a partir de um meio sólido (zaragatoa com sémen e saliva).....	24
3.3.2	Protocolo modificado: Extração diferencial <i>I-sep</i> , da <i>Biotype</i> , + <i>Casework Direct</i> , da <i>Promega</i> a partir de 50µl da amostra extraída com <i>CWD</i>	25
3.4	Testes preliminares	25
3.4.1	Teste de orientação para sémen – <i>SERATEC PSA Semiquant</i>	26
3.4.2	Teste de confirmação – Coloração <i>Christmas Tree</i> para visualização ao microscópio	27
3.5	Metodologia de quantificação	29
3.5.1	Quantificação com o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i>	29
3.6	Metodologia de amplificação	30
3.6.1	<i>Kit Powerplex Fusion 6C System</i>	30
3.7	Separação dos fragmentos amplificados.....	31
3.8	Parâmetros estudados	32
3.8.1	Metodologia dos processos experimentais para a implementação do <i>kit Casework Direct</i> na rotina laboratorial.....	32
3.8.2	Estudo comparativo entre o <i>Kit Prepfiler Forensic DNA Extraction</i> usado na rotina laboratorial de SGBF-C e a extração com o <i>Kit Casework Direct</i>	35
3.8.3	Estudo comparativo entre as zaragatoas de nylon e as zaragatoas de viscoso usando o sémen, como fluido biológico	36
3.8.4	Estudo da compatibilidade entre o <i>kit Casework Direct</i> e o <i>kit</i> de amplificação <i>PowerPlex Fusion 6C System</i>	36
4	Resultados e Discussão	37
4.1	Metodologia dos processos experimentais para a implementação do <i>Kit Casework Direct</i> na rotina laboratorial.....	37
4.1.1	Experiência 1: Testar a compatibilidade do <i>Kit Casework Direct</i> com o teste de orientação <i>SERATEC PSA Semiquant</i> , Técnica <i>Christmas Tree</i> e com o <i>Kit Quantifiler Trio</i>	37
4.1.2	Experiência 2: Influência da temperatura de incubação na realização do Teste de Orientação <i>SERATEC PSA Semiquant</i>	41
4.1.3	Experiência 3: Testar o protocolo modificado de extração usando o <i>Kit Casework Direct</i> , por comparação ao protocolo recomendado pela <i>PROMEGA</i> ..	43
4.1.4	Experiência 4: Testar a compatibilidade do <i>kit</i> de extração diferencial <i>I-sep</i> , da <i>Biotype</i> , com o <i>kit</i> de extração <i>Casework Direct</i> , da <i>PROMEGA</i>	47

4.1.5 Experiência 5: 1) Testar o tipo de armazenamento das zaragatoas de nylon (congeladas à temperatura de -25°C e secas à temperatura ambiente) ao nível da deteção da PSA; 2) Testar a estabilidade da solução água+CWD+sémen para a semana 0, 1 e 2 ao nível da deteção da PSA e da integridade dos espermatozoides
49

4.2	Estudo comparativo entre o <i>Kit Prepfilers Forensic DNA Extraction</i> usado na rotina laboratorial de SGBF e a extração com o <i>Kit Casework Direct</i>	57
4.3	Estudo comparativo entre as zaragatoas de nylon e as zaragatoas de viscoso usando o sémen, como fluido biológico	64
4.4	Estudo da compatibilidade entre o <i>Kit Casework Direct</i> e o <i>kit</i> de amplificação <i>PowerPlex Fusion 6C System</i>	67
5	Conclusões	69
6	Considerações Finais	73
7	Bibliografia	75
8	Anexos	83

Índice de Figuras

Figura 1 Visão geral da biologia, tecnologia e componentes genéticos utilizados na tipagem de DNA usando marcadores de repetição curta em tandem (STR). ⁸	3
Figura 2 Protocolo de extração usando o <i>kit Casework Direct</i> . ¹⁴	4
Figura 3 Esquema representativo da quantificação em tempo real com o <i>Quantifiler Trio DNA Quantification Kit</i> (AB). ⁷	6
Figura 4 Gráfico representativo das três fases da quantificação por PCR em tempo real, a fase da amplificação geométrica ou exponencial, a fase de amplificação linear e a fase plateau, que tem como variáveis, a fluorescência e o número de ciclos. ⁸	7
Figura 5 Variações da temperatura durante os ciclos de PCR. O ciclo de PCR compreende 3 fases: 1. A fase de desnaturação, 94°C; 2. A fase de <i>annealing</i> , 60°C e 3. A fase da extensão, 72°C. Cada ciclo é repetido de 25 a 35 vezes. ⁸	9
Figura 6 Esquema representativo de multiplex PCR, onde se utiliza dois ou mais conjuntos de <i>primers</i> na mesma mistura de reação. No esquema estão representados três conjuntos de <i>primers</i> , representados por setas, responsáveis por amplificar três <i>loci</i> diferentes (A, B e C). Os <i>primers</i> foram desenhados de forma a que os produtos de PCR dos <i>loci</i> A, B e C fossem de tamanhos diferentes, de forma a serem possíveis de separar com base no seu tamanho. ⁸	10
Figura 7 Imagens obtidas com o microscópio eletrônico de varrimento (MEV) das fibras das zaragoas testadas: (A) zaragatoa de viscose (B) zaragatoa de nylon. Varredura de microscópio eletrônico ⁶⁷	15
Figura 8 Zaragoas de viscose e nylon. (A) Zaragatoa estéril com haste em plástico e ponta em viscose descartável, da <i>Goodwood Medical Care Ltd.</i> (Ref.:GW-1237R). (B) Zaragatoa estéril com haste em plástico e ponta de nylon descartável (4N6FLOQSWABSTMREGULAR), da <i>COPAN Flock Technologies</i> (Ref.:4473979).	19
Figura 9 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das amostras de Z1 a Z8, extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , usando 400µl de Reagente <i>Casework Direct</i> , sem a presença de <i>thioglycerol</i>	37
Figura 10 Visualização de cabeças de espermatozoides das amostras Z1 a Z8, extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , utilizando a Técnica de Coloração <i>Christmas Tree</i> . As setas apontam para cabeças de espermatozoides presentes em cada amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	39

Figura 11 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das amostras de Z1' a Z8', extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , usando 400µl de Reagente <i>Casework Direct</i> e 2µl de <i>Thioglycerol</i>	41
Figura 12 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das amostras incubadas a 70°C, durante 30 minutos, contendo 400µl de <i>Casework Direct Reagent</i> e 1µl de sémen (T1CWD+SÉMEN e T2CWD+SÉMEN), 400µl de H ₂ O e 1µl de sémen (T1H ₂ O+SÉMEN e T2H ₂ O+SÉMEN) e 200µl de CWD, 200µl de H ₂ O e 1µl de sémen (T1CWD+ H ₂ O+SÉMEN e T2CWD+ H ₂ O+SÉMEN).....	42
Figura 13 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das amostras contendo 150µl <i>Casework Direct Reagent</i> + 1µl sémen (1CWD+SÉMEN e 2CWD+SÉMEN), 75µl <i>Casework Direct Reagent</i> + 75µl água destilada + 1µl sémen (1CWD +H ₂ O+SÉMEN e 2CWD +H ₂ O+SÉMEN), incubadas a 24°C, com agitação constante, durante 30 minutos.	43
Figura 14 Visualização de cabeças de espermatozoides das amostras Z1_PM, Z2_PM, Z5_PM e Z6_PM, extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> (protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1), utilizando a Técnica de Coloração <i>Christmas Tree</i> . As setas apontam para as cabeças de espermatozoides presentes em cada amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	44
Figura 15 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das 4 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente e extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada e com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e <i>buffer</i> SERATEC, incubadas a 24°C, 30min (Dia 0).....	50
Figura 16 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das 4 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente e extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada e com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e <i>buffer</i> SERATEC, incubadas a 24°C, 30min (após 24h).	50
Figura 17 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> de 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente e de 2 amostras de sémen congeladas à temperatura de -25°C e extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, incubadas a 24°C, 30min (após 48h).....	51
Figura 18 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das zaragoas de sémen (2 armazenadas à temperatura ambiente e 2 congeladas à temperatura de -25°C), extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, ao fim de 48h.	51
Figura 19 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen congeladas à temperatura de -25°C, extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água	

destilada, ao fim de 48h, através da técnica <i>Christmas Tree</i> . As setas assinalam as cabeças de espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	52
Figura 20 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente, extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, ao fim de 48h, através da técnica <i>Christmas Tree</i> . As setas assinalam as cabeças de espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	52
Figura 21 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das zaragoas de sémen (2 armazenadas à temperatura ambiente, representadas à esquerda na imagem e 2 congeladas, representados à direita na imagem), extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, e armazenadas à temperatura de -25°C (semana 1).	53
Figura 22 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen congeladas, extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C, na semana 1, através da técnica <i>Christmas Tree</i> . As setas assinalam as cabeças dos espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	54
Figura 23 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente, extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C, semana 1, através da técnica <i>Christmas Tree</i> . As setas assinalam as cabeças dos espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	54
Figura 24 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> das zaragoas de sémen (2 armazenadas à temperatura ambiente, representadas à esquerda na imagem e 2 congeladas, representados à direita na imagem), extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada e armazenadas à temperatura de -25°C (semana 2).	55
Figura 25 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen congeladas, extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C, semana 2, através da técnica <i>Christmas Tree</i> . As setas assinalam os espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	55
Figura 26 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente, extraídas com base na mistura de <i>Casework Direct Reagent</i> e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C, semana 2, através da técnica <i>Christmas Tree</i> . As setas assinalam os espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.	56

Figura 27 Esquematização da tentativa de implementação do *Kit Casework Direct*, na rotina laboratorial.71

Figura 28 Perfil genético obtido do dador anónimo de sémen, para as amostras AS(1µl_1:2)_CWD+PrepF(1); NS(1µl_1:2)_CWD+PrepF(1); AS(1µl)_CWD+PrepF(1); NS(1µl)_CWD+PrepF(1); AS(2µl)_CWD+PrepF(1); NS(2µl)_CWD+PrepF(2); AS(5µl)_CWD+PrepF(2); NS(5µl)_CWD+PrepF(1); AS(10µl)_CWD+PrepF(1) e NS(10µl)_CWD+PrepF(1). Em todas as amostras foram obtidos perfis genéticos completos, idêntico ao acima referido.87

Índice de Tabelas

Tabela I	Constituintes do <i>Kit Casework Direct</i>	20
Tabela II	Constituintes do <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i>	23
Tabela III	Contituintes do <i>Kit SERATEC PSA Semiquant</i>	26
Tabela IV	Reagentes para a realização da Técnica de Coloração <i>Christmas Tree</i>	28
Tabela V	Constituintes do <i>Quantifiler Trio DNA Quantification Kit</i>	29
Tabela VI	Constituintes do <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> (Promega).	30
Tabela VII	Preparação das amostras para reação de amplificação por PCR.	31
Tabela VIII	Programa de amplificação das amostras por PCR.....	31
Tabela IX	Preparação de amostras para aplicação em sequenciador automático.	31
Tabela X	Resultados da quantificação das amostras Z1'a Z8', extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> e quantificadas com o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i>	40
Tabela XI	Resultados da quantificação das amostras ZA_PF e ZB_PF (1µl de sémen), extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , protocolo recomendado pelo fabricante e das amostras Z1_PM a Z4_PM (1µl de sémen) e Z5_PM a Z8_PM (1µl de sémen diluído 1:5), extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> . O símbolo (*) indicam as amostras que foram diluídas 1:2 e novamente quantificadas.	45
Tabela XII	Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras (Z3_PM e Z4_PM) e (ZA_PF e ZB_PF) para a <i>Human DNA</i> e <i>Male DNA</i> , segundo a fórmula:	46
Tabela XIII	Cálculo da percentagem de diminuição a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras (Z1_PM+Z2_PM); (Z3_PM +Z4_PM) e (Z5_PM +Z6_PM); (Z7_PM +Z8_PM) para a <i>Human DNA</i> e <i>Male DNA</i> , segundo as fórmulas:	46
Tabela XIV	Resultados da quantificação das 12 amostras mistura, contendo saliva e sémen, extraídas através do protocolo modificado 3.3.2 e através do protocolo controlo 3.3.1 da extração diferencial, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i>	48
Tabela XV	Resultados obtidos da quantificação, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> , das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , não purificadas, as amostras extraídas com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> e as amostras extraídas com CWD e purificadas no <i>Automate Express Forensic DNA Extraction System</i> . O símbolo (*)	

indica as amostras que foram diluídas 1:2 e novamente quantificadas; o resultado da quantificação expresso é o resultado da quantificação multiplicado por 2.	57
Tabela XVI Cálculo da percentagem de diminuição a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> em relação ao <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> para a <i>Human DNA</i> e <i>Male DNA</i> , segundo a fórmula:.....	58
Tabela XVII Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> não purificadas em relação às amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> já purificadas e concentradas no <i>Automate Express Forensic DNA Extraction System</i> , segundo a fórmula:.....	60
Tabela XVIII Cálculo da percentagem de diminuição a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , purificadas e concentradas no robô, em relação às amostras extraídas com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> , segundo a fórmula:.....	62
Tabela XIX Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras extraídas da zaragatoa de nylon, em relação às zaragatoas de viscose, utilizando o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> , segundo a fórmula:	64
Tabela XX Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (X) dos valores de quantificação das amostras extraídas da zaragatoa de nylon, em relação às zaragatoas de viscose, utilizando o <i>Kit Casework Direct</i> , segundo a fórmula:	66
Tabela XXI Descrição das amostras preparadas para a Experiência 1 “Testar a compatibilidade do <i>Kit Casework Direct</i> com o teste de orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> , Técnica <i>Christmas Tree</i> e com o <i>Kit Quantifiler Trio</i> ”. Estas amostras foram primeiramente eluídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , sem <i>thioglycerol</i>	83
Tabela XXII Descrição das amostras preparadas para a Experiência 2 “Influência da temperatura de incubação na realização do Teste de Orientação SERATEC PSA <i>Semiquant</i> ”.	83
Tabela XXIII Descrição das amostras preparadas para a Experiência 3 “Testar o protocolo modificado de extração usando o <i>Kit Casework Direct</i> , por comparação ao protocolo recomendado pela PROMEGA”.	83
Tabela XXIV Descrição das amostras preparadas para a Experiência 4 “Testar a compatibilidade do kit de extração diferencial I-sep, da Biotype, com o <i>kit</i> de extração <i>Casework Direct</i> , da PROMEGA”.	84

Tabela XXV Descrição das amostras preparadas para o estudo comparativo entre o *Kit Prepfiler Forensic DNA Extraction* e o *Kit Casework Direct* e entre a zaragatoa de nylon e a zaragatoa de viscoso.85

Índice de Gráficos

Gráfico I (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras ZA_PF e ZB_PF (1µl de sémen), extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , protocolo recomendado pelo fabricante e das amostras Z1_PM a Z4_PM (1µl de sémen) e Z5_PM a Z8_PM (1µl de sémen diluído 1:5), extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> , protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> . (B) Comparação das médias dos valores obtidos na quantificação das amostras (ZA_PF+ZB_PF) com a média dos valores das amostras (Z3_PM+Z4_PM).....	45
Gráfico II Comparação da quantidade de DNA da fração epitelial (A) e da fração espermática (B) proveniente das amostras mistura contendo saliva e sémen extraídas com o protocolo original 3.3.1 e através do protocolo modificado 3.3.2 da extração diferencial. As amostras foram quantificadas através do <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i>	49
Gráfico III (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> e com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> para 1µl de sémen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sémen, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> . (F) Percentagem de diminuição da quantidade de DNA do <i>Kit Casework Direct</i> em relação ao <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> , calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XVI. .	59
Gráfico IV (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> e com o <i>Kit Casework Direct</i> já purificadas e concentradas no <i>Automate Express Forensic DNA Extraction System</i> , para 1µl de sémen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sémen, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> . (F) Taxa de aumento da quantidade de DNA obtida através do <i>Kit Casework Direct</i> aquando do uso do robô, em relação ao <i>Kit Casework Direct</i> , antes do uso do robô, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XVII.	61
Gráfico V (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o <i>Kit Casework Direct</i> já purificadas e concentradas no <i>Automate Express Forensic DNA Extraction System</i> com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> para 1µl de sémen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sémen, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> . (F) Taxa de diminuição da quantidade de DNA do <i>Kit Casework Direct</i> após purificação e concentração no robô em relação às amostras extraídas com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> , calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XVIII.	63
Gráfico VI Comparação da quantidade de DNA extraídas das zaragatoas de nylon e de viscose com o <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i> para 1µl de sémen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sémen, usando o <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i> . (F) Taxa de	

aumento da quantidade de DNA obtida com a zaragatoa de nylon em relação à zaragatoa de viscosa, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XIX.65

Gráfico VII (A) Comparação da quantidade de DNA extraídas das zaragatoas de nylon e de viscosa com o *Kit Casework Direct* para 1µl de sémen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sémen, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (F) Taxa de aumento da quantidade de DNA obtida com a zaragatoa de nylon em relação à zaragatoa de viscosa, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XX.67

Lista de Siglas e Abreviaturas

°C	Graus Celcius
AB	<i>Applied Biosystems</i>
CT	Limite de ciclo
CWD	<i>Casework Direct</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
FRET	Transferência de energia de ressonância de fluorescência
h	Hora
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
IPC	Controlo interno da PCR em tempo real
LA	Limiar analítico
M	Molar
mg/ml	Miligramas por mililitro
Min.	Minutos
ng/mL	Concentração em nanogramas por mililitro
ng/μL	Concentração em nanogramas por microlitro
Ref.	Referência
pb	Par de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSA	Antigénio específico da próstata
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RFU	Unidades relativas de fluorescência
rpm	Rotações por minuto

RT-PCR	PCR em Tempo Real
s	Segundos
SGBF-C	Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
WEN ILS 500	<i>WEN Internal Lane Standard 500</i>
μl	Microlitro

1 Introdução

1.1 Princípios da Genética Forense

1.1.1 Introdução à tipagem de DNA

A Genética Forense é um ramo relativamente recente das ciências forenses, que confere resultados mais confiáveis, precisos e fidedignos do que os métodos morfométricos anteriormente utilizados. A introdução de DNA *fingerprinting*, pelo geneticista inglês Alec Jeffreys e colaboradores, demonstrou a sua enorme potencialidade forense na identificação individual, tendo sido utilizada, pela primeira vez, na associação de perpetuadores à cena de crime, possibilitando a identificação positiva de um indivíduo.^{1,2}

A informação genética responsável pelo funcionamento e reprodução de um indivíduo encontra-se presente no núcleo celular (DNA nuclear), mas também nas mitocôndrias (DNA mitocondrial). A estrutura base da molécula de DNA é o nucleótido trifosfato, composto por um grupo fosfato, uma pentose e uma base azotada nitrogenada, que varia entre adenina, timina, citocina e guanina.³ Em 1953, Watson e Crick descreveram pela primeira vez o arranjo tridimensional de dupla hélice da molécula de DNA.⁴

Dentro de cada célula existem duas cópias completas do genoma, organizada em 23 pares de cromossomas homólogos, herdados de ambos os progenitores. Embora o genoma humano diploide seja constituído por mais de 6 bilhões de nucleotídeos,⁵ apenas 1,5% do genoma está diretamente envolvido na codificação de proteínas.³ A maior parte do genoma eucariótico, aproximadamente 75%, é de origem extragénica, sendo maioritariamente composto por regiões de DNA repetitivo, intercaladas de forma dispersa entre genes.³

Cerca de 99,7% do material genético é igual para todos os indivíduos e a discriminação ao nível genético apenas pode ser realizada com base em 0,3% do genoma. Esta percentagem consiste em regiões hipervariáveis de diferentes comprimentos, não descritivas e isentas de genes, sendo mais frequentemente encontradas junto do centrómero cromossômico.⁵ Atualmente, os marcadores *Short Tandem Repeats* (STRs), de 100 a 400 pb, introduzidos nos anos 90, são os mais frequentemente utilizados em aplicações forenses, pelo facto de serem facilmente amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com baixa probabilidade de ocorrer a amplificação preferencial do alelo menor, sendo o mais indicado para amostras de DNA degradadas.^{5,3} Os marcadores STRs mais comumente aplicados nos laboratórios forenses são os tetranucleótidos, cujo motivo de repetição compreende 4 pares de bases.^{5,3}

O principal objetivo da análise genética forense para fins de identificação humana, é conceber um perfil de DNA com elevado poder discriminatório, permitindo a sua comparação a um indivíduo com um elevado grau de confiança, tornando a evidência forense mais fidedigna e forte perante o tribunal.^{5,3}

A *Applied Biosystems* e a *Promega Corporation* são dois fornecedores principais que conferem *kits* de marcadores de STR que atendem às necessidades da comunidade de tipagem de DNA e abrangem um conjunto comum de *loci* STR, que permitem amplificação multiplex robusta de marcadores STR.

Os testes de identificação humana obtidos através da análise de marcadores STR específicos para o DNA humano não permitiram apenas a exclusão, mas também a identificação positiva do indivíduo.⁶ De entre as mais variadas aplicabilidades dos testes de identificação humana, encontram-se os testes de identificação em investigações criminais, principalmente nos casos de homicídios e de agressões sexuais, testes de parentesco, testes de identificação de vítimas de desastres em massa, testes de genealogia genética e de ancestralidade e testes de identidade em caso de disputas de imigração e investigações históricas.

1.2 Determinação de perfis de DNA

1.2.1 Fluxo de trabalho laboratorial das amostras

Após a colheita de amostras biológicas, estas passam por diferentes processos sequenciais: 1) a extração de DNA da amostra biológica; 2) quantificação do DNA extraído; 3) amplificação simultânea de vários STR, dependendo do *kit* de amplificação e 4) separação por tamanho, através da eletroforese capilar e atribuição do tamanho exato dos alelos STR, com base num *software* de análise de dados e consequente obtenção de um perfil genético (Figura 1).⁷ O perfil obtido pode ainda ser analisado estatisticamente dependendo do objetivo pretendido, sendo comparado com as frequências alélicas existentes na população, de forma excluir a hipótese de existir um outro perfil igual na população ou até mesmo para garantir o nível de confiança e certeza do resultado obtido.⁷

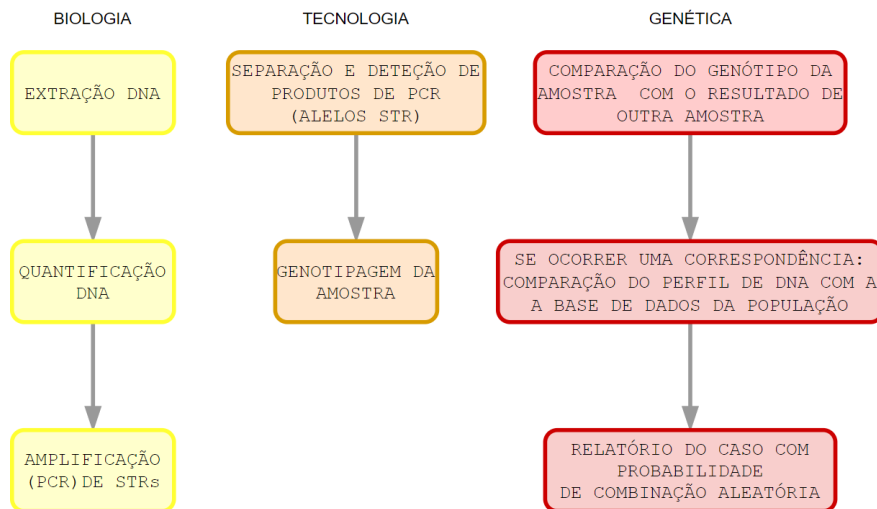


Figura 1 Visão geral da biologia, tecnologia e componentes genéticos utilizados na tipagem de DNA usando marcadores de repetição curta em tandem (STR).⁸

1.2.2 Extração de DNA de amostras problema

1.2.2.1 Extração de DNA com o Kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction

A extração do DNA é o passo primordial na análise do DNA e o mais relevante. O principal objetivo do método de extração de DNA é a obtenção de um volume máximo de DNA de elevada qualidade, isento de impurezas e inibidores, a partir de uma dada amostra biológica, com a finalidade de obter um perfil de DNA não ambíguo e inequívoco.

Cada célula contém no seu interior vários componentes celulares, incluindo a molécula de DNA. Neste sentido, a extração do DNA aborda dois objetivos principais: a libertação do DNA do interior da célula através do processo de lise celular e a separação do DNA dos restantes constituintes celulares, de forma a evitar que estes interfiram ou inviabilizem a sua análise.⁷

No SGBF-C, as amostras problema são extraídas através do *Kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction* e automatizadas no equipamento *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System*, que abrange o passo da concentração e purificação do DNA, imprescindível para amostras com reduzida quantidade de DNA, muito degradadas (devido ao calor ou humidade, por exemplo) ou contendo um elevado grau de contaminação (inibidores da PCR, tais como, a hemoglobina ou o corante azul das calças de ganga).⁹ Este processo, embora reduza com efetividade os inibidores de PCR presentes em solução, possui a enorme desvantagem de perda não recuperável de moléculas de DNA da amostra, não ligadas às esferas magnéticas, que têm como função agarrar as moléculas de DNA às paredes dos capilares, no passo de lavagem.¹⁰ Esta perda de material genético, em amostras problema que apresentam uma

quantidade extremamente reduzida de DNA, tais como as amostras colhidas nos casos de agressões sexuais, pode levar a obtenção de um perfil incompleto e, por conseguinte, a um resultado inconclusivo.

1.2.2.2 Extração de DNA com o Kit Casework Direct

Em 2016, a PROMEGA comercializou um novo *kit* de extração de DNA, o *Kit Casework Direct*, de forma a obter perfis genéticos de amostras problema que tenham bastante material genético, sem necessidade prévia de purificação, a menos que os resultados da quantificação, através dos sistemas *Quantifiler Trio*, *PowerQuant®* ou *Plexor® HY* indiquem a presença de inibidores em solução.^{11,12,13}

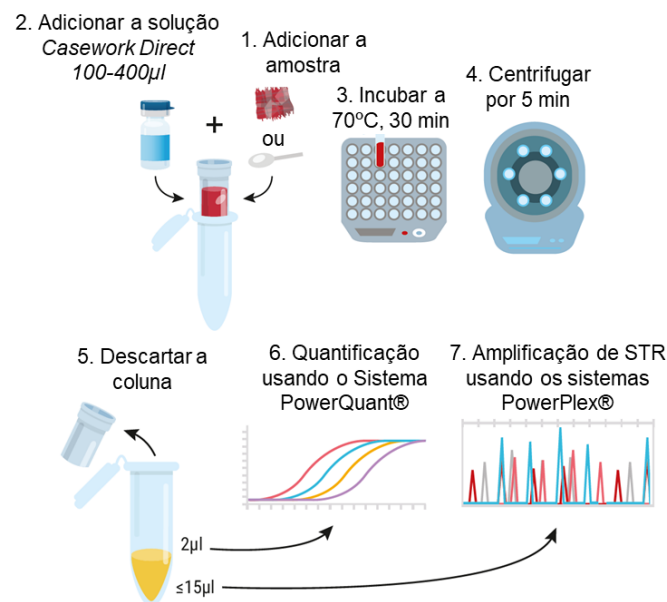


Figura 2 Protocolo de extração usando o *kit Casework Direct*.¹⁴

A implementação deste *kit* no fluxo laboratorial é uma rápida solução para o aumento do número de amostras de casos de crimes sexuais, pois permite a obtenção de lisados prontos para amplificar, em aproximadamente 35 minutos, sendo apenas necessário uma breve etapa de incubação seguida de centrifugação (Figura 2).¹⁴

Este método simples, econômico e menos duradouro não envolve lavagens adicionais, o que reduz a perda de DNA durante o processo de extração, aumentando o rendimento na obtenção de perfis de STR. As inúmeras vantagens deste *kit*, dentro dos quais a facilidade de extração, o tempo reduzido para a execução do procedimento e facilidade de seleção das

amostras para testar em STR, torna-o um *kit* de interesse a ser implementado em laboratórios forenses.^{11,15}

1.2.3 Extração diferencial de DNA

1.2.3.1 *Kit Sampletype i-sep® DL, BIOTYPE*

A extração diferencial foi primeiramente descrita por Peter Gill, em 1985, e é responsável pela separação dos perfis de DNA masculino, apartadamente do feminino, em amostras obtidas nos casos de agressões sexuais.¹⁶ Atualmente, no INMLCF, o *kit Sampletype i-sep® DL*, da BIOTYPE, é o método validado para a extração diferencial. Esta consiste na separação da fração de células epiteliais da fração de células espermáticas, por intermédio de uma *mini spin-column*, que contém um filtro auto-vedante exclusivo que impede o fluxo de diferentes tipos de soluções, quando não está sujeita a nenhuma força centrífuga.¹⁷ A preparação do lisado celular efetua-se na mesma coluna, com a adição dos tampões de lise específicos para cada fração a obter, não existindo etapas extras de manipulação da amostra. O tampão de lise para a fração epitelial consiste numa mistura de *Buffer DL-MB* e *Proteinase K*, enquanto que o tampão de lise da fração espermática consiste numa mistura de *Buffer DL-MB*, *Proteinase K* e *Dithiothreitol* (DTT).¹⁷ Este último é essencial na quebra das pontes dissulfeto das proteínas que se encontram na membrana nuclear da célula espermática.⁷ Após a centrifugação, a solução contida na coluna passa para o tubo de colheita. Este protocolo de extração diferencial é seguido pela purificação no robô das frações obtidas.

1.2.4 Quantificação DNA extraído

Em cada célula humana, está presente 6×10^{-12} g de DNA genómico contendo uma única cópia diploide do genoma humano e é com base na quantificação do DNA que se tem conhecimento da quantidade de material genético amplificável existente na amostra a analisar.⁷ Este passo é fundamental para saber se existe material suficiente para se proceder à análise de STR e com que quantidade de amostra se deve proceder a essa amplificação. A presença de DNA em excesso numa amostra pode resultar em eletroferogramas de difícil e demorada interpretação e, a reduzida quantidade de DNA pode resultar na perda de alelos, levando à amplificação estocástica e à falha na obtenção de um perfil de STR conclusivo.⁷ Por esta razão, o objetivo do processo de quantificação do DNA reside na obtenção da concentração exata de DNA da amostra, o que servirá de complemento para ajustar a sua concentração conforme a faixa estrita de concentrações requeridas pelas diversas técnicas utilizadas no

laboratório, onde normalmente se requer cerca de 0,5 a 2,0ng de *input human DNA*.⁷ O ajuste da quantidade de DNA pode incluir a diluição da amostra até ao valor pretendido ou a adição de mais quantidade de amostra, de forma a concentrá-la.

Existe uma grande diversidade de métodos de quantificação de DNA que incluem *Slot Blot*, *PicoGreen*, *AluQuant* e *Real-Time PCR (RT-PCR)*.⁷ Atualmente, no Serviço de Genética Forense do INMLCF, recorre-se ao equipamento *7500 Real-Time PCR System (AB)* que permite a quantificação absoluta de DNA nuclear e/ou mitocondrial humano, com base em curvas padrão, ou a quantificação relativa por comparação a uma amostra controlo, utilizando para tal o *Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (AB)*.

A RT-PCR baseia-se na existência de sondas singulares e de *primers* específicos para DNA humano ou DNA masculino, consoante o *kit* utilizado. Estas sondas, complementares com uma sequência localizada entre as regiões de acoplamento dos *primers*, contêm um fluorocromo *reporter* (R), ligado à extremidade 5' da sonda, e um *quencher* (Q) ligado à extremidade 3' da sonda, ambos de diferentes comprimentos de onda (Figura 3).¹⁸

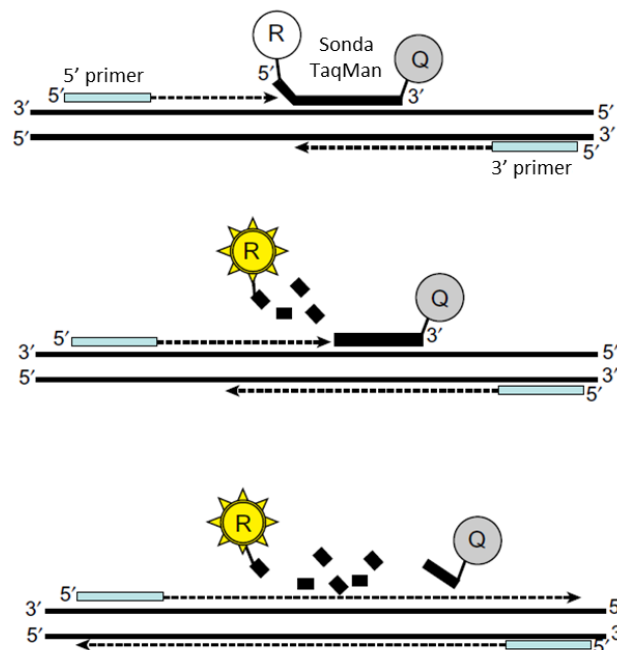


Figura 3 Esquema representativo da quantificação em tempo real com o *Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (AB)*.⁷

Em solução ou durante a PCR, enquanto a sonda permanecer intacta e ligada à região alvo, a proximidade do *quencher* suprime a emissão de fluorescência do fluoróforo *reporter*, devido à transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) entre ambos.¹⁸ Durante a polimerização, a *TaqMan DNA Polimerase* promove a clivagem da sonda (esta enzima possui

atividade de exonuclease 5') o que resulta na separação física entre o *reporter* e o *quencher* e a inibição de FRET, com emissão de fluorescência por parte do fluoróforo.¹⁸ Assim, a fluorescência medida pelo equipamento, para cada amostra, é proporcional à quantidade de DNA presente na amostra.¹⁸

A técnica PCR em tempo real com o *kit Quantifiler Trio DNA Quantification* permite quantificar o DNA humano total e o DNA masculino numa só reação, usando apenas 2 μ l da amostra origem, sendo vantajoso em amostras com limitada concentração de DNA.¹⁸ Esta técnica, confere informação pertinente relativamente à qualidade, à presença de inibidores de PCR co-extraídos e ao índice de degradação do DNA.¹⁹

Para avaliar a eficiência da quantificação de cada amostra é introduzido um controlo interno da PCR (IPC) e para avaliar o nível de degradação do DNA utilizam-se sequências longas e sequências curtas de DNA humano, de comprimentos diferentes, que permitem saber se, e em que grau, o DNA molde é degradado através da quantidade de fluorescência emitida.¹⁹

Durante o processo de RT-PCR, é produzido um gráfico de fluorescência emitida *versus* número de ciclos de PCR, onde se distinguem 3 fases: a fase da amplificação geométrica ou exponencial, a fase de amplificação linear e a fase *plateau* (Figura 4).⁷

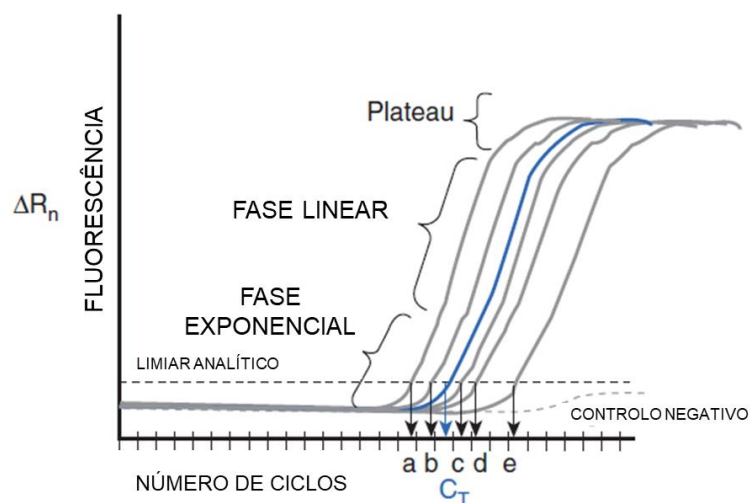


Figura 4 Gráfico representativo das três fases da quantificação por PCR em tempo real, a fase da amplificação geométrica ou exponencial, a fase de amplificação linear e a fase plateau, que tem como variáveis, a fluorescência e o número de ciclos.⁸

A quantificação do DNA presente na amostra realiza-se com base na fase de amplificação exponencial, uma vez que existe um maior grau de precisão e consistência entre a quantidade de produtos de PCR obtidos e o *input* DNA.⁷ É nesta fase que a eficiência da reação é aproximadamente 100%, existindo a duplicação de cada fragmento de DNA. A fase linear não

é tão precisa para inferir acerca da quantidade de DNA presente na amostra, dado que os componentes da reação de PCR, tais como os desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) ou *primers* podem ser utilizados a taxas ligeiramente diferentes na reação, podendo variar de amostra para amostra.⁷ A fase de *plateau* corresponde à diminuição dos produtos de PCR obtidos, que geralmente cessa quando se obtém uma concentração de 10^{-7} mol/L, uma vez que vários componentes atingiram o limite máximo da sua eficácia no ensaio, daí não ser recomendado usá-la para fins de comparação.⁷

Para o cálculo da concentração de DNA presente na amostra, o equipamento 7500 *Real-Time PCR System* (AB) baseia-se no valor do limite de ciclo (CT). Este corresponde ao ponto a partir do qual o nível de fluorescência excede um limite arbitrário (no SBGF-C, definido como 0.2), definido pelo software de RT-PCR, de forma a permanecer acima do ruído da linha de base observado nos estágios iniciais da PCR. Sendo assim, quanto menor for o número de ciclos necessários para que seja detetada fluorescência, maior será o número de moléculas de DNA iniciais da amostra.

1.2.5 Amplificação de DNA por PCR

A reação de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), primeiramente descrita por Kary Mullis e colaboradores, em 1985, é um processo enzimático a partir do qual uma sequência específica de DNA é replicada inúmeras vezes, originando milhões de cópias dessa mesma região, num curto espaço de tempo.²⁰

Os componentes base desta técnica consistem em 1) dois iniciadores oligonucleicos sintéticos (*primers*), que flanqueiam a sequência alvo por complementaridade nas extremidades 3', 2) sequência de DNA molde a ser amplificada, 3) dNTPs, que fornecem os quatro tipos de nucleótidos (adenina, timina, guanina e citosina) necessários para complementar a sequência de interesse, 4) magnésio, essencial para ativar a DNA polimerase e 5) a polimerase termoestável, mais comumente a Taq polimerase, que provém da bactéria *Thermus aquaticus*, sendo a enzima responsável pela adição de nucleótidos à cadeia, cópia da sequência alvo.⁵ A reação da PCR pode amplificar apenas uma sequência alvo isolada, ou várias sequências alvo em simultânea, designando-se por reação de PCR em multiplex.⁵

A reação de amplificação compreende ciclos de aquecimento e arrefecimento que envolvem 1) a fase de desnaturação, onde a temperatura atinge aproximadamente os 94°C, permitindo a separação das duas cadeias de DNA da sequência molde, 2) a fase de *annealing*, caracterizada pela diminuição da temperatura da reação até aos $\pm 60^\circ\text{C}$, responsável pela ligação dos *primers* às sequências moldes, e 3) a fase da extensão, acompanhada de um

aumento da temperatura da reação até $\pm 72^{\circ}\text{C}$, o que permite a ligação da Taq polimerase e a adição de dNTPs à cadeia em formação (Figura 5).⁵

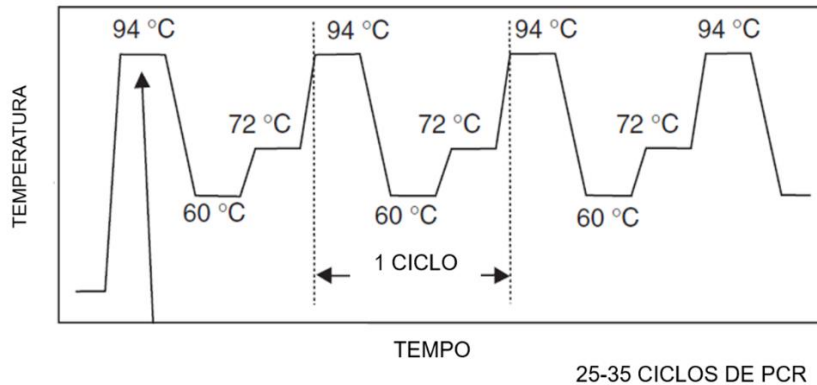


Figura 5 Variações da temperatura durante os ciclos de PCR. O ciclo de PCR compreende 3 fases: 1. A fase de desnaturação, 94°C ; 2. A fase de *annealing*, 60°C e 3. A fase da extensão, 72°C . Cada ciclo é repetido de 25 a 35 vezes.⁸

Muitas vezes, as amostras forenses contêm uma quantidade reduzida de DNA, que pode ser afetada pelo efeito estocástico. Este fenómeno ocorre quando existe uma amplificação desigual de um dos alelos da amostra, num indivíduo heterozigótico, uma vez que apenas algumas das moléculas de DNA foram usadas para iniciar a PCR. O resultado da amplificação pode causar a perda de um dos alelos, indicando uma falsa homozigotia.⁵

No INMLCF, a amplificação de STR realiza-se maioritariamente com recurso a dois *kits* de casas comerciais diferentes: *PowerPlex Fusion 6C System*, da *PROMEGA Corporation* (deteção de 27 loci) e *GlobalFiler*, da *Thermo Fisher Scientific* (deteção de 24 loci). A importância da existência de duas casas comerciais diferentes, dá-se pelo facto de apresentarem *primers* diferentes, regiões distintas de *annealing*, bem como menor probabilidade de ocorrência de alelos silenciosos.

1.2.6 Separação e deteção de produtos amplificados

Os STR amplificados são posteriormente separados por tamanho, por eletroforese capilar, num sequenciador automático. A separação realiza-se com base na aplicação de um campo elétrico sobre as cadeias de DNA, que migram do polo negativo, o cátodo, para o polo positivo, o ânodo, devido ao facto de possuírem grupos fosfato que, na presença de uma solução tampão, libertam o ião H^+ e conferem carga negativa às moléculas de DNA.⁵ Quanto maior for

o campo elétrico aplicado, maior é a força que faz movimentar as moléculas de DNA em direção ao ânodo.⁵

O sequenciador automático contém no seu interior uma fonte de excitação a laser, um detetor de fluorescência e um computador que controla a injeção da amostra e a detecção da fluorescência emitida.⁵ Através da incidência de um laser de argônio, fixo ao final do capilar, os fluorocromos são excitados e emitem fluorescência, que é detetada por um detetor de fluorescência, responsável por quantificar o sinal captado.⁵ A fluorescência emitida é transformada num sinal elétrico, em unidades relativas de fluorescência (RFU), por um *software* apropriado, sendo proporcional à quantidade de fluorocromos presentes na amostra e à quantidade de luz emitida por estes.⁵ Os dados recolhidos da intensidade da fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados aos fragmentos de DNA são comparados a um *standard* interno (conjunto de fragmentos de DNA de tamanho conhecido, em pares de bases, e marcados com um fluorocromo), mede o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, em pares de base, e organiza em painéis de cor, consoante a fluorescência emitida.⁵ Por sua vez, este sinal elétrico é comparado com um *LADDER* alélico, que corresponde a uma mistura artificial de alelos comuns para cada STR na população, de forma a designar cada alelo em cada marcador e realizar assim a genotipagem da amostra (Figura 6).⁵

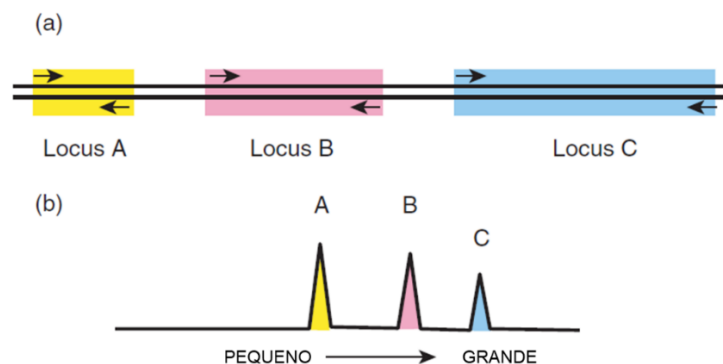


Figura 6 Esquema representativo de multiplex PCR, onde se utiliza dois ou mais conjuntos de *primers* na mesma mistura de reação. No esquema estão representados três conjuntos de *primers*, representados por setas, responsáveis por amplificar três *loci* diferentes (A, B e C). Os *primers* foram desenhados de forma a que os produtos de PCR dos *loci* A, B e C fossem de tamanhos diferentes, de forma a serem possíveis de separar com base no seu tamanho.⁸

No final, o resultado obtido consiste num eletroferograma. Para a sua análise, é definido um limiar analítico (LA), em unidades relativas de fluorescência (RFU), a partir do qual os picos detetados são considerados alelos. Todos os sinais detetados abaixo do limiar são considerados “ruído” da própria eletroforese.

1.3 Amostras em contexto forense

1.3.1 Contextualização

A agressão sexual inclui um amplo espectro de atividade sexual não consensual, envolvendo o uso ou a ameaça do uso da força e variando desde a coerção sexual, ao abuso sexual e à penetração real ou tentada da vagina, reto ou boca da vítima.^{21,22,23} As situações em que as vítimas são incapazes de consentir incluem aquelas em que a vítima se encontra mentalmente ou fisicamente incapaz de demonstrar consentimento, como, por exemplo, em situações de embriaguez, de intoxicação por medicamentos ou drogas, ou quando a vítima é bastante jovem.

A agressão sexual é considerada um problema humano de emergência médica, com elevada prevalência no mundo, que afeta negativamente a sociedade e a saúde pública, incidindo sobre ambos os sexos.^{24,25,26} A resposta para o crime de agressão sexual envolve a colaboração coordenada e multidisciplinar de equipas especializadas, que abrangem diversos serviços forenses (como, por exemplo, clínica forense, toxicologia forense e biologia e genética forense),^{27,28,29} bem como de outros profissionais de outras áreas, como, por exemplo, polícias, advogados, juizes e psicólogos, que têm como objetivo conjunto a obtenção de evidências forenses, com o intuito de poder identificar o agressor, eliminar o(s) suspeito(s) e auxiliar como prova na tomada da decisão final pelo tribunal.^{30,31,32,33,34}

Atualmente, as evidências biológicas para análise de DNA são consideradas provas legais de maior relevância e consistência apresentadas ao tribunal para a resolução do caso.^{32,35} Desta forma, a existência de diretrizes para a seleção, colheita, acondicionamento, identificação, armazenamento e transporte de evidências para um laboratório forense é fundamental para a preservação e proteção das mesmas de possíveis perdas ou contaminações e para a manutenção da cadeia de custódia, que valida e torna os resultados credíveis e fidedignos quando apresentados ao tribunal como provas.^{32,36} Contudo, a presença de DNA do perpetrador na vítima ou no local do crime e a obtenção de um perfil completo do indivíduo não prova o facto do crime ter ocorrido, havendo a necessidade de associar outras provas forenses, como, por exemplo, a entrevista forense, o historial médico da vítima, a documentação fotográfica e, principalmente o exame médico-legal físico à vítima.³⁷

1.3.2 Evidências forenses: sémen

O conceito de evidência forense abrange qualquer informação, objeto ou material biológico ou não-biológico relacionado com o crime em questão e relevante para a investigação criminal. As evidências forenses são essenciais para comprovar a ocorrência do crime; orientar a investigação do crime; excluir suspeito(s) e identificar o(s) perpetrador(es);

confirmar ou refutar o relato de testemunhas da vítima ou dos suspeitos e reconstruir a cena do crime, para melhor compreensão dos factos ocorridos.^{32,38,39}

As evidências da cena do crime podem estar presentes no local do crime (por exemplo nos lençóis, preservativos), no corpo ou nas roupas da vítima ou do perpetrador, ou associado a qualquer objeto ou material que é transportado por quaisquer indivíduos que interagiram com a cena do crime.^{32,40,41,42} Por consequência, torna-se imprescindível o isolamento e a proteção do local do crime e das evidências neste contidas pelos órgãos de polícia criminal, de forma a impedir qualquer modificação, perda ou contaminação do local, conservando a integridade das evidências encontradas.^{32,40,42}

Embora nos outros tipos de ofensa a cena do crime seja o palco de atenção dos investigadores forenses, no caso de uma agressão sexual, a vítima em si consiste na “cena” primária do crime.^{32,43}

No local de crime, podem identificar-se 2 tipos de evidências: as diretas, relacionadas diretamente com o facto em si, sem precisar de investigações adicionais e as indiretas, que necessitam de ser identificadas e comparadas com amostras de referências obtidas da vítima, do(s) suspeito(s), do local de crime ou de uma base de dados.³² Estas últimas incluem evidências físicas de origem não biológica (por exemplo impressões digitais de dedos e/ou pés ou ferimentos graves visíveis do corpo da vítima) e de origem biológica, que englobam todo o material obtido da vítima e/ou do perpetrador, sendo mais frequente encontrar fluidos corporais, como sémen, sangue e saliva, cabelos, células epiteliais do perpetrador encontradas debaixo das unhas da vítima ou células epiteliais da vítima presentes no pénis do perpetrador.^{32,44,45,42,46}

Atualmente, a evidência mais importante num caso de agressão sexual é a presença de sémen, por ser uma excelente fonte de DNA a partir do qual se consegue determinar o perfil do perpetrador.^{32,43,37}

As amostras biológicas são normalmente obtidas com recurso a zaragatoas colhidas na vítima durante o exame físico forense, das cavidades oral, anorretal e vaginal, mas também podem estar presentes nas roupas e outros pertences da vítima e/ou do suspeito (por exemplo, os lençóis da cama).^{32,27,47,48,49}

A avaliação física medico-forense deve ser realizada com máxima urgência no tempo recomendado máximo de 72h após a agressão sexual, de forma a evitar a perda de evidências forenses, essenciais para a resolução do caso pelo tribunal.^{32,27,50,51,52,53,54,23}

Estudos confirmam que o tempo limite de deteção do sémen depende da idade da vítima (pré ou pós-puberdade) e da sua localização.^{32,54,55} As secreções secas em roupa ou noutro tipo

de tecido, como panos ou lençóis, permanecem bastante estáveis, de modo que o sêmen pode ser detetado por mais de um ano.^{56,32,54} Contudo, é importante ter em atenção que, quanto maior o tempo decorrido entre a agressão sexual e a colheita de amostras forenses, menor é a probabilidade de encontrar provas de que tal facto ocorreu,^{57,58,37,59,60,61,62} uma vez que, no caso das evidências forenses corporais das cavidades internas, como a vagina, o pH ácido da vagina e as respostas imunológicas do corpo da vítima rapidamente degradam o sêmen do perpetrador.⁶³

No caso das agressões sexuais em crianças, principalmente as que apresentam idade igual ou inferior a 10 anos, o tempo limite de colheita de evidências corporais de sêmen e sangue é mais reduzido do que nos casos de agressões sexuais em adolescente e adultos, podendo variar entre as 13h e 48h após a agressão.^{64,60,61,62,51} Dados afirmam que a maior proporção de evidências forenses obtidas advém de objetos, como, por exemplo, roupa e revestimento da cama e não das próprias crianças.^{61,60,62}

1.3.3 Testes de orientação e de confirmação do sêmen

Da perspetiva laboratorial, as evidências forenses passam por duas análises distintas: testes presuntivos e a obtenção de perfil de STR de amostras biológicas provenientes da cena do crime ou de um suspeito. Os testes presuntivos são utilizados para identificar fluidos biológicos como sangue, saliva e sêmen, através de dois tipos de provas: os testes de orientação, que normalmente são realizados em primeiro lugar com o objetivo de verificar a possível presença de um fluido biológico, e os testes de certeza, que confirmam a presença desse fluido na amostra.³⁷

O teste de deteção do antigénio específico da próstata (PSA) é o método de rastreamento do fluido seminal por imunoensaio utilizado na rotina no SGBF-C, para detetar a presença de sêmen. Esta é uma das proteínas mais abundantes no fluido seminal, produzida pelas células epiteliais prostáticas a uma concentração de 0.5 – 3,0mg/ml, podendo estar presente até 48h na vagina ou no colo do útero.⁶⁵ Embora este método seja muito sensível, não é específico do fluido seminal, podendo ser detetado também no soro masculino, urina masculina, nas glândulas sudoríparas apócrinas e no leite materno.³²

Por sua vez, os testes de confirmação baseiam-se na observação de espermatozoides ao microscópio ótico, sendo a técnica de coloração de *Kernechtrot Picroindigocarmine*, também conhecida por *Christmas Tree*, a utilizada no SGBF-C. A ausência de espermatozoides pode ocorrer nos casos em que não houve contacto sexual, o perpetrador ter utilizado preservativo e, em casos mais específicos, o perpetrador ser azoospermico ou vasectomizado.³²

1.4 Zaragatoas de nylon vs zaragatoas de viscose

No contexto forense, observa-se frequentemente que a contribuição masculina é um componente minoritário de um perfil de mistura, existindo uma desproporção considerável entre os alelos do perfil masculino e feminino detetados, o que dificulta a interpretação do perfil resultante na maioria das agressões sexuais.⁶⁶

A eficiência da extração e da recuperação de material genético contido em zaragatoas obtidas do local do crime, da vítima e dos suspeitos é geralmente inferior a 50%, sendo uma percentagem ainda muito reduzida, o que significa que uma parte substancial do DNA pode ainda permanecer agarrado às zaragatoas.^{67,68,69}

Atualmente, o método de colheita de amostras por meio de zaragatoas é o sistema mais versátil e usado pelas unidades forenses, quer para investigações criminais quer para exames laboratoriais.⁶⁸ O sucesso de uma colheita forense eficiente reside na excelente capacidade de absorção da amostra pela zaragatoa aquando da sua colheita e na libertação eficaz da amostra no processo de extração, bem como na imensa praticabilidade e adaptabilidade da zaragatoa para todas as técnicas comumente aplicadas na rotina laboratorial.^{67,68,66}

A eficácia de uma zaragatoa está dependente de inúmeras variáveis: da forma e disposição das fibras no suporte de armazenamento do material biológico, da espessura e do comprimento da cabeça, do modo de articulação da cabeça ao eixo físico da zaragatoa, tipo de material do suporte, presença ou não de respiradouros para melhorar a secagem da zaragatoa, um solvente para umedecer a zaragatoa e dessecantes ou produtos antibacterianos, de forma a preservar o DNA.^{69,68}

De entre todas as variáveis mencionadas, a forma e a disposição das fibras do suporte de armazenamento da amostra forense é a propriedade mais importante numa zaragatoa, pois influencia diretamente na eficiência da absorção, extração e recuperação do material biológico nela contido.⁶⁹

Tradicionalmente, os laboratórios forenses e as entidades policiais utilizam as zaragatoas de algodão na colheita de evidências forenses, pois estas foram consideradas os dispositivos mais efetivos e práticos para serem implementados na rotina dos laboratórios. Atualmente, no quotidiano laboratorial do SGBF, são utilizadas zaragatoas de viscose (*rayon*), com a textura e a absorvência semelhante à do tipo algodão e que apresentam uma fibra de celulose fina, produzida a partir de polpa de madeira (Figura 7.A).⁶⁷

No entanto, vários estudos apontam para o facto de as zaragatoas de algodão e viscose não serem as mais eficazes na recuperação⁷⁰ e eluição posterior de material celular,⁷¹ mesmo após as amostras terem sido agitadas num agitador.⁷² Adicionalmente, as zaragatoas do tipo algodão podem deixar fibras de algodão ou outras impurezas na mistura da reação, podendo inibir a reação de PCR.⁷³

Em alternativa a este problema, vários modelos de zaragatoas foram desenvolvidos, incluindo as zaragatoas de nylon, compostas por fibras mais curtas de nylon dispostas perpendicularmente, presas a um suporte, que normalmente é de plástico.^{74,66,67}

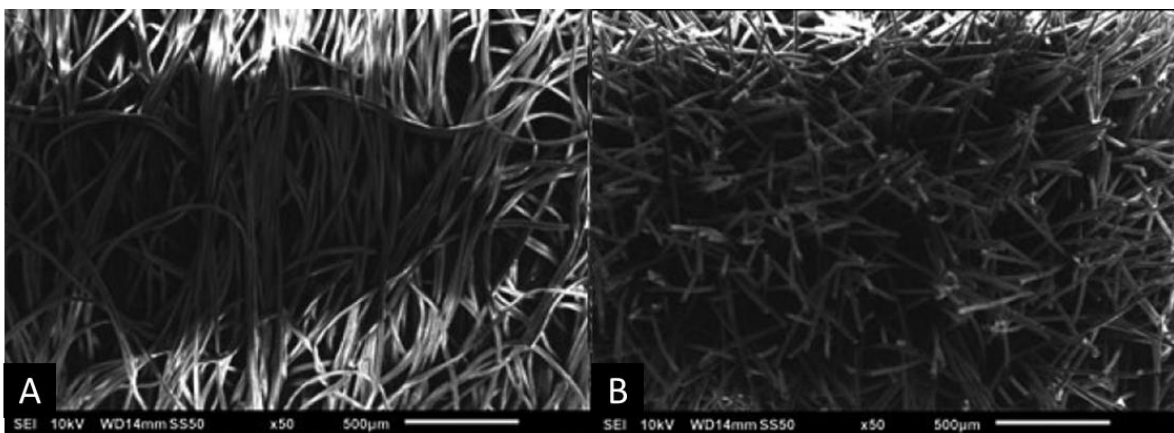


Figura 7 Imagens obtidas com o microscópio eletrónico de varrimento (MEV) das fibras das zaragatoas testadas: (A) zaragatoa de viscose (B) zaragatoa de nylon. Varredura de microscópio eletrónico⁶⁷.

A morfologia hidrofílica de fibra aberta não forma um núcleo absorvente interno, o que permite alcançar uma capacidade superior de absorção por ação capilar e uma menor taxa de aprisionamento da amostra colhida, obrigando a que esta se mantenha próxima da superfície da zaragatoa, tornando mais eficiente eluição e extração do material genético (Figura 7.B).^{74,66,67} Além disso, verifica-se a obtenção de um maior número de células intactas, sendo benéfico para a visualização ao microscópio.⁶⁶

Estudos comparativos entre a zaragatoa convencional de algodão e a zaragatoa de nylon, confirmam uma eluição das células contidas nas zaragatoas de nylon 6 vezes superior,⁶⁶ e uma recuperação do material genético até 3 vezes superior que nas zaragatoas convencionais.⁷⁵ O estudo mais recente na literatura científica publicado por Zasada e colaboradores são consistentes com o estudo anterior, onde a eficiência de extração de DNA para as zaragatoas de nylon foi 3,5 vezes superior do que para as zaragatoas do tipo algodão.⁷⁶ Estes resultados estão em concordância com os estudos realizados por outros cientistas que também sustentam o facto de as zaragatoas de nylon possuírem maior

eficiência e um maior desempenho, quando comparadas com os outros modelos de zaragatoas existentes comercialmente.^{67,77,78,68}

No artigo de Warnke e colaboradores, verificou-se que as zaragatoas convencionais do tipo algodão apresentam melhor desempenho em ambientes onde existe uma abundância de amostra líquida (por exemplo, feridas cirúrgicas) enquanto que as zaragatoas de nylon são mais indicadas para situações em que a presença de amostra líquida é limitada.⁷⁹

Em 2012, no artigo publicado por Brownlow e colaboradores inerente à comparação da colheita e da recuperação de DNA de zaragatoas de tipo algodão e de nylon, estes observaram que ambas as zaragatoas são capazes de recuperar elevada quantidade de DNA (>50%), porém, curiosamente, estes resultados foram influenciados pelas diferentes combinações entre o método de extração e o tipo de zaragatoa.⁷⁴

Do ponto de vista prático, a zaragatoa de nylon é muito versátil pelo facto de apresentar uma boa combinação de flexibilidade e rigidez, visto que as cabeças das zaragatoas não se rompem durante a colheita de amostras pelo ponto de rutura, além de facilitar a sua introdução em tubos para manuseamento posterior da amostra.⁶⁸

Embora a zaragatoa de nylon tenha apresentado um melhor desempenho quando comparada com as restantes, o DNA extraído desta zaragatoa demonstrou estar severamente degradado após um período de armazenamento superior a 3 meses enquanto que as demais zaragatoas apresentaram uma forte estabilidade do material genético superior a um ano.⁶⁸ Pensa-se que a acumulação de humidade no interior da embalagem da zaragatoa e a ausência de um agente antimicrobiano são dois fatores que poderiam afetar de forma negativa a preservação do material genético, o que resulta na obtenção de perfis parciais de DNA.^{68,66} No estudo de Benschop e colaboradores, a secagem das zaragatoas de nylon foi muito mais lenta do que nas zaragatoas de algodão, o que levou ao crescimento microbiano nalgumas das zaragatoas analisadas.⁶⁶

2 Justificação e Objetivos

A evidência mais relevante num caso de agressão sexual é a presença de sémen nas amostras forenses colhidas. Este fluido biológico é a principal fonte de DNA utilizada para a determinação do perfil genético do perpetrador. Dos vários procedimentos a realizar para obter o perfil genético do indivíduo, o mais importante é a extração do DNA das amostras forenses. Atualmente, diferentes casas comerciais apostam na criação de *kits* de extração cada vez mais rápidos, como é o caso da PROMEGA, que comercializou um novo *Kit* de Extração, o *kit Casework Direct*, com a vantagem de ser económico, de rápida execução, baseado num protocolo simples e sem necessidade de recorrer à purificação da amostra, com recurso a equipamentos muito mais dispendiosos.

No contexto das agressões sexuais, outro assunto pertinente consiste no sucesso e na eficácia da colheita forense. Usualmente, os laboratórios forenses utilizam uma zaragatoa como o principal método de colheita das amostras biológicas. Estudos indicam que a eficiência da extração e da recuperação do material genético contido nas zaragatoas é geralmente inferior a 50%.⁶⁷ Neste sentido, é fulcral o desenvolvimento de uma zaragatoa que apresente uma excelente capacidade de absorção e de libertação da amostra no processo de extração, como é o caso da zaragatoa de nylon.

Em suma, um excelente meio de colheita das amostras forenses, e um método eficaz e robusto de extração dessas amostras facilitam a obtenção do perfil de perpetrador, auxiliando na resolução dos casos de agressão sexual.

2.1 Objetivo Geral

- Comparar a rentabilidade de extração de um novo *kit*; verificar a compatibilidade de químicas de reagentes envolvidos nos diversos passos de obtenção de um perfil genético; comparação de dispositivos de colheita de amostras forenses.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a compatibilidade do *kit* de extração *Casework Direct* com as diferentes químicas dos reagentes presentes nos diversos *kits*, utilizados para a realização dos testes preliminares, extração diferencial de DNA, quantificação por PCR em Tempo Real (RT-PCR), amplificação de DNA, aplicação do produto amplificado num sequenciador automático de capilares, obtenção de perfil genético, análise e comparação dos resultados obtidos;

- Estudar a rentabilidade do *kit* de extração *Casework Direct*, em comparação ao *kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction*, validado no laboratório;
- Estudar a compatibilidade com a química do *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction* para purificação no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*;
- Otimização de protocolos para adaptação do *kit Casework Direct* à rotina de laboratórios forenses;
- Testar e avaliar a zaragatoa de nylon, como dispositivo de colheita de amostras forenses, ao nível do seu desempenho na eluição do material genético para a solução, em comparação com a zaragatoa de viscose utilizada na rotina no laboratório SGBF-C.

3 Material e Métodos

3.1 Preparação de amostras

Para a realização do presente projeto, recorreu-se a amostras de sémen e amostras mistura (sémen e saliva), preparadas no laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forense, da delegação do Centro do INMLCF. Para a preparação destas amostras recorreu-se a uma alíquota de sémen obtida a partir de um dador anónimo e a voluntários do laboratório, que deram o seu consentimento prévio para a realização de zaragatoas bucais para a obtenção de saliva. As amostras de sémen foram preparadas utilizando dois tipos de zaragatoas distintas (Figura 8):

- 1) Zaragatoa estéril com haste em plástico e ponta em viscose descartável, da *Goodwood Medical Care Ltd.* (Ref.:GW-1237R);
- 2) Zaragatoa estéril com haste em plástico e ponta de nylon descartável (4N6FLOQSWABSTMREGULAR), da *COPAN Flock Technologies* (Ref.:4473979).
Para a preparação das amostras mistura, recorreu-se apenas à zaragatoa de nylon.

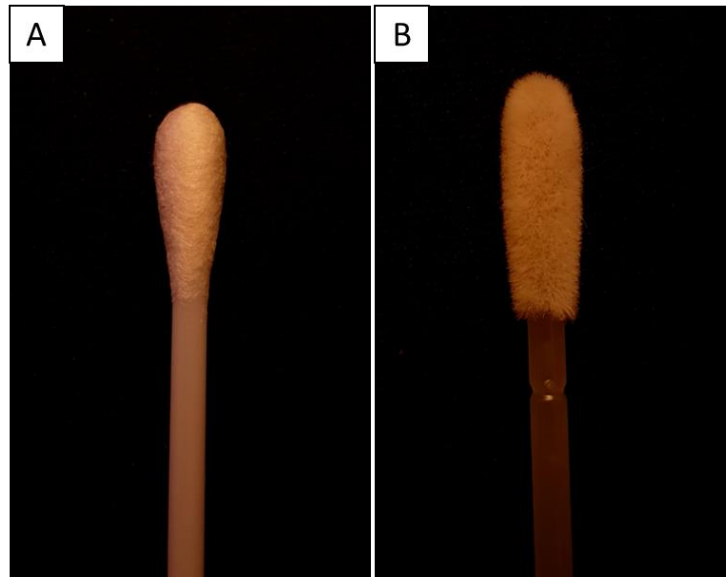


Figura 8 Zaragatoas de viscose e nylon. (A) Zaragatoa estéril com haste em plástico e ponta em viscose descartável, da *Goodwood Medical Care Ltd.* (Ref.:GW-1237R). (B) Zaragatoa estéril com haste em plástico e ponta de nylon descartável (4N6FLOQSWABSTMREGULAR), da *COPAN Flock Technologies* (Ref.:4473979).

3.1.1 Preparação das amostras de sémen

1. Descongelou-se a alíquota de sémen e agitou-se de forma a homogeneizar a amostra.

2. Colocaram-se as zaragatoas de nylon necessárias num suporte de esferovite e colocou-se a identificação correspondente a cada uma.
3. Pipetou-se a concentração desejada de sémen na ponta de cada zaragatoa. Para amostras diluídas (1:2; 1:5), utilizou-se água destilada como solvente.
4. Deixou-se secar à temperatura ambiente, 24h.

3.1.2 Preparação das amostras mistura, contendo saliva e sémen

1. Com zaragatoa de nylon, escovou-se a parte interna da(s) bochecha(s) pelo menos 6 vezes nos sentidos ascendente e descendente.
2. Colocou-se as zaragatoas de nylon num suporte de esferovite com a respetiva identificação.
3. Deixou-se secar a temperatura ambiente.
4. Pipetou-se 1µl de sémen na ponta das zaragatoas.
5. Deixou-se secar a temperatura ambiente, 24h.

3.2 Metodologias de extração

3.2.1 Extração com o *Kit Casework Direct*

O *Kit Casework Direct* da PROMEGA é uma metodologia de extração simples, capaz de obter lisados de DNA prontos a amplificar, a partir de amostras de referência ou problema que tenham bastante material genético e poucos inibidores em solução, sem necessidade prévia de purificação, em aproximadamente 35 minutos. Este *kit* foi desenhado com o objetivo de ser integrado no fluxo de trabalho de um laboratório forense, pelo facto de ser um meio rápido e económico para a obtenção de perfis STR de elevada qualidade. A extração com o *kit Casework Direct* realizou-se com base no protocolo recomendado pelo fabricante.⁸⁰ Os reagentes do *Kit* encontram-se expressos na Tabela I.

Tabela I Constituintes do *Kit Casework Direct*

Reagentes do <i>Kit Casework Direct</i>
Reagente <i>Casework Direct</i>
1-Thioglycerol
5x AmpSolution Reagent
Water, Amplification Grade

Protocolo original recomendado pelo fabricante (PROMEGA):

1. Preparou-se a solução de *Casework Direct*, utilizando, por cada amostra, 400µl do *Casework Direct Reagent* e 2µl de *1-Thioglycerol*.
2. Adicionou-se a amostra (cabeça da zaragatoa contendo o sémen) no cesto de centrifugação colocado num *ependorf* de 1,5ml e 400µl da solução de *Casework Direct*.
3. Agitaram-se os tubos de 5 – 10s.
4. Incubou-se a 70°C durante 30min, de forma a promover a lise celular.
5. Agitaram-se os tubos, novamente, de 5 – 10s.
6. Centrifugaram-se os tubos por 5min, a velocidade máxima (14000rpm), de forma a obter o lisado celular separado do suporte físico, a zaragatoa.
7. Descartou-se o cesto de centrifugação dos tubos.
8. Fecharam-se os *ependorfs*.

Protocolos modificados

Os protocolos abaixo mencionados foram modificados em relação ao protocolo original, de acordo com os objetivos de cada experiência realizada, com o intuito de ensaiar e avaliar a aplicabilidade do *kit* de extração *Casework Direct* na rotina laboratorial.

- **Protocolo modificado (i):** 1) Eluição do material contido nas amostras: protocolo igual ao original, exceto os passos 1) e 2), em que apenas se adicionou 400µl de *Casework Direct Reagent*, sem a presença de 2µl de *1-Thioglycerol*. 2) Extração do material genético do interior das células: adicionou-se 2µl de *1-thioglycerol* às amostras anteriormente eluídas e seguiu-se o protocolo original, a partir do passo 3.
- **Protocolo modificado (ii):**
 - a) Prepararam-se 6 amostras:
 - ✓ 400µl de CWD e 1µl de sémen em 2 tubos;
 - ✓ 400µl de H₂O e 1µl de sémen em 2 tubos;
 - ✓ 200µl de CWD, 200µl de H₂O e 1µl de sémen em 2 tubos.
 - b) Incubaram-se os tubos a 70°C, durante 30min, com agitação constante 400rpm
 - c) Centrifugaram-se a 14000rpm, 5 minutos.
- **Protocolo modificado (iii):**
 - a) Prepararam-se 4 amostras:
 - ✓ Tubo 1 e 2 contendo CWD+SEMEN: 150µl CWD + 1µl SÉMEN
 - ✓ Tubo 1 e 2 contendo CWD+SEMEN+H₂O: 75µl CWD + 75µl H₂O + 1µl SÉMEN
 - b) Agitaram-se os tubos e incubaram-se a 30min a temperatura ambiente (24°C)

- c) Centrifugou-se a 14000rpm, 5 minutos.
- **Protocolo modificado (iv):** 1) Eluição do material contido nas amostras: adicionou-se 200µl H₂O + 200µl CWD à zaragatoa com sémen, sem 1-*Thioglycerol*; Agitaram-se os tubos, incubaram-se à temperatura ambiente durante 30 minutos, sob agitação constante (400rpm) e centrifugou-se durante 3 minutos, a 9000 rpm; 2) Extração do material genético do interior das células: adicionou-se 2µl de 1-*Thioglycerol* por cada amostra, sendo estas novamente agitados, incubadas à 70°C e centrifugadas a 9000 rpm, durante 3 minutos.
 - **Protocolo modificado (v):**
 - a) Eluição do material contido nas amostras: protocolo igual ao recomendado pelo fabricante, exceto o passo em que inicialmente adiciona-se 200µl H₂O + 200µl CWD e, noutro tubo, 200µl de solução tampão SERATEC + 200µl CWD à zaragatoa com sémen; no passo da incubação, os tubos são colocados à temperatura ambiente (24°C) durante 30 minutos, com agitação constante (400rpm) e a centrifugação realizou-se durante 5 minutos, a 14000rpm.
 - **Protocolo modificado (vi):** protocolo igual ao original, acrescentando o passo de purificação e concentração do DNA, com a adição de 100µl de *Lysis Buffer* às amostras, agitação e centrifugação a 10000rpm, durante 2 minutos e colocação destas no extrator de DNA, *Automate Express Forensic DNA Extraction System*.

3.2.2 Extração com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, *Applied Biosystem*

A extração realizada com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* e finalizada no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, da *Applied Biosystem*, é uma técnica desenhada para melhorar a concentração e pureza do DNA isolado a partir de amostras forenses de referência ou problema. Esta metodologia baseia-se na lise dos componentes celulares, na ligação das moléculas de DNA a partículas magnéticas, quimicamente otimizadas de forma a fornecer uma maior superfície de adesão às moléculas de DNA no passo da sua purificação e eluição, na remoção de potenciais inibidores da PCR e na eluição das moléculas de DNA purificadas e concentradas. Apenas a lise celular é efetuada manualmente, sendo que os restantes procedimentos são automatizados no extrator de DNA, *Automate Express Forensic DNA Extraction System*.

A extração com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* foi validada no INMLCF, no SBGF-C, para extração de DNA de amostras problema, recorrendo ao protocolo recomendado pelo fabricante *Applied Biosystems*.⁸¹ Os reagentes do *Kit* encontram-se expressos na Tabela II.

Tabela II Constituintes do *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*

Reagentes do <i>Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction</i>
Solução de <i>dithiothreitol</i> (DTT) 1M (solução comprada ou preparada no laboratório)
<i>Lysis Buffer</i>

Este protocolo compreendeu as seguintes etapas:

1. Marcaram-se os *sample tubes* com as colunas (*Lysep Filter Column*) colocadas nos tubos.
2. Transferiram-se as amostras para as respetivas colunas.
3. Preparou-se a *PrepFiler Lysis Solution*, colocando-se, por cada amostra, 500µL *PrepFiler Lysis Buffer* + 5µL DTT (1M).
4. A cada amostra adicionou-se 500µL desta mistura, garantindo que todas as amostras ficassem completamente submersas.
5. Incubou-se no termomixer a 70°C, durante 40min. Com agitação (750rpm). Nota: os 40min. Não deverão ser excedidos uma vez que poderá resultar na formação de precipitado que pode interferir com a extração realizada no equipamento.
6. Identificaram-se os tubos de eluição (*Elution Tubes*).
7. Centrifugaram-se as amostras durante 2 minutos, a 10000rpm, de forma a obter o lisado. Nota: Se ficou precipitado perto da tampa deve ser removido com papel, limpando à volta da tampa antes de ir para a centrífuga.

NOTA: Se o volume de lisado for inferior a 300µL adicionar *PrepFiler Lysis Buffer* para atingir os 300µL, de forma a evitar que o equipamento acumule ar no seu interior, dificultando a ligação entre as moléculas de DNA e as partículas magnéticas.

Purificação no equipamento *Automate Express Forensic DNA Extraction System*

8. Colocaram-se os tubos contendo o lisado no robô, no *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System*, juntamente com os tubos de eluição, os cartuchos e as pipetas apropriadas para o equipamento.
9. Iniciou-se o programa: START > *PrepFiler* > Volume final 50µl

10. No final, após aproximadamente 30 minutos, obteve-se 50µL de DNA purificado e concentrado respectivos a cada amostra.

3.3 Metodologia de extração diferencial

3.3.1 Protocolo controlo: Extração diferencial *I-sep*, da *Biotype*, a partir de um meio sólido (zaragatoa com sémen e saliva)

Este protocolo compreendeu as seguintes etapas¹⁷:

Obtenção da fase epitelial

1. Colocou-se o termomixer a 56°C com agitação ocasional.
2. Preparou-se a mistura, sendo que, por cada amostra, utilizou-se:
 - a. 480µl *Buffer* DL-MB
 - b. 20µl de 20mg/ml *Proteinase K*
3. As zaragatoas foram colocadas nos respetivos tubos designados ao Protocolo *I-sep* da rotina.
4. Na coluna de cada tubo colocou-se 500µl da mistura anteriormente preparada.
5. Incubaram-se os tubos a 56°C, durante 30min, com agitação ocasional.
6. Centrifugaram-se os tubos 2 minutos, a 7000rpm.
7. Nos tubos obteve-se o lisado da fração epitelial.

Passo de lavagem

8. Identificaram-se novos tubos.
9. Colocou-se a coluna da fase anterior para os novos respetivos tubos.
10. Colocou-se 500µl do *Buffer* DL-MB nos tubos e centrifugou-se 2 minutos, a 7000 rpm.
11. Descartaram-se os tubos.

Obtenção da fase espermática

12. Identificaram-se novos tubos.
13. Colocou-se as colunas nos respetivos tubos.
14. Preparar a mistura e, por cada amostra, colocou-se:
 - a. 460µl *Buffer* DL-MB
 - b. 20µl de 20mg/ml *Proteinase K*
 - c. 20µl de DTT
15. Colocou-se 500µl da mistura recém preparada em cada um dos tubos.
16. Incubaram-se os tubos 1 hora, a 56°C, sem agitação.

17. De seguida, os tubos foram centrifugados 2 minutos, a 7000 rpm.
18. Descartaram-se as colunas e nos tubos obteve-se o lisado da fração espermática

Purificação no robô *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, da *Applied Biosystem*

19. Pipetou-se os 500µl de cada tubo da fração epitelial e fração espermática + Controlo negativo da fração espermática para os tubos adequados com a respetiva nomenclatura.
20. Preparou-se o robô, colocando os cartuchos e as pontas na posição correta assinalada no equipamento.
21. Transferiram-se os lisados obtidos para os tubos de Prepfiler.
22. Colocou-se um tubo de cada vez no robô, cortou-se a tampa e colocou-se o tubo de eluição correspondente no robô.
23. Iniciou-se o programa: START > *PrepFiler* > Volume final 50µl
24. No final, após 30 minutos, retiraram-se os tubos do equipamento e armazenados a -25°C

3.3.2 Protocolo modificado: Extração diferencial *I-sep*, da *Biotype*, + *Casework Direct*, da *Promega* a partir de 50µl da amostra extraída com CWD

As amostras mistura foram extraídas com o *Kit Casework Direct*, recorrendo ao protocolo modificado (iv), mencionado no tópico 3.2.1.

Adicionou-se 500µl da mistura de 480µl *Buffer* DL-MB e 20µl de 20mg/ml *Proteinase K* e por último adicionou-se 50µl do lisado obtido das amostras mistura.

Os passos seguintes são iguais ao protocolo original acima descrito (tópico 3.3.1).

3.4 Testes preliminares

A realização de testes preliminares tem como objetivo a determinação da natureza da amostra, isto é, averiguar se é sémen, saliva ou sangue. Os testes preliminares podem ser de orientação ou de certeza. Numa primeira abordagem realizam-se os testes de orientação, que permitem averiguar a eventual presença de um determinado fluido biológico na amostra e posteriormente os testes de certeza, que permitem afirmar com segurança a presença desse fluido biológico em questão na amostra.

Atualmente, no serviço SGBF-C, o teste preliminar de orientação utilizado para a detecção de sémen é o teste *SERATEC PSA Semiquant*, que consiste num teste rápido imunocromatográfico que deteta a presença da glicoproteína PSA (antigénio específico da próstata), que se encontra em grande quantidade no fluido seminal. Para o teste preliminar de certeza do sémen, é realizada a coloração *Christmas Tree* que permite a observação de espermatozoides ao microscópio ótico.

3.4.1 Teste de orientação para sémen – *SERATEC PSA Semiquant*

O teste *SERATEC PSA Semiquant* é um teste imunocromatográfico que se realiza em apenas um passo. É um teste muito sensível, permitindo a detecção de PSA até 1ng/mL, sendo que, para concentrações elevadas, não ocorre o risco de falso negativo dado ao excesso de substância a detetar na amostra.⁸² O teste recorre à solução tampão fornecida pelo fabricante,⁸² que atua como um solvente da amostra e à cassette de PSA onde se introduz a amostra (Tabela III).

Tabela III Contituíntes do *Kit SERATEC PSA Semiquant*

Reagentes do <i>Kit SERATEC PSA Semiquant</i>
<i>Buffer</i> fornecido com o <i>kit</i>
<i>Cassete de teste</i>

Na janela da cassette é possível visualizar 3 traços: a linha controlo, que serve de controlo para eventuais erros durante o procedimento ou para averiguar acerca da integridade dos componentes da reação, a linha *standard* interno, cuja intensidade de cor reflete uma concentração de PSA de aproximadamente 4ng/mL, e, por último a linha do resultado do teste (T), que reflete a concentração de PSA presente na amostra, estando visível apenas nos testes positivos.⁸²

Pretendeu-se estudar a compatibilidade entre os componentes do Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* e os componentes do o *Kit Casework Direct*.

Este teste preliminar compreendeu as seguintes etapas (modificação ao protocolo):

1. Retirou-se a cassette do invólucro e identificou-se a cassette.

2. Retirou-se 120µl (o equivalente a 3 gotas) do produto de extração da amostra contendo CWD e colocou-se diretamente no poço da cassete.
3. Os resultados foram lidos ao fim de 5min à temperatura ambiente. Os resultados negativos foram confirmados ao fim de 10min.
4. Realizou-se o registo fotográfico.

Interpretação dos resultados:

Existem 3 tipos de resultados possíveis:

- Teste positivo: Observação de três bandas na janela de resultados correspondendo à banda controlo, banda de *standard* interno e à banda de teste.
- Teste negativo: Observação de banda de controlo e de *standard* interno na janela de resultados ao fim de 10 minutos, sem que haja qualquer banda na zona de teste.
- Teste inválido: devem ser considerados inválidos os testes que não apresentem qualquer banda na região controlo e/ou região do *standard* interno.

3.4.2 Teste de confirmação – Coloração *Christmas Tree* para visualização ao microscópio

A Coloração *Christmas Tree* é uma técnica utilizada para a visualização dos espermatozoides ao microscópio. Ao microscópio, os espermatozoides adquirem uma cor rosada, enquanto as células epiteliais adquirem a cor verde. Os reagentes necessários para a realização desta técnica encontram-se na Tabela IV. O objetivo principal deste protocolo foi observar se, de facto, a zaragatoa libertou os espermatozoides para a solução, quando utilizado o *Kit* de Extração *Casework Direct*. Também se pretende testar a compatibilidade dos reagentes da Técnica *Christmas Tree* com o *Kit Casework Direct*.

Tabela IV Reagentes para a realização da Técnica de Coloração *Christmas Tree*

Reagentes da Técnica de Coloração <i>Christmas Tree</i>
Solução de <i>Nuclear Fast Red</i> – Sulfato de alumínio a 0.1% - Solução comercial pronta a usar
Solução de <i>Picro-Índigo-Carmim</i>
Etanol 90%
<i>Entellan</i> (meio de 28uantif)

O protocolo abrangeu as seguintes etapas:

1. Centrifugou-se o remanescente do produto de extração utilizado para a prova de PSA a 9000rpm, durante 3 min.
2. Pipetou-se 20µl do sedimento da amostra para uma lâmina de microscopia devidamente identificada.
3. Fixou-se a amostra com o auxílio do calor numa placa de aquecimento (aproximadamente 60°C) até verificar que a amostra ficou completamente seca.
4. Passou-se a lâmina à chamada da lamparina e deixou-se arrefecer.
5. Colocou-se a lâmina numa câmara húmida, e primeiramente, cobriu-se a amostra com a solução *Nuclear Fast Red*. Esperou-se 15 minutos.
6. Lavou-se cuidadosamente com água destilada.
7. Cobriu-se a amostra com a solução *Picro-Índigo-Carmim* e aguardou-se 15 a 30 segundos.
8. Lavou-se a lâmina recorrendo ao Etanol a 90% e deixou-se secar ao ar livre.
9. Montou-se a lamela com uma gota de *Entellan*, que serve de meio de montagem.
10. Visualizou-se as lâminas ao microscópio ótico com objetiva de 40x. Fez-se o registo fotográfico das amostras positivas.

Interpretação do teste de certeza:

- Teste positivo: Observação de pelo menos 1 espermatozoide completo ou 5 ou mais cabeças.
- Teste negativo: Ausência de espermatozoides ou cabeças ou menos de 5 cabeças na lâmina observada.

3.5 Metodologia de quantificação

3.5.1 Quantificação com o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*

A quantificação absoluta de DNA foi realizada com o *kit Quantifiler Trio DNA Quantification*, de *Applied Biosystems*, no equipamento *7500 Real-Time PCR System*.⁸³ Esta metodologia tem por objetivo determinar a quantidade e qualidade de DNA amplificado e se existem inibidores da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) presentes em solução. Os reagentes do *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification* encontram-se descritos na Tabela V.

Tabela V Constituintes do *Quantifiler Trio DNA Quantification Kit*

Reagentes do <i>Kit Quantifiler Trio DNA Quantification</i>
<i>Quantifiler THP PCR Reaction Mix</i>
<i>Quantifiler Trio Primer Mix</i>
<i>Quantifiler THP DNA Dilution Buffer</i>
<i>Quantifiler THP DNA Standard</i>

O protocolo compreendeu as seguintes etapas⁸³:

1. Agitou-se e centrifugou-se brevemente o tubo de *Quantifiler Trio Primer Mix*. Agitou-se suavemente o tubo de *Quantifiler THP PCR Reaction Mix*.
2. Colocou no tubo, para cada amostra a quantificar:
 - a. *Quantifiler THP PCR Reaction Mix* – 10µL
 - b. *Quantifiler THP Trio Primer Mix* – 8µL
 - c. Fez-se o cálculo para n+2, para prevenir perdas durante a pipetagem.
3. Agitou-se em vortex e centrifugou-se brevemente.
4. Dispensou-se 18µL da mistura por cada um dos poços correspondentes à placa (*Optical 96-Well Reaction Plate*) para a quantificação.
5. Adicionou-se 2µL da amostra, controlo positivo e controlo negativo no poço respetivo.
6. Selou-se a placa com *Optical Adhesive Film*.
7. Centrifugou-se a placa de forma a remover quaisquer bolhas de ar.
8. A placa foi colocada no equipamento *7500 Real-Time PCR System*, durante aproximadamente 1 hora.

Nota: utilizou-se uma curva de calibração realizada anterior, para a qual se realizaram 5 diluições: 50ng/µl, 5ng/µl, 0,5ng/µl; 0,05ng/µl; 0,005ng/µl, em que o R² foi superior a 0,99.

3.6 Metodologia de amplificação

3.6.1 *Kit Powerplex Fusion 6C System*

O *Kit Powerplex Fusion 6C System* permite a amplificação de 23 STR autossómicos (D1S1656, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, CSF1PO, FGA, TH01, vWA, TPOX, SE33, Penta D e Penta E), 3 STR do cromossoma Y (DYS391, DYS570 e DYS56) e Amelogenina. Este *Kit* utiliza um sistema de 6 fluorocromos (FL-6C, JOE-6C, CXR-6C, TOM-6C, WEN-6C) para a deteção automática de fragmentos de DNA.

A amplificação do DNA das amostras de algumas amostras previamente extraídas foi realizada com o *kit Powerplex Fusion 6C System*, PROMEGA, de acordo com as recomendações do fabricante. Os reagentes do *Kit* estão descritos na Tabela VI.

Tabela VI Constituintes do *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega).

Reagentes do <i>Kit Powerplex Fusion 6C System</i>	
Reagentes de Pré-Amplificação	Reagentes de Pós-Amplificação
<ul style="list-style-type: none">• <i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix</i>• <i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i><ul style="list-style-type: none">• <i>2800M Control DNA, 10ng/μL</i>• <i>Water, Amplification Grade</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix</i>• <i>WEN Internal Lane Standard 500</i>

O protocolo compreendeu as seguintes etapas:

1. Preparou-se a mistura dos reagentes *PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix*, *PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix*, amostra (DNA) e *Water, Amplification Grade*, de acordo com a Tabela VII. De forma a minimizar eventuais erros de pipetagem, a mistura foi preparada para n+2 amostras. A mistura foi agitada e centrifugada.
2. Distribuíram-se 10μL da mistura por tubos de PCR previamente identificados.
3. Adicionou-se, por cada tubo, um volume variável de DNA, até 15μl, dependendo dos resultados da quantificação.
 - a. Perfez-se até 15μL.
 - b. Pelo facto de a concentração de DNA adequada para a amplificação ser aproximadamente 1ng/μL, algumas das amostras foram diluídas previamente.
 - c. Sempre que o volume da amostra não atingiu os 15μL perfez-se o volume necessário com água (*Water, Amplification Grade*), de forma a manter o volume final de 25μL.

Tabela VII Preparação das amostras para reação de amplificação por PCR.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix</i>	5 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	5 µL
<i>Amostra (DNA)</i>	Até 15 µL
<i>Water, Amplification Grade</i>	Ajustar até perfazer o volume final
Volume Final	25 µL

4. Prepararam-se os controlos positivos e negativos para amostras problema:
 - a. Controlo Negativo – 10µL da mistura + 15µL de água;
 - b. Controlo Positivo – 10µL da mistura + 1µL de *2800M Control DNA*, 10ng/µL + 14µL de água.
5. A reação de amplificação por PCR das amostras realizou-se no termociclador, *Veriti® 96-well Thermal Cycler (AB)*. O respetivo programa de amplificação utilizado corresponde ao de 29 ciclos, e está descrito na Tabela VIII.

Tabela VIII Programa de amplificação das amostras por PCR.

Programa amplificação por PCR – 29 ciclos				
Incubação Inicial	Desnaturação	Hibridação	Extensão Final	Hold
96°C	96°C	60°C	60°C	4°C
1 minuto	5 segundos	1 minuto	10 minutos	∞

3.7 Separação dos fragmentos amplificados

1. Prepararam-se as amostras para serem aplicadas no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer (AB)*, conforme descrito na Tabela IX: fez-se uma mistura de WEN ILS 500 e Hi-Di *Formamide* e distribuíram-se 10µL desta mistura pelos poços designados de uma placa de 96 poços.

Tabela IX Preparação de amostras para aplicação em sequenciador automático.

Componentes da Reação	Volume (por amostra)
<i>WEN Internal Lane Standard 500</i>	0,5 µL
<i>Hi-Di™ Formamide</i>	9,5 µL
Amostra (produto amplificado)	1 µL
Volume Final	11 µL

2. Adicionou-se 1µL de amostra amplificada no respetivo poço e colocou-se no poço pós amostras, 1µL de *PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix*.
3. Selou-se a placa e centrifugou-se de forma a remover quaisquer bolhas de ar.
4. Colocou-se a placa a desnaturar num equipamento próprio, durante 3 minutos, a 95°C.
5. De seguida, colocou-se a placa no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer*, com um tempo de injeção das amostras de 15 segundos.
6. No final, analisaram-se os eletroferogramas obtidos através do software *GeneMapper® ID-X v1.4 (Applied Biosystems)*.

3.8 Parâmetros estudados

3.8.1 Metodologia dos processos experimentais para a implementação do *kit Casework Direct* na rotina laboratorial

3.8.1.1 *Experiência 1: Testar a compatibilidade do kit Casework Direct com o teste de orientação SERATEC PSA Semiquant, Técnica Christmas Tree e com o kit Quantifiler Trio.*

Preparou-se 8 amostras de sémen, em zaragatoas de nylon: 4 destas com 1µl de sémen e as restantes com 1µl de sémen diluído 1:5 (Tabela XXI, Anexos).

Pretendeu-se fazer uma primeira extração na ausência de *thioglycerol* (protocolo modificado (i), passo 1), do ponto 3.2.1) com o intuito de obtermos os espermatozoides contidos na zaragatoa eluídos em solução, preservando a sua morfologia e integridade celular.

Após a obtenção do sémen eluído na solução de *Casework Direct*, foi usado 120µl para a realização do Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* (protocolo modificado, 3.4.1) e 20µl para a Técnica de Coloração *Christmas Tree* (protocolo 3.4.2), momento em que foi testada a compatibilidade do *kit* de extração com estas duas metodologias.

De seguida foi realizada a extração do material genético do interior das células, das amostras Z1 a Z8 (protocolo modificado (i), passo 2), do ponto 3.2.1), na presença de *thioglycerol*, com o objetivo de quantificar o material genético obtido para cada amostra (Tabela XXI, Anexos). O lisado obtido de DNA foi quantificado com o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*, para testar a sua compatibilidade com *Kit Casework Direct*; saber a quantidade de material genético extraído; a qualidade do material obtido e se existem inibidores da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) presentes em solução. Por conseguinte, foi realizado

novamente o Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* para as mesmas amostras, de forma a testar o efeito de *thioglycerol* na positividade do teste.

3.8.1.2 Experiência 2: Influência da temperatura de incubação na realização do Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant*

- Incubação a temperatura de 70°C

O primeiro teste de compatibilidade realizado teve como objetivo averiguar se a temperatura de incubação de 70°C influenciava na positividade do Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant*. Para esta experiência foram preparadas e extraídas 6 amostras conforme indicado no protocolo modificado (ii), do ponto 3.2.1 (Tabela XXII, Anexos). Foi realizado o Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant*, recorrendo a 3 gotas dos lisados obtidos das amostras (protocolo modificado 3.4.1).

- Incubação a temperatura de 24°C

No segundo teste de compatibilidade realizado, foi testada a temperatura de incubação de 24°C. Para esta experiência foram preparadas e extraídas 4 amostras conforme indicado no protocolo modificado (iii) do ponto 3.2.1 (Tabela XXII, Anexos). Foi realizado novamente o Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* aos lisados obtidos (protocolo modificado 3.4.1).

3.8.1.3 Experiência 3: Testar o protocolo modificado de extração usando o kit *Casework Direct*, por comparação ao protocolo recomendado pela *PROMEGA*

O objetivo desta experiência é comparar o protocolo modificado do *Kit Casework Direct* para a sua implementação na rotina, com o protocolo recomendado pela *PROMEGA*. Desta forma, prepararam-se as zaragoas ZA_PF e ZB_PF, cada uma contendo 1µl de sémen, de forma a seguir o protocolo recomendado pelo fabricante e preparam-se as zaragoas de Z1_PM a Z8_PM, em que as zaragoas de Z1_PM a Z4_PM foram preparadas com 1µl de sémen e as zaragoas de Z5_PM a Z8_PM com 1µl de sémen diluído 1:5, que seguiram o protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1 (Tabela XXIII, Anexos).

Após serem centrifugadas e antes de incubar as amostras novamente a 70°C, foi retirado um volume de 20µl das amostras Z1_PM e Z2_PM e Z5_PM e Z6_PM para a realização da *Christmas Tree*, de forma a confirmar a presença de espermatozoides inteiros ao microscópio e para verificar através dos resultados da quantificação se o facto de centrifugarmos e retirarmos 20µl do sedimento para a técnica de *Christmas Tree* diminui a quantidade de DNA da amostra total. As amostras foram quantificadas usando o *Quantifiler Trio DNA Quantification Kit*.

3.8.1.4 Experiência 4: Testar a compatibilidade do kit de extração diferencial I-sep, da Biotype, com o kit de extração Casework Direct, da PROMEGA

O objetivo deste estudo é testar a compatibilidade do *Kit Casework Direct* com o *Kit I-Sep DNA Extraction Set DL-MB*. Este último *kit* de extração diferencial utilizado no laboratório é aplicado diretamente em amostras forenses de suporte sólido, como, por exemplo, cortes de tecido, lascas de unhas e zaragatoas. Nesta experiência pretende-se recorrer a 50µl do lisado obtido com o *Kit Casework Direct* para a realização da extração diferencial.

Para a realização desta experiência, foram preparadas 12 amostras mistura, contendo saliva e sémen (protocolo 3.1.2) das quais 6 seguiram o protocolo modificado, usando a combinação dos dois *kits* (protocolo 3.3.2) e as restantes 6 seguiram o protocolo controlo 3.3.1 da extração diferencial, usando apenas o *Kit I-Sep DNA Extraction Set DL-MB*, para efeito comparativo (Tabela XXIV, Anexos). No final, foi obtida a fração epitelial e a fração espermática para cada amostra que, posteriormente, foram quantificadas, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*.

3.8.1.5 Experiência 5: 1) Testar o tipo de armazenamento das zaragatoas de nylon (congeladas e secas à temperatura ambiente) ao nível da deteção da PSA; 2) Testar a estabilidade da solução água+CWD+sémen para a semana 0, 1 e 2, ao nível da deteção da PSA e da integridade dos espermatozoides

Primeiramente foram preparadas 16 zaragatoas contendo 1µl de sémen, sendo que 4 das zaragatoas foram colocadas na arca para serem congeladas à temperatura de -25°C e as restantes 12 foram colocadas a secar à temperatura ambiente.

No primeiro ensaio pretendeu-se testar a compatibilidade da solução contendo *Casework Direct Reagent* e água e da solução *Casework Direct Reagent* e *buffer* SERATEC, no próprio dia, após 24h e ao fim de 48h. A eluição do material contido nas zaragatoas foi realizada segundo o protocolo modificado (v) 3.2.1. Para a deteção da PSA no próprio dia, após 24h e ao fim de 48h, recorreu-se ao Teste de Orientação da *SERATEC PSA Semiquant*.

No próprio dia, 2 zaragatoas de sémen armazenadas à temperatura ambiente foram extraídas usando a mistura 200µl H₂O + 200µl CWD e outras duas foram extraídas usando a mistura 200µl de solução tampão SERATEC + 200µl CWD (protocolo modificado (v) 3.2.1). Posteriormente foi realizado o Teste de Orientação da *SERATEC PSA Semiquant*. Após 24h, a experiência foi repetida com outras 4 zaragatoas de sémen armazenadas à temperatura ambiente, nas mesmas condições acima referidas.

Posteriormente, ao fim de 48h, foram extraídas 2 zaragatoas à temperatura ambiente e 2 zaragatoas congeladas usando o mesmo protocolo. Nesta experiência apenas se optou pela mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, pelo facto de o resultado anterior indicar bandas mais nítidas na cassette de SERATEC. Além disso a água, por ser destilada, não possui sais minerais na sua composição que poderiam interagir com os componentes do *Casework Direct Reagent*. De seguida, foi realizado novamente o Teste de Orientação da *SERATEC PSA Semiquant*.

Para a experiência 2, realizou-se a extração do material genético das restantes 2 zaragatoas congeladas e das outras 2 zaragatoas armazenadas à temperatura ambiente, nas mesmas condições anteriores. Esta experiência teve como intuito realizar o teste da estabilidade da solução *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen, armazenada à temperatura de -25°C , ao nível da deteção da PSA e da integridade dos espermatozóides, na semana 0, semana 1 e semana 2. Para a concretização desta experiência, após a centrifugação das amostras, posterior à incubação à temperatura ambiente, foi colocado 120 μl de cada amostra em 3 tubos diferentes de forma a ser testada a sua estabilidade na semana 0, semana 1 e semana 2, através da realização dos testes preliminares: 100 μl para o Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* e 20 μl para a técnica de coloração *Christmas Tree*. Este estudo é importante uma vez que as amostras biológicas colhidas e/ou o material biológico de natureza diversa recebidos no laboratório podem tardar em serem analisadas, pelo facto de serem muitas amostras ou de os procedimentos serem duradouros. Desta forma, a confirmação da estabilidade da solução *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen seria extremamente útil para saber se os testes preliminares poderão ser realizados até 2 semanas após o processo de extração.

3.8.2 Estudo comparativo entre o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* usado na rotina laboratorial de SGBF-C e a extração com o *Kit Casework Direct*

Pretendeu-se realizar um estudo comparativo entre o método de extração pelo *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, *Applied Biosystem*, implementado na rotina do Serviço SGBF-C, com o novo *kit* presente do mercado, o *Kit Casework Direct*, da PROMEGA.

Foram preparadas 4 zaragatoas de nylon e 4 zaragatoas de viscose para cada uma das seguintes concentrações: 1 μl de sémen diluído 1:2, 1 μl , 2 μl , 5 μl e 10 μl de sémen (Tabela XXV, Anexos), usando o protocolo 3.1.1. Duas zaragatoas de cada tipo, viscose e nylon, para cada concentração definida, foram seleccionadas para serem extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic*

DNA Extraction (Tabela XXV, Anexos), no *Automate Express Forensic DNA Extraction System* (protocolo 3.2.2). As restantes 20 foram extraídas com o *Kit Casework Direct* (Tabela XXV, Anexos), através do protocolo recomendado da PROMEGA (protocolo 3.2.1). As 40 amostras foram quantificadas, utilizando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*.

As amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* foram purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System* (protocolo (vi) do ponto 3.2.1) e novamente quantificadas. Neste estudo pretendeu-se verificar se existe compatibilidade entre este *kit* e o robô e se, de facto, o processo de purificação e concentração das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* permitiria obter uma maior quantidade de DNA, isenta de inibidores.

3.8.3 Estudo comparativo entre as zaragatoas de nylon e as zaragatoas de viscose usando o sémen, como fluido biológico

Realizou-se um estudo comparativo entre as zaragatoas de nylon e as zaragatoas de viscose (usadas na rotina laboratorial), com base nos dados de quantificação das amostras, obtidos na experiência anterior. Os dados foram analisados através de gráficos em que se comparou a quantidade de DNA obtida nas zaragatoas extraídas com o mesmo *kit*, para a mesma concentração.

3.8.4 Estudo da compatibilidade entre o *kit Casework Direct* e o *kit de amplificação PowerPlex Fusion 6C System*

Após o passo de extração e quantificação, foram seleccionadas 10 amostras extraídas com o *Kit Casework Direct*, purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, incluindo amostras preparadas com base nos dois tipos de zaragatoas, para serem amplificadas com o *Kit Powerplex Fusion 6C System* (protocolo 3.6.1). As amostras seleccionadas foram as seguintes: AS(1µl_1:2)_CWD+PrepF(1); NS(1µl_1:2)_CWD+PrepF(1); AS(1µl)_CWD+PrepF(1); NS(1µl)_CWD+PrepF(1); AS(2µl)_CWD+PrepF(1); NS(2µl)_CWD+PrepF(2); AS(5µl)_CWD+PrepF(2); NS(5µl)_CWD+PrepF(1); AS(10µl)_CWD+PrepF(1) e NS(10µl)_CWD+PrepF(1).

Posteriormente, as amostras foram aplicadas e detetadas no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer* (AB) para a obtenção dos respetivos eletroferogramas (protocolo 3.6 e 3.7). Esta experiência teve por objetivo estudar a compatibilidade do *Kit Casework Direct* com o *Kit de amplificação Powerplex Fusion 6C System* para a obtenção de perfis de DNA.

4 Resultados e Discussão

4.1 Metodologia dos processos experimentais para a implementação do *Kit Casework Direct* na rotina laboratorial

4.1.1 Experiência 1: Testar a compatibilidade do *Kit Casework Direct* com o teste de orientação *SERATEC PSA Semiquant*, Técnica *Christmas Tree* e com o *Kit Quantifiler Trio*.

Os resultados inerentes ao Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* das 8 amostras de sémen foram negativos, estando visíveis da Figura 9. Além disso, a solução contendo o *Casework Direct Reagent* e o sémen eluído apresentou um percurso irregular e demorado na cassete, para todas as amostras analisadas.



Figura 9 Resultados do teste de orientação *SERATEC PSA Semiquant* das amostras de Z1 a Z8, extraídas com o *Kit Casework Direct*, usando 400µl de Reagente *Casework Direct*, sem a presença de *thioglycerol*.

Para explicar estes resultados, colocam-se as seguintes hipóteses: 1) O Antígeno Específico da Próstata (PSA), sendo uma proteína muito sensível, pode ter-se degradado durante o procedimento devido a fatores como temperatura elevada (70°C), uma vez que, no protocolo recomendado, a amostra é incubada duas horas à agitação contante de 400rpm a 24°C; 2) O Antígeno Específico da Próstata (PSA) pode ter sido degradada por proteínas que possam estar presentes no *Casework Direct Reagent*; 3) O pH do *Casework Direct Reagent* pode ser

diferente do pH do tampão usado no Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant*, pelo que dificulta a reação antigénio-anticorpo da PSA; 4) O *Casework Direct Reagent* pode conter inibidores da reação antigénio-anticorpo da PSA e 5) A solução tampão do teste de PSA da SERATEC pode conter componentes necessários para que a reação antigénio-anticorpo possa ocorrer na cassette.

Embora o Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant* tenha negativado em todas as amostras, prosseguiu-se com a Técnica de Coloração *Christmas Tree* para a visualização ao microscópio, com o objetivo de confirmar a presença de espermatozoides nas amostras.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 10. De acordo com o registo fotográfico, em todas as lâminas foram visualizadas cabeças inteiras de espermatozoides, coradas de vermelho, e as restantes células epiteliais visíveis, coradas de verde. Nas lâminas Z1, Z2 e Z3, contendo 1µl de sémen, foram visualizados cabeças de espermatozoides em maior quantidade, com exceção da lâmina Z4, onde foi visualizado um número mais reduzido dos mesmos. Este resultado pode ser justificado com base em erros de pipetagem que possam ter ocorrido durante o manuseamento da amostra de sémen no processo de extração ou na perda de amostra aquando da aplicação do sedimento na lâmina e como consequência das lavagens efetuadas durante a realização da Técnica de Coloração *Christmas Tree*.

Por sua vez, nas amostras Z5 a Z8, contendo 1µl de sémen diluído 1:5, foram visualizados um número mais reduzido de cabeças de espermatozoides, estando em concordância com a concentração inferior da amostra.

Não foram visualizadas caudas de espermatozoides em nenhuma lâmina, uma vez que o sémen utilizado não é fresco e a cauda é a primeira parte da célula a desintegrar-se. Além disso, estudos realizados no SGBF-C apontam para o facto de velocidades de centrifugação superiores a 9000rpm serem responsáveis pela desintegração das caudas dos espermatozoides, daí a velocidade máxima de 14000 rpm, durante 5 minutos, poder ser responsável pela não visualização de caudas de espermatozoides ao microscópio.

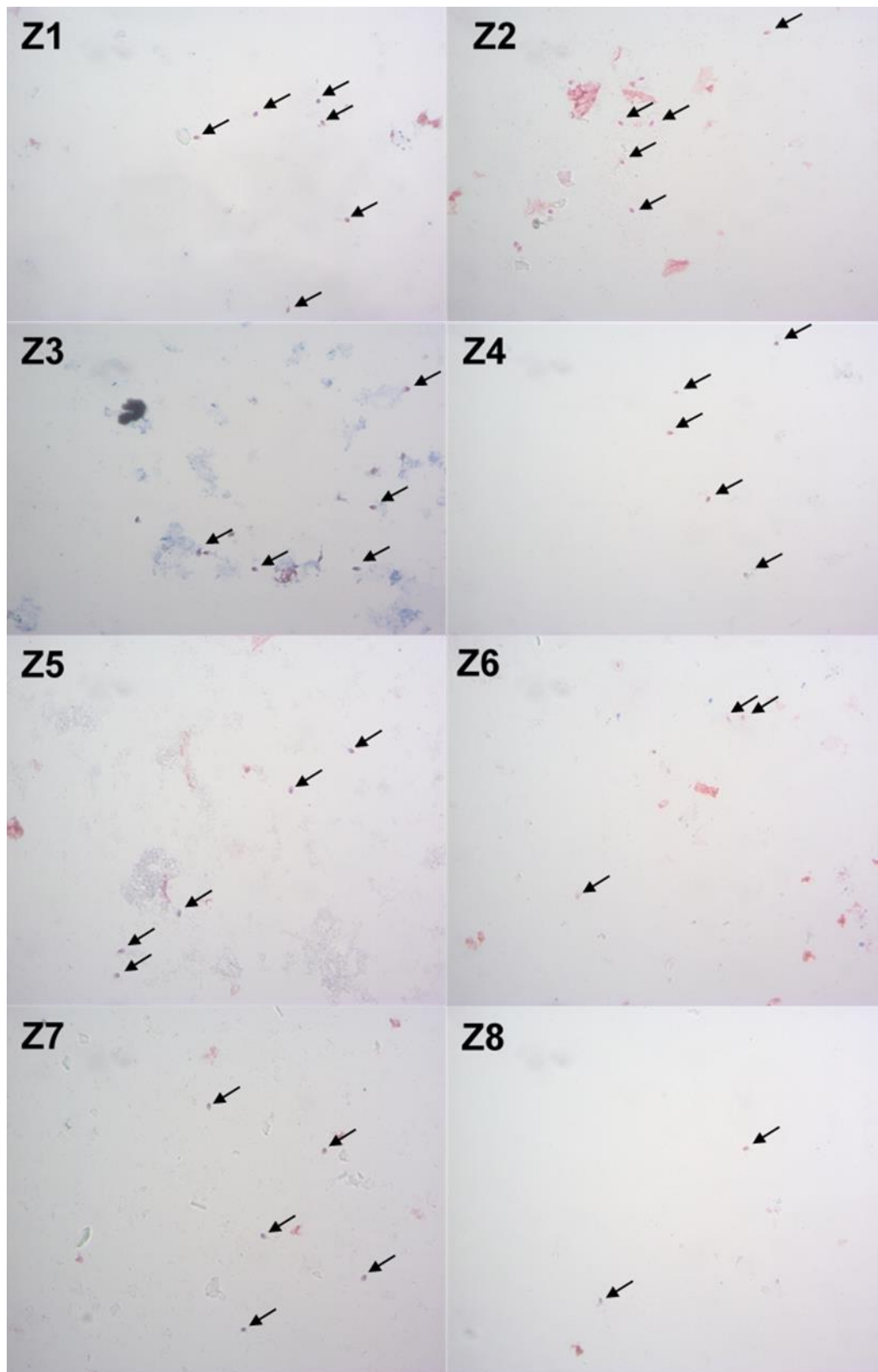


Figura 10 Visualização de cabeças de espermatozoides das amostras Z1 a Z8, extraídas com o *Kit Casework Direct*, utilizando a Técnica de Coloração *Christmas Tree*. As setas apontam para cabeças de espermatozoides presentes em cada amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.

Os resultados da quantificação das amostras Z1' a Z8' com o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*, após a extração do material genético usando o *Kit Casework Direct* na presença de *thioglycerol*, foram representados na Tabela X. Através da visualização dos valores da quantificação dos controlos 0,1ng, 10ng e 40ng, podemos validar os resultados obtidos das amostras, o que significa que a amplificação das mesmas por PCR em Tempo Real ocorreu dentro da normalidade, sem erros de processamento, uma vez que as concentrações finais obtidas dos controlos são muito parecidas às suas concentrações iniciais.

Tabela X Resultados da quantificação das amostras Z1' a Z8', extraídas com o *Kit Casework Direct* e quantificadas com o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*.

	AMOSTRA	HUMAN (ng/μl)	MALE (ng/μl)	M:F RATIO	DEGRADAÇÃO	IPC
1μl Sémen	Z1'	0,0927	0,0727	1:0,2700	Elevado	Indeterminado
	Z2'	0,0864	0,0507	1:0,7000	Elevado	29,9352
	Z3'					Indeterminado
	Z4'	0,0019			Elevado	Indeterminado
1μl Sémen diluído 1:5	Z5'	0,0166	0,0099	1:0,6700	Elevado	29,3099
	Z6'	0,0173	0,0098	1:0,7600	20,4310	29,1674
	Z7'	0,0029	0,0004	1:5,6600	Elevado	Indeterminado
	Z8'	0,0161	0,0077	1:1,1000	Elevado	31,6981
	CTRL (-)					28,6881
	NTC					27,9516
Controlos Internos	0,1ng	0,1136	0,0863	1:0,3200	1,0861	28,4653
	0,1ng	0,1307	0,0977	1:0,3400	1,1640	28,1162
	10ng	16,1641	12,8609	1:0,2600	1,1516	29,2988
	10ng	19,0892	14,0892	1:0,3500	1,2371	29,2062
	40ng	59,4068	46,1948	1:0,2900	1,1729	29,5182
	40ng	59,6523	48,4117	1:0,2300	1,1264	29,7872

Os resultados descritos na Tabela X revelam um índice elevado de degradação em todas as amostras. Além disso, nas amostras Z1', Z3', Z4' e Z7', o IPC apresentou um valor indeterminado, e na amostra Z8' foi aproximadamente 32, que é superior ao limite de ciclos considerado normal (28-30). Os valores indeterminados e elevado de IPC afirmam a presença de inibidores na reação de PCR, pelo que o valor da quantificação obtido apenas pode ser considerado indicativo. Uma das soluções para contornar este resultado seria diluir a amostra

ou purificá-la e novamente quantificá-la. Nas restantes amostras, Z2', Z5' e Z6', o IPC foi inferior a 30.

Esta quantificação não nos permitiu tirar conclusões consistentes acerca da quantidade de DNA contido nas amostras de sêmen.

Os resultados do Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant* das amostras Z1'a Z8' são apresentados na Figura 11. Segundo os resultados obtidos, pode-se afirmar que *thioglycerol* não influencia na positividade do teste, uma vez que o teste foi negativo para todas as amostras analisadas, porém houve uma melhoria ao nível do percurso do fluido na cassete da SERATEC.



Figura 11 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das amostras de Z1' a Z8', extraídas com o *Kit Casework Direct*, usando 400µl de Reagente *Casework Direct* e 2µl de *Thioglycerol*.

4.1.2 Experiência 2: Influência da temperatura de incubação na realização do Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant*

4.1.2.1 Incubação a temperatura de 70°C

Os resultados do Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant* das 6 amostras analisadas constam na Figura 12.

Através destes resultados da Figura 12, pode-se afirmar que a proteína PSA não degrada à temperatura de 70°C, uma vez que, embora nos tubos contendo *Casework Direct Reagent*, água destilada e sêmen eluído em solução o resultado tenha sido negativo, nos tubos

contendo apenas água destilada e sêmen, o resultado foi positivo. Desta forma existem duas hipóteses: 1) no *Casework Direct Reagent* pode existir componentes que são responsáveis por reagir com a PSA a 70°C, impossibilitando-a de participar na reação antigénio-anticorpo e 2) *Casework Direct Reagent* pode interferir com os componentes da cassete, dificultando a reação anticorpo-antigénio da PSA.



Figura 12 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das amostras incubadas a 70°C, durante 30 minutos, contendo 400µl de *Casework Direct Reagent* e 1µl de sêmen (T1CWD+SÉMEN e T2CWD+SÉMEN), 400µl de H₂O e 1µl de sêmen (T1H₂O+SÉMEN e T2H₂O+SÉMEN) e 200µl de CWD, 200µl de H₂O e 1µl de sêmen (T1CWD+ H₂O+SÉMEN e T2CWD+ H₂O+SÉMEN).

4.1.2.2 Incubação a temperatura de 24°C

Os resultados do Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant* para as 2 amostras contendo CWD e sêmen, e para as outras 2 amostras contendo CWD, sêmen e água, incubadas à temperatura de 24°C, com agitação constante, durante 30 minutos, estão apresentados na Figura 13. Os resultados do teste foram positivos em todas as amostras. As amostras do tubo 1 e 2 contendo *Casework Direct Reagent* e sêmen correram mais lentamente e de forma irregular enquanto que as amostras do tubo 1 e 2 contendo *Casework Direct Reagent*, água destilada e sêmen correram mais rápido e de forma regular na cassete. Esta experiência pode indicar que, de facto, a incubação a 70°C, afeta a positividade do Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant*, uma vez que interfere, de certa forma, com os componentes do *Casework Direct Reagent*, impedindo a deteção da PSA.



Figura 13 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das amostras contendo 150 μ l *Casework Direct Reagent* + 1 μ l sémen (1CWD+SÉMEN e 2CWD+SÉMEN), 75 μ l *Casework Direct Reagent* + 75 μ l água destilada + 1 μ l sémen (1CWD +H₂O+SÉMEN e 2CWD +H₂O+SÉMEN), incubadas a 24°C, com agitação constante, durante 30 minutos.

4.1.3 Experiência 3: Testar o protocolo modificado de extração usando o *Kit Casework Direct*, por comparação ao protocolo recomendado pela PROMEGA

Os resultados da visualização ao microscópio das amostras Z1_PM, Z2_PM, Z5_PM e Z6_PM estão representados na Figura 14. Pela análise da Figura 14, afirma-se a presença de inúmeras cabeças de espermatozoides ao microscópio, embora nas lâminas Z1_PM e Z2_PM tenham sido observadas em maior quantidade do que nas lâminas Z5_PM e Z6_PM, tal como esperado, visto que as últimas foram feitas com base na solução contendo sémen diluído 1:5. Aquando do processo de centrifugação, observou-se que a centrifugação a 9000rpm, durante 3 minutos, não foi suficiente para que a solução de *Casework Direct* descesse da coluna para o tubo nalgumas das amostras, o que levou a que estas fossem novamente centrifugadas a velocidade de 14000, durante 5 minutos.

Na Tabela XII estão representados os resultados da quantificação usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification* das amostras ZA_PF, ZB_PF e Z1_PM a Z8_PM. Os resultados foram validados através da análise dos controlos 0,1ng, 10ng e 40ng, cujas concentrações finais são muito parecidas às concentrações iniciais, o que significa que a quantificação ocorreu dentro da normalidade. Nos controlos negativos não foi detetado material genético, o que significa que não houve contaminação dos reagentes envolvidos na reação. Foi obtido um IPC indeterminado em duas amostras ZB_PF e Z4_PM e um IPC superior a 30 na amostra ZA_PF, pelo que estas amostras foram diluídas 1:2 e novamente quantificadas. Em relação ao nível de degradação do DNA, este encontra-se com boa qualidade, em todas as amostras, pois apresenta um índice de degradação baixo. Os valores de concentração de DNA expressos na Tabela XI, foram comparados através do Gráfico I.A.

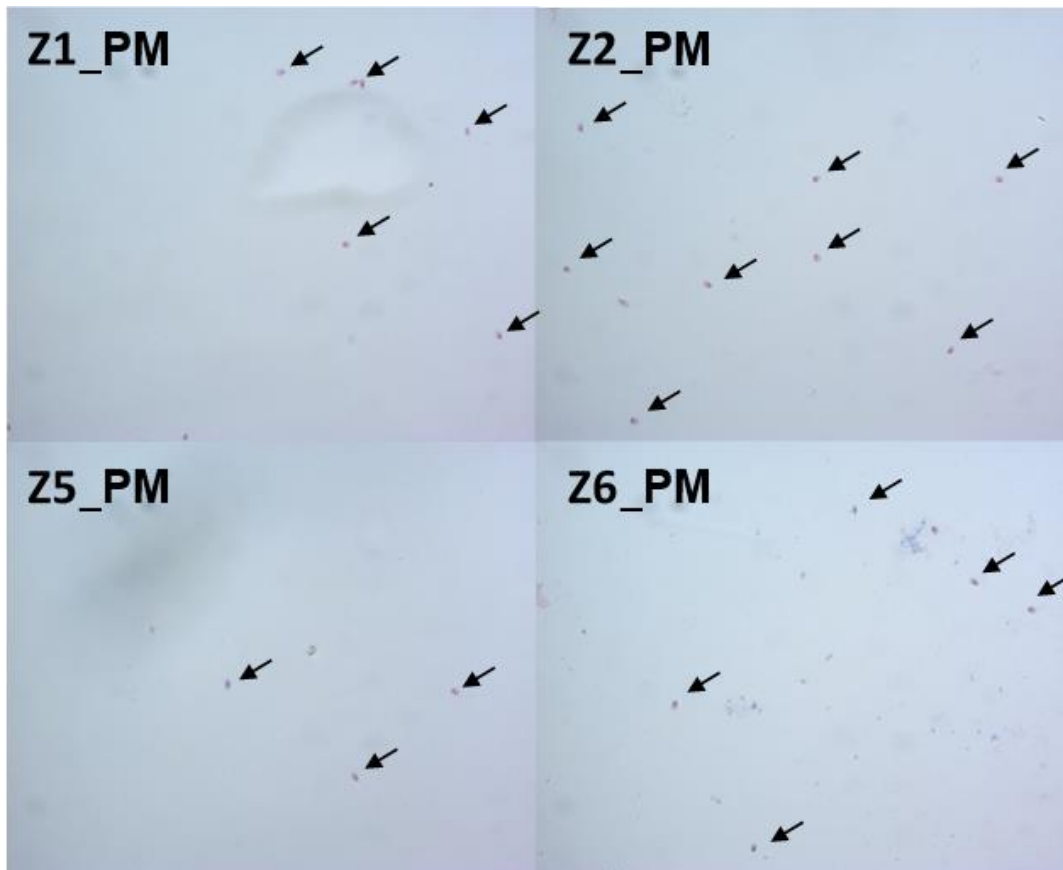


Figura 14 Visualização de cabeças de espermatozoides das amostras Z1_PM, Z2_PM, Z5_PM e Z6_PM, extraídas com o *Kit Casework Direct* (protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1), utilizando a Técnica de Coloração *Christmas Tree*. As setas apontam para as cabeças de espermatozoides presentes em cada amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.

Com base no Gráfico I.A, podemos observar que a quantidade de DNA extraído das zaragatoas Z3_PM e Z4_PM, onde se usou 200µl de *Casework Direct Reagent* e 200µl de água destilada foi superior ao DNA extraído das zaragatoas ZA_PF e ZB_PF, onde foi usado 400µl de *Casework Direct Reagent*, tal como recomendado pela PROMEGA. A percentagem de aumento foi calculada a partir das médias dos valores de quantificação (Tabela XII) obtidos para cada amostra, estando representada no Gráfico I.B. A percentagem de aumento das amostras (Z3_PM e Z4_PM), para a *Human DNA*, foi de 31,78% e, para a *Male DNA*, foi de 60,59%, quando comparadas com as médias das amostras (ZA_PF e ZB_PF).

Tabela XI Resultados da quantificação das amostras ZA_PF e ZB_PF (1µl de sémen), extraídas com o *Kit Casework Direct*, protocolo recomendado pelo fabricante e das amostras Z1_PM a Z4_PM (1µl de sémen) e Z5_PM a Z8_PM (1µl de sémen diluído 1:5), extraídas com o *Kit Casework Direct*, protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. O símbolo (*) indicam as amostras que foram diluídas 1:2 e novamente quantificadas.

	AMOSTRA	HUMAN (ng/µl)	MALE (ng/µl)	M:F RATIO	DEGRADAÇÃO	IPC
1µl Sémen	Z1_PM	0,0491	0,0939	1:-0,4800	0,7411	30,1581
	Z2_PM	0,0906	0,1649	1:-0,4500	0,5910	29,5001
	Z3_PM	0,4386	0,6652	1:-0,3400	0,7044	29,2872
	Z4_PM*	0,3666	0,4496	1:-0,1800	0,5870	29,3597
1µl Sémen diluído 1:5	Z5_PM	0,0056	0,0117	1:-0,5200	0,5696	29,3189
	Z6_PM	0,0076	0,0159	1:-0,5200	0,4615	29,3346
	Z7_PM	0,0878	0,1315	1:-0,3300	1,1165	29,4515
	Z8_PM	0,0561	0,0837	1:-0,3300	0,7200	29,6928
	CTRL (-) 1					28,9948
1µl Sémen	ZA_PF*	0,2402	0,2728	1:-0,1200	0,5670	28,8290
	ZB_PF*	0,3708	0,4214	1:-0,1200	0,6028	28,8495
	CTRL (-) 2					29,2117
	NTC					28,3054
Controlos internos	0,1ng	0,1146	0,1177	1:-0,0300	0,8632	28,4343
	0,1ng	0,1062	0,1115	1:-0,0500	0,7473	28,2163
	10ng	12,2563	15,2416	1:-0,2000	0,7704	29,2676
	10ng	13,8500	16,8570	1:-0,1800	0,8037	29,0319
	40ng	40,0478	54,5808	1:-0,2700	0,7595	29,1211
	40ng					Indeterminado

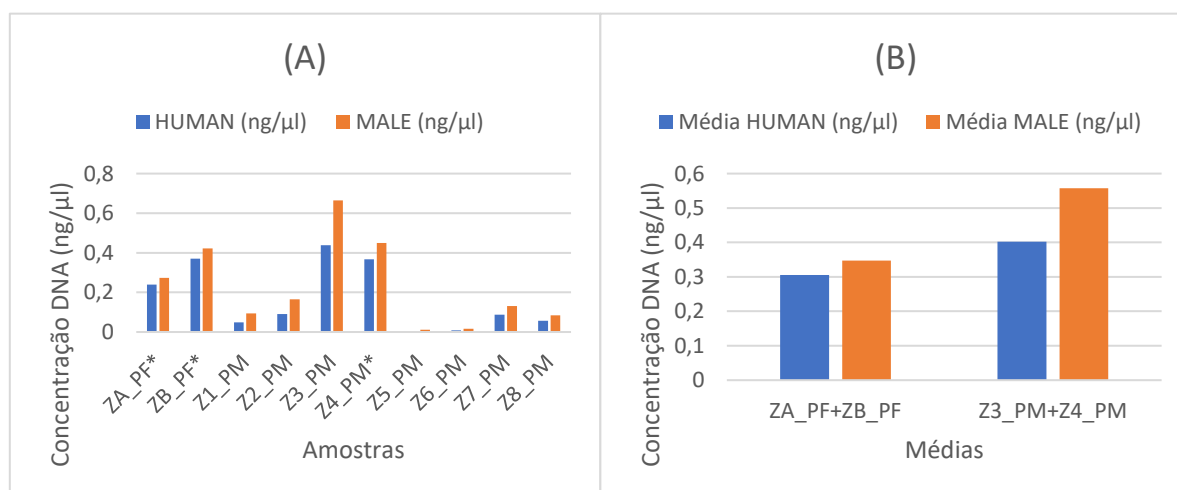


Gráfico I (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras ZA_PF e ZB_PF (1µl de sémen), extraídas com o *Kit Casework Direct*, protocolo recomendado pelo fabricante e das amostras Z1_PM a Z4_PM (1µl de sémen) e Z5_PM a Z8_PM (1µl de sémen diluído 1:5), extraídas com o *Kit Casework Direct*, protocolo modificado (iv) do ponto 3.2.1, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (B) Comparação das médias dos valores obtidos na quantificação das amostras (ZA_PF+ZB_PF) com a média dos valores das amostras (Z3_PM+Z4_PM).

Tabela XII Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras (Z3_PM e Z4_PM) e (ZA_PF e ZB_PF) para a *Human DNA* e *Male DNA*, segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de aumento} = \frac{\bar{X}_{Z3_{PM}Z4_{PM}} - \bar{X}_{ZA_{PF}ZB_{PF}}}{\bar{X}_{ZA_{PF}ZB_{PF}}} \times 100\%$$

	HUMAN DNA (ng/μl)	MALE DNA (ng/μl)
$\bar{X}_{ZA_{PF}ZB_{PF}}$	0,3055	0,3471
$\bar{X}_{Z3_{PM}Z4_{PM}}$	0,4026	0,5574
Percentagem de Aumento	31,78%	60,59%

Nos resultados da quantificação pretendeu-se verificar se as amostras Z1_PM, Z2_PM, Z5_PM e Z6_PM, ao serem centrifugadas na sua totalidade e ao retirar-se 20μl do fundo do tubo, perdem muito material genético para a realização da Técnica de *Christmas Tree*. Tal como se pode observar no Gráfico I.A, para as amostras contendo 1μl de sémen, Z1_PM e Z2_PM apresentam uma menor concentração ao nível de *Human DNA* e de *Male DNA* quando comparadas com as amostras Z3_PM e Z4_PM. O mesmo facto pode ser notado para as amostras contendo 1μl sémen diluído 1:5, em que Z5_PM e Z6_PM apresentam uma menor concentração ao nível de *Human DNA* e de *Male DNA* quando comparadas com as amostras Z7_PM e Z8_PM.

Tabela XIII Cálculo da percentagem de diminuição a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras (Z1_PM+Z2_PM); (Z3_PM +Z4_PM) e (Z5_PM +Z6_PM); (Z7_PM +Z8_PM) para a *Human DNA* e *Male DNA*, segundo as fórmulas:

$$\text{Percentagem de diminuição} = \frac{|\bar{X}_{Z1_{PM}Z2_{PM}} - \bar{X}_{Z3_{PM}Z4_{PM}}|}{\bar{X}_{Z3_{PM}Z4_{PM}}} \times 100\%$$

$$\text{Percentagem de diminuição} = \frac{|\bar{X}_{Z5_{PM}Z6_{PM}} - \bar{X}_{Z7_{PM}Z8_{PM}}|}{\bar{X}_{Z7_{PM}Z8_{PM}}} \times 100\%$$

	HUMAN (ng/μl)	MALE (ng/μl)
$\bar{X}_{Z1_{PM}Z2_{PM}}$	0,06985	0,1294
$\bar{X}_{Z3_{PM}Z4_{PM}}$	0,4026	0,5574
Percentagem Diminuição	82,65%	76,79%
$\bar{X}_{Z5_{PM}Z6_{PM}}$	0,0066	0,0138
$\bar{X}_{Z7_{PM}Z8_{PM}}$	0,07195	0,1076
Percentagem Diminuição	90,83%	87,17%

A percentagem de DNA masculino perdido nas amostras de 1μl sémen para *Human DNA* é 82,65% e para *Male DNA* é de 76,79%, sendo que para as amostras contendo 1μl sémen

diluído na proporção de 1:5, a percentagem de DNA masculino perdido para *Human DNA* é 90,83% e para *Male DNA* é de 87,17% (Tabela XIII).

Estes dados reforçam o facto de, ao centrifugar e ao retirar 20µl do sedimento total da amostra, para a realização da Técnica de Coloração *Christmas Tree*, retira-se muito material genético da solução. Este passo do protocolo pode ser uma desvantagem quando se manipulam amostras problema, uma vez que estas contêm uma reduzida quantidade de DNA, o que pode dificultar na obtenção de um perfil completo do perpetuador, no caso de uma agressão sexual.

Uma possível modificação ao protocolo seria a de retirar 140µl do lisado extraído para um novo tubo, centrifugar a 9000rpm, durante 3min e retirar 120µl do sobrenadante para a realização do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* e 20µl do sedimento para a técnica de *Christmas Tree*, de forma a evitar a perda de muito material genético aquando da realização dos testes preliminares.

4.1.4 Experiência 4: Testar a compatibilidade do *kit* de extração diferencial *I-sep*, da *Biotype*, com o *kit* de extração *Casework Direct*, da *PROMEGA*

Os resultados da quantificação da fração epitelial e da fração espermática para cada amostra mistura, obtidas a partir do protocolo original e do protocolo modificado constam na Tabela XIV. Estes resultados foram analisados com recurso a gráficos de comparação da concentração de DNA detetada nas amostras contendo a fração epitelial e nas amostras contendo a fração espermática (Gráfico II).

Pela análise direta do Gráfico II, observamos uma elevada discrepância entre a quantidade de material genético obtido na extração diferencial usando o protocolo original de extração diferencial *I-sep*, partindo de uma zaragatoa de saliva e sémen e a quantidade de material genético obtido usando o protocolo modificado *I-sep*, partindo de 50µl de uma solução de extração pelo *Kit Casework Direct*. Comparando os valores de quantificação obtidos para as frações epitelial (Gráfico II.A) e espermática (Gráfico II.B) de cada amostra, verifica-se que as amostras extraídas com o protocolo original apresentam claramente um valor muito superior e discrepante da concentração de DNA, quando comparadas com as amostras extraídas através do protocolo modificado.

Tabela XIV Resultados da quantificação das 12 amostras mistura, contendo saliva e sêmen, extraídas através do protocolo modificado 3.3.2 e através do protocolo controlo 3.3.1 da extração diferencial, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*.

Amostra	HUMAN (ng/ul)	MALE (ng/ul)	M:F Ratio	Degradation	IPC
FB_Epit_ISEP	69,8475	0,1666	1:418,1700	0,8196	31,3938
VL_Epit_ISEP	91,2755	0,2411	1:377,6400	0,8312	30,7574
VB_Epit_ISEP	70,1523	0,2312	1:302,4700	0,8334	30,3847
CS_Epit_ISEP	58,0571	0,0375	1:1547,5500	0,8435	30,3814
AMB_Epit_ISEP	53,9647	0,0451	1:1195,2800	0,7959	30,416
PM_Epit_ISEP	39,7468	0,0369	1:1076,6500	0,6309	30,7594
FB_Epit_ISEP + CWD	1,0738	0,0019	1:563,8500	1,0489	28,9872
VL_Epit_ISEP + CWD	0,9595	0,0073	1:130,5200	1,1128	29,234
VB_Epit_ISEP + CWD	0,487	0,0031	1:156,7000	1,1418	28,6508
CS_Epit_ISEP + CWD	1,0461	0,0008	1:1268,9200	0,8818	28,9649
AMB_Epit_ISEP + CWD	1,1606	0,0008	1:1413,7700	0,9086	28,6199
PM_Epit_ISEP + CWD	0,724	0,0012	1:610,8500	0,927	28,483
FB_Esp_ISEP	5,3039	0,2199	1:23,1200	0,6963	29,6113
VL_Esp_ISEP	2,02	0,2803	1:6,2100	0,6852	29,2387
VB_Esp_ISEP	4,0913	0,3709	1:10,0300	0,7488	29,764
CS_Esp_ISEP	5,9893	0,0994	1:59,2500	0,8286	30,4571
AMB_Esp_ISEP	1,5645	0,1002	1:14,6200	0,6237	29,0857
PM_Esp_ISEP	1,8945	0,097	1:18,5300	0,6348	28,8135
FB_Esp_ISEP + CWD	0,0011			1,1434	28,1656
VL_Esp_ISEP + CWD	0,0146	0,0156	1:-0,0700	0,4448	28,2463
VB_Esp_ISEP + CWD	0,0017	0,0024	1:-0,2700	0,7538	28,1251
CS_Esp_ISEP + CWD	0,0114	0,0011	1:9,7300	0,6821	28,1918
AMB_Esp_ISEP + CWD	0,0008			1,0315	28,152
PM_Esp_ISEP + CWD	0,003	0,005	1:-0,4000	0,4624	28,2156
Ctrl(-)_Epit_ISEP + CWD					28,336
Ctrl(-)_Esp_ISEP + CWD					28,2681
NTC					28,1123
0,1 ng	0,1422	0,1385	1:0,0300	0,7965	28,3774
0,1 ng	0,1155	0,155	1:-0,2500	0,6984	28,6741
10 ng	15,5467	17,6661	1:-0,1200	0,7152	30,0209
10 ng	15,7995	18,0436	1:-0,1200	0,7257	29,6224
40 ng	54,3269	56,0079	1:-0,0300	0,835	30,1602
40 ng	50,0355	55,4129	1:-0,1000	0,8146	30,1138

Adicionalmente, na extração diferencial com o *Kit I-sep*, verifica-se que, de facto, o *kit* não é completamente eficiente, uma vez que na fração espermática encontra-se parte da fração epitelial não separada de forma eficaz. Por conseguinte, o perfil de STR obtido seria um perfil mistura e não um perfil singular masculino. Este facto também pode ter sido agravado pela reduzida quantidade de sémen utilizada em relação à quantidade de saliva obtida nas zaragatoas bucais.

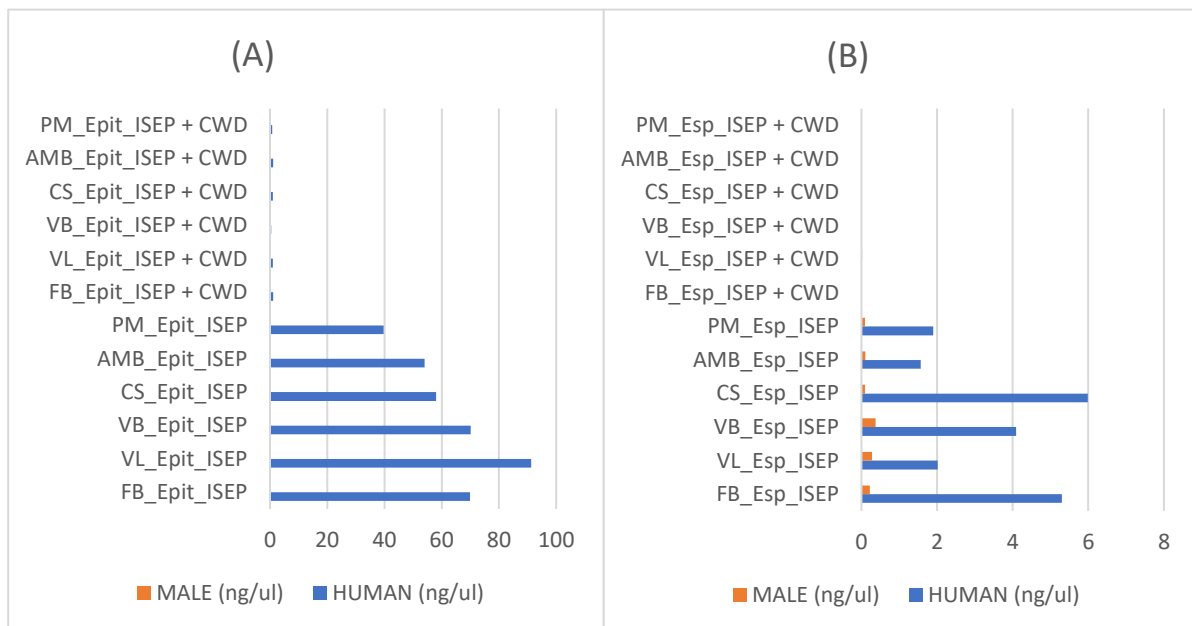


Gráfico II Comparação da quantidade de DNA da fração epitelial (A) e da fração espermática (B) proveniente das amostras mistura contendo saliva e sémen extraídas com o protocolo original 3.3.1 e através do protocolo modificado 3.3.2 da extração diferencial. As amostras foram quantificadas através do *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*.

4.1.5 Experiência 5: 1) Testar o tipo de armazenamento das zaragatoas de nylon (congeladas à temperatura de -25°C e secas à temperatura ambiente) ao nível da deteção da PSA; 2) Testar a estabilidade da solução água+CWD+sémen para a semana 0, 1 e 2 ao nível da deteção da PSA e da integridade dos espermatozoides

Os resultados do teste de orientação da SERATEC PSA *Semiquant* das 4 amostras armazenadas à temperatura ambiente para o dia 0, constam na Figura 15. Tal como se pode observar, todos os testes de orientação SERATEC PSA *Semiquant* foram positivos para o dia 0, apesar das amostras extraídas através da mistura Casework Direct Reagent, água

destilada apresentarem a banda do teste mais intensa e nítida do que as amostras extraídas através da mistura de *Casework Direct Reagent* com a solução tampão da SERATEC.

Os resultados do teste de orientação da SERATEC PSA *Semiquant* das outras 4 zaragatoas de sêmen armazenadas à temperatura ambiente, ao fim de 24h constam na Figura 16, sendo semelhantes aos resultados obtidos anteriormente.



Figura 15 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das 4 amostras de sêmen armazenadas à temperatura ambiente e extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada e com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e *buffer* SERATEC, incubadas a 24°C, 30min (Dia 0).



Figura 16 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das 4 amostras de sêmen armazenadas à temperatura ambiente e extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada e com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e *buffer* SERATEC, incubadas a 24°C, 30min (após 24h).

Posteriormente, após 48h, foram extraídas novamente 2 zaragatoas armazenadas à temperatura ambiente e 2 zaragatoas congeladas à temperatura de -25°C usando o mesmo protocolo. Devido aos resultados da experiência obtidos ao fim de 24h, ao fim de 48h apenas se optou pela mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, pelas razões anteriormente apresentadas. De seguida, foi realizado novamente o Teste de Orientação, cujos resultados estão apresentados na Figura 17.

Através da análise dos resultados, constatamos que, ao fim de 48h, as zaragatoas armazenadas à temperatura ambiente e as zaragatoas congeladas à temperatura de -25°C

conferem resultados positivos no Teste de Orientação da *SERATEC PSA Semiquant*, cuja banda está nitidamente visualizada na cassete.

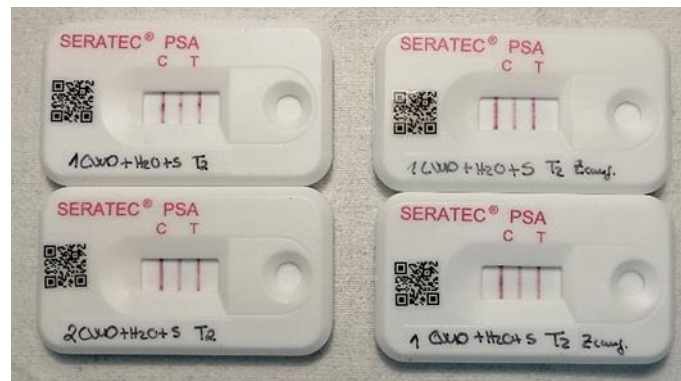


Figura 17 Resultados do teste de orientação *SERATEC PSA Semiquant* de 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente e de 2 amostras de sémen congeladas à temperatura de -25°C e extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, incubadas a 24°C , 30min (após 48h).

Realizou-se a extração do material genético das restantes 2 zaragatoas congeladas à temperatura de -25°C e das outras 2 zaragatoas armazenadas à temperatura ambiente, ao fim de 48h, nas mesmas condições anteriores.

Os resultados obtidos para a semana 0, do teste de orientação *SERATEC PSA Semiquant* estão representados na Figura 18 e da visualização ao microscópio estão presentes na Figura 19 e na Figura 20.



Figura 18 Resultados do teste de orientação *SERATEC PSA Semiquant* das zaragatoas de sémen (2 armazenadas à temperatura ambiente e 2 congeladas à temperatura de -25°C), extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, ao fim de 48h.



Figura 19 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen congeladas à temperatura de -25°C, extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, ao fim de 48h, através da técnica *Christmas Tree*. As setas assinalam as cabeças de espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.



Figura 20 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente, extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, ao fim de 48h, através da técnica *Christmas Tree*. As setas assinalam as cabeças de espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.

É possível observar que em todas as amostras o resultado de orientação da SERATEC foi positivo e em relação à visualização ao microscópio, em todas as amostras foram identificados

cabeças de espermatozoides. Estes testes realizados permitiram, de facto, afirmar que ocorreu a eluição da amostra de sémen para a solução de CWD, o que possibilitou a repetição dos testes preliminares, para a semana 1 e 2.

Para a 1ª semana, os resultados obtidos no teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* constam na Figura 21 e o registo fotográfico da visualização das amostras ao microscópio consta na Figura 22 e na Figura 23. Para esta semana, obteve-se, de igual forma, resultados positivos em ambos os testes preliminares. Contudo, numa das zaragatoas armazenadas à temperatura ambiente (Z2) foi encontrado apenas uma cabeça de espermatozoide, pelo que tal se pode dever ao facto de o sémen ser uma amostra muito viscosa, tornando a pipetagem inconsistente, pelo que pode ter ocorrido uma pipetagem não homogénea para os 3 tubos designados para cada semana. Apesar deste resultado em concreto, pode-se afirmar que, à temperatura de -25°C, a solução *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen manteve-se estável, para a primeira semana, uma vez que o teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* foi positivo e visualizou-se cabeças de espermatozoides intactas, o que significa que mantiveram a sua morfologia e integridade física.



Figura 21 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das zaragatoas de sémen (2 armazenadas à temperatura ambiente, representadas à esquerda na imagem e 2 congeladas, representados à direita na imagem), extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, e armazenadas à temperatura de -25°C (semana 1).

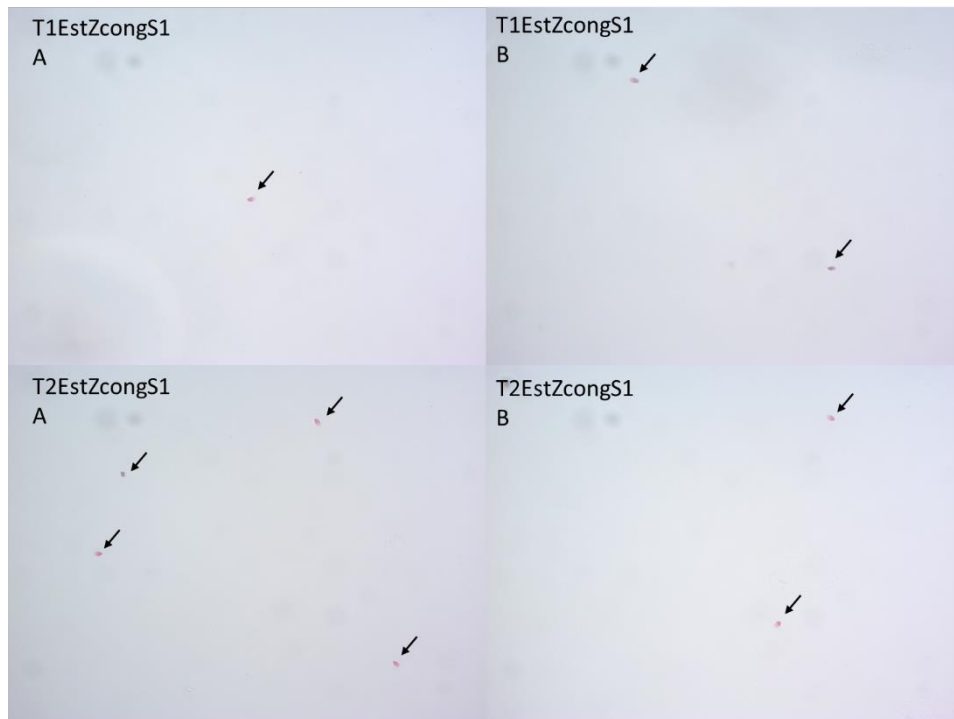


Figura 22 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen congeladas, extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C , na semana 1, através da técnica *Christmas Tree*. As setas assinalam as cabeças dos espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.



Figura 23 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente, extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C , semana 1, através da técnica *Christmas Tree*. As setas assinalam as cabeças dos espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.

Para a 2ª semana, foram realizadas os mesmos testes preliminares, cujos resultados estão representados na Figura 24, Figura 25 e na Figura 26. Tal como podemos observar, o teste

de orientação SERATEC PSA *Semiquant* foi positivo em todas as amostras de sémen (Figura 24) e foi observado ao microscópio um elevado número de cabeças de espermatozoides, incluindo nas zaragatoas armazenadas à temperatura ambiente, onde, anteriormente, na 1ª semana, apresentaram um reduzido número destas células (Figura 26).

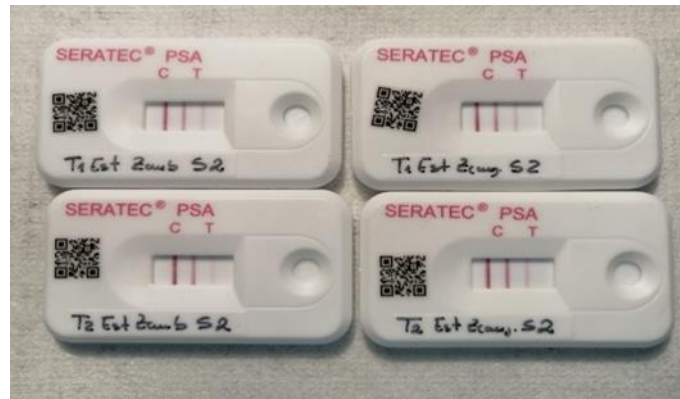


Figura 24 Resultados do teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant* das zaragatoas de sémen (2 armazenadas à temperatura ambiente, representadas à esquerda na imagem e 2 congeladas, representados à direita na imagem), extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada e armazenadas à temperatura de -25°C (semana 2).

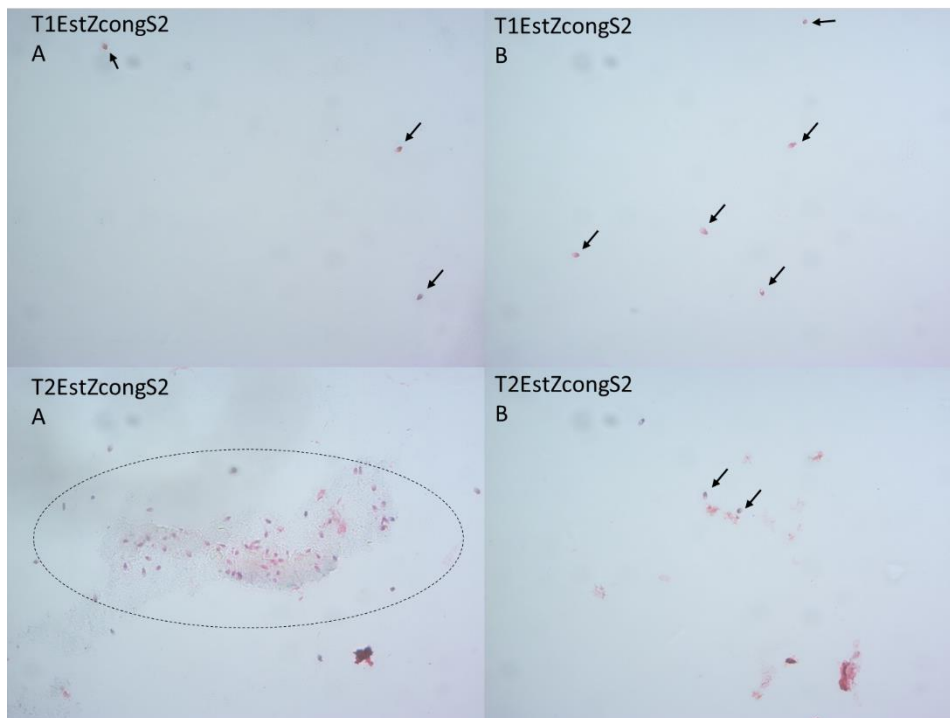


Figura 25 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen congeladas, extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C , semana 2, através da técnica Christmas Tree. As setas assinalam os espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.

Este resultado corrobora o facto da pipetagem poder não ter sido completamente homogénea, entre tubos, devido à natureza do sémen.

Em suma, a solução de *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen permanece estável mesmo após duas semanas de armazenamento à temperatura de -25°C (sendo uma vantagem para a sua implementação na rotina laboratorial).



Figura 26 Visualização de cabeças de espermatozoides das 2 amostras de sémen armazenadas à temperatura ambiente, extraídas com base na mistura de *Casework Direct Reagent* e água destilada, armazenadas à temperatura de -25°C , semana 2, através da técnica *Christmas Tree*. As setas assinalam os espermatozoides presentes na amostra. Microscópio ótico, ampliação 400x.

4.2 Estudo comparativo entre o *Kit Prepfiler Forensic DNA Extraction* usado na rotina laboratorial de SGBF e a extração com o *Kit Casework Direct*

Os resultados de quantificação de todas as amostras extraídas para este estudo encontram-se reunidos na Tabela XV.

Tabela XV Resultados obtidos da quantificação, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*, das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct*, não purificadas, as amostras extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* e as amostras extraídas com CWD e purificadas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*. O símbolo (*) indica as amostras que foram diluídas 1:2 e novamente quantificadas; o resultado da quantificação expresso é o resultado da quantificação multiplicado por 2.

Amostra	CWD		Prepfiler		CWD+Prepfiler	
	Human (ng/μl)	Male(ng/μl)	Human (ng/μl)	Male(ng/μl)	Human (ng/μl)	Male(ng/μl)
AS(1μl_1:2)_ (1)	0,0212	0,0741	1,6722	1,610 3	0,2970	0,2031
AS(1μl_1:2)_ (2)	0,0375	0,0910	1,5598	1,4596	0,1754	0,1179
NS(1μl_1:2)_ (1)	0,1440*	0,2816*	2,2781	2,5885	0,8480	0,6317
NS(1μl_1:2)_ (2)	0,0794*	0,2082*	1,6049	1,7991	0,6555	0,4356
AS(1μl)_ (1)	0,1168	0,3859	2,3458	2,8530	0,7018	0,4721
AS(1μl)_ (2)	0,2514	0,6949	2,5135	3,1001	1,3698	1,0389
NS(1μl)_ (1)	0,1756*	0,3796*	5,0809	5,7283	1,4871	1,0014
NS(1μl)_ (2)	0,2648*	0,4754*	3,2597	3,7911	1,9391	1,2578
AS(2μl)_ (1)	0,9334	1,5522	5,9024	8,1357	1,3994	0,9771
AS(2μl)_ (2)	0,8103	1,9757	6,6532	7,8539	5,3822	3,8426
NS(2μl)_ (1)	0,3150*	0,6662*	5,9355	8,7267	2,4238	1,7432
NS(2μl)_ (2)	0,5102*	1,0052*	8,1902	11,5013	3,6487	2,7503
AS(5μl)_ (1)	0,6829	1,6097	39,1099	38,7761	3,3102	2,3899
AS(5μl)_ (2)	1,2453	3,0719	9,4115	13,9712	6,6176	4,9373
NS(5μl)_ (1)	2,5812*	4,4160*	13,0580	18,5207	16,0888	10,5981
NS(5μl)_ (2)	1,3400*	2,6388*	7,9524	11,9000	9,8371	6,2269
AS(10μl)_ (1)	1,6654	3,7637	5,2210	13,7280	5,4918	5,2471
AS(10μl)_ (2)	2,6974	6,3280	21,9880	32,7405	10,1528	9,2936
NS(10μl)_ (1)	3,5316*	6,6694*	33,3728	51,0462	18,3015	13,8710
NS(10μl)_ (2)	11,924*	14,7112*	57,9957	74,1726	39,9522	31,4097
Ctrl(-)	0,0004	0,0006				
Ctrl(-)_1_PrepF			-	-		
Ctrl(-)_2_PrepF			-	-		
Ctrl(-)_1_CWD+PrepF					0,0009	0,0010
Ctrl(-)_2_PrepF					-	-

De forma a facilitar a análise dos resultados obtidos, foram elaborados tabelas e gráficos para comprar a quantidade de DNA obtida de cada amostra com base no *kit* de extração utilizado.

Numa primeira análise, compararam-se as amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* não purificadas com as extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, ao nível da concentração de DNA contida em cada amostra (Gráfico III.A-E). Com base na observação direta dos gráficos, para a mesma concentração, verificou-se uma diferença substancial entre a concentração de DNA obtida com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, quando comparado com *Kit Casework Direct*, em que as amostras extraídas com o primeiro apresentam valores muito elevados de DNA (ng/μl) em relação às amostras extraídas com o segundo *kit*. Este facto confirmou-se em todas as concentrações analisadas.

Tabela XVI Cálculo da percentagem de diminuição a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* em relação ao *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* para a *Human DNA* e *Male DNA*, segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de diminuição} = \frac{|\bar{X}_{\text{Amostra_CWD}} - \bar{X}_{\text{Amostra_PrepF}}|}{\bar{X}_{\text{Amostra_PrepF}}} \times 100\%$$

Percentagem de diminuição				
	Média <i>Human</i> (ng/ul)	Média <i>Male</i> (ng/ul)	<i>Human</i> (ng/μl)	<i>Male</i> (ng/μl)
AS(1ul_1:2)_CWD	0,0294	0,0826	98,18%	94,62%
AS(1ul_1:2)_PrepF	1,6160	1,5350		
NS(1ul_1:2)_CWD	0,1117	0,2449	94,25%	88,84%
NS(1ul_1:2)_PrepF	1,9415	2,1938		
AS(1ul)_CWD	0,1841	0,5404	92,42%	81,84%
AS(1ul)_PrepF	2,4297	2,9766		
NS(1ul)_CWD	0,2202	0,4275	94,72%	91,02%
NS(1ul)_PrepF	4,1703	4,7597		
AS(2ul)_CWD	0,8719	1,7640	86,11%	77,94%
AS(2ul)_PrepF	6,2778	7,9948		
NS(2ul)_CWD	0,4126	0,8357	94,16%	91,74%
NS(2ul)_PrepF	7,0629	10,1140		
AS(5ul)_CWD	0,9641	2,3408	96,03%	91,12%
AS(5ul)_PrepF	24,261	26,3737		
NS(5ul)_CWD	1,9606	3,5274	81,34%	76,81%
NS(5ul)_PrepF	10,5052	15,2104		
AS(10ul)_CWD	2,1814	5,0459	83,97%	78,28%
AS(10ul)_PrepF	13,6045	23,2343		
NS(10ul)_CWD	7,7278	10,6903	83,08%	82,93%
NS(10ul)_PrepF	45,6843	62,6094		

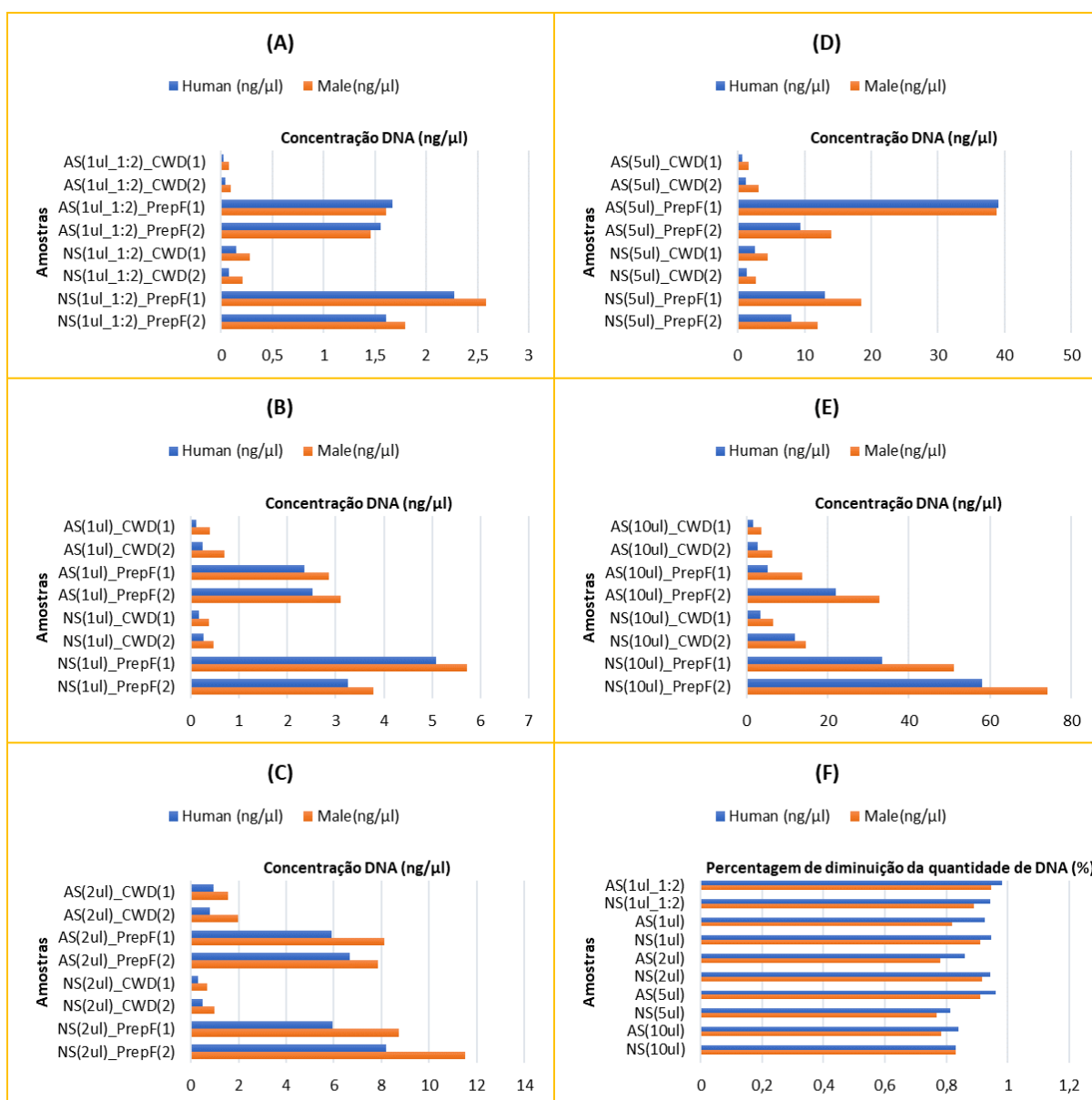


Gráfico III (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o Kit Casework Direct e com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* para 1μl de sêmen diluído 1:2, (B) 1μl, (C) 2μl, (D) 5μl e (E) 10μl de sêmen, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (F) Percentagem de diminuição da quantidade de DNA do *Kit Casework Direct* em relação ao *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XVI.

Pela análise direta da Tabela XVI e do Gráfico III.F, em relação à percentagem de diminuição da concentração de DNA das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* quando comparado ao *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, observa-se que esta foi compreendida entre o intervalo de [81,34%; 98,18%], para a *Human DNA* e [76,81%; 94,62%] para *Male DNA*, o que significa que o método de extração pelo *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* apresenta um rendimento de extração muito superior ao novo *kit*.

Para o mesmo efeito comparativo, desenharam-se gráficos de forma a comparar a quantidade de DNA das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* não purificadas com as amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* já purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System* (Gráfico IV.A-E).

Tabela XVII Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* não purificadas em relação às amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* já purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de aumento} = \frac{|\bar{X}_{\text{Amostra_CWD+PrepF}} - \bar{X}_{\text{Amostra_CWD}}|}{\bar{X}_{\text{Amostra_CWD}}} \times 100\%$$

	Percentagem de aumento			
	Média <i>Human</i> (ng/ul)	Média <i>Male</i> (ng/ul)	<i>Human</i> (ng/μl)	<i>Male</i> (ng/μl)
AS(1ul_1:2)_CWD	0,0294	0,0826	704,77%	94,43%
AS(1ul_1:2)_CWD+PrepF	0,2362	0,1605		
NS(1ul_1:2)_CWD	0,1117	0,2449	573,01%	117,91%
NS(1ul_1:2)_CWD+PrepF	0,7518	0,5337		
AS(1ul)_CWD	0,1841	0,5404	462,63%	39,80%
AS(1ul)_CWD+PrepF	1,0358	0,7555		
NS(1ul)_CWD	0,2202	0,4275	677,97%	164,23%
NS(1ul)_CWD+PrepF	1,7131	1,1296		
AS(2ul)_CWD	0,8719	1,7640	288,92%	36,62%
AS(2ul)_CWD+PrepF	3,3908	2,4099		
NS(2ul)_CWD	0,4126	0,8357	635,88%	168,85%
NS(2ul)_CWD+PrepF	3,0363	2,2468		
AS(5ul)_CWD	0,9641	2,3408	414,87%	56,51%
AS(5ul)_CWD+PrepF	4,9639	3,6636		
NS(5ul)_CWD	1,9606	3,5274	561,17%	138,49%
NS(5ul)_CWD+PrepF	12,9630	8,4125		
AS(10ul)_CWD	2,1814	5,0459	258,59%	44,09%
AS(10ul)_CWD+PrepF	7,8223	7,2704		
NS(10ul)_CWD	7,7278	10,6903	276,91%	111,78%
NS(10ul)_CWD+PrepF	29,1269	22,6404		

Constatou-se que a purificação e concentração das amostras no robô teve um aumento considerável na concentração de DNA detetada, cuja percentagem de aumento varia no intervalo de [258,59; 704,77%] para a *Human* DNA e de [36,62%; 168,85%] para *Male* DNA, visível na Tabela XVII e no Gráfico IV.F, sendo estes resultados espectáveis, uma vez que as amostras foram purificadas e concentradas num volume final de 50μl.

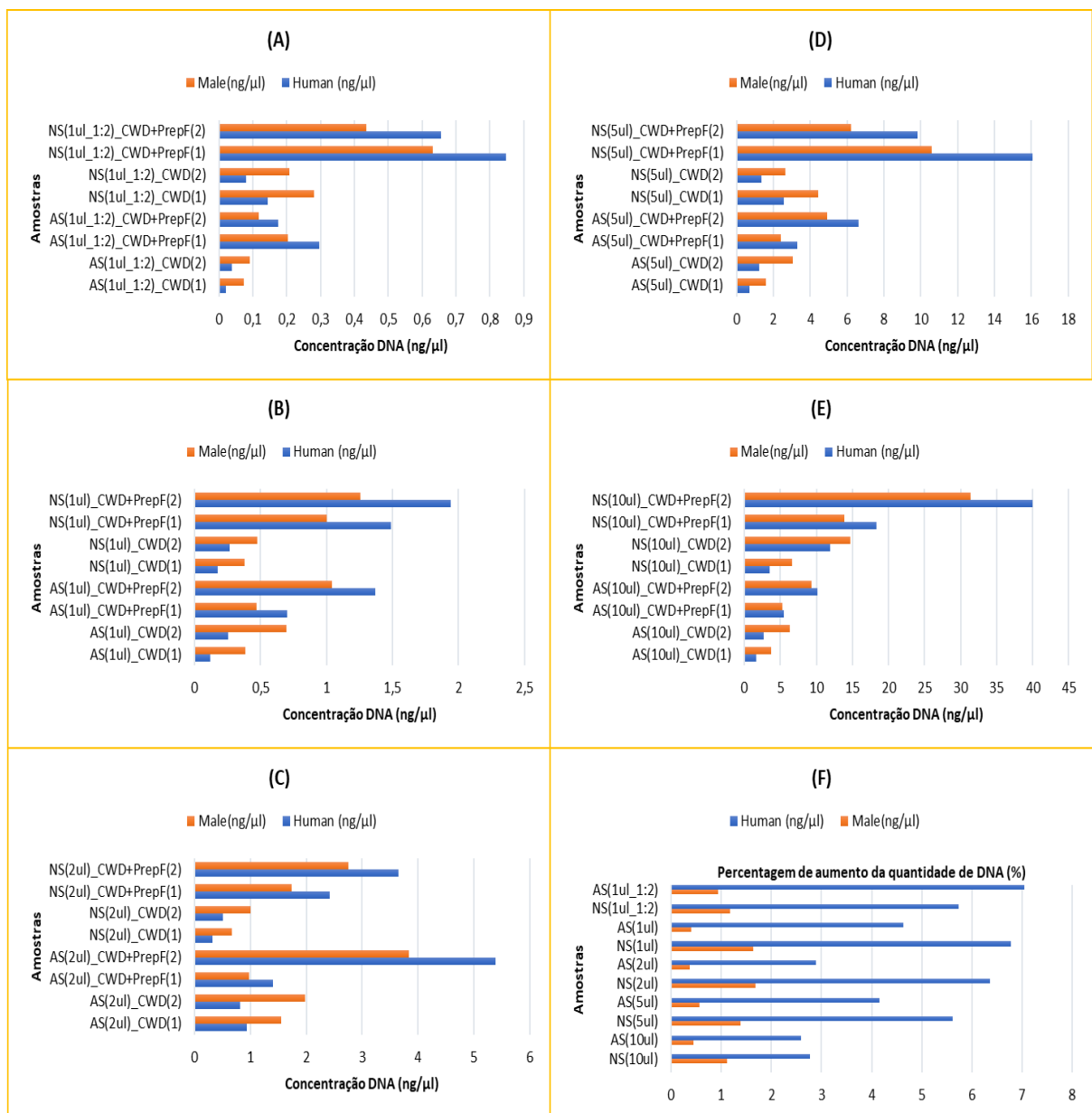


Gráfico IV (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* e com o *Kit Casework Direct* já purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, para 1μl de sêmen diluído 1:2, (B) 1μl, (C) 2μl, (D) 5μl e (E) 10μl de sêmen, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (F) Taxa de aumento da quantidade de DNA obtida através do *Kit Casework Direct* quando do uso do robô, em relação ao *Kit Casework Direct*, antes do uso do robô, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XVII.

Posteriormente comparou-se a variação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* e purificadas e concentradas no robô com as amostras extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* (Gráfico V.A-E). Através da análise dos gráficos, embora tenha havido um aumento substancial da quantidade de DNA detetada nas amostras extraídas com *Kit Casework Direct* quando purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, as amostras extraídas com o *kit* da rotina, para a mesma concentração, apresentam valores muito superiores, com a exceção da amostra NS(5µl)_PrepF, onde se observou o contrário. A percentagem de diminuição da concentração de DNA do *Kit Casework Direct* para o *kit* da rotina está compreendida no intervalo de [36,24%; 85,38%] para a *Human DNA* e de [63,84%; 89,54%] para *Male DNA*, visível na Tabela XVIII e no Gráfico V.F.

Tabela XVIII Cálculo da percentagem de diminuição a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct*, purificadas e concentradas no robô, em relação às amostras extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de diminuição} = \frac{|\bar{X}_{\text{Amostra_CWD+PrepF}} - \bar{X}_{\text{Amostra_PrepF}}|}{\bar{X}_{\text{Amostra_PrepF}}} \times 100\%$$

	Percentagem de diminuição			
	Média <i>Human</i> (ng/ul)	Média <i>Male</i> (ng/ul)	<i>Human</i> (ng/ul)	<i>Male</i> (ng/ul)
AS(1ul_1:2)_CWD+PrepF	0,2362	0,1605	85,38%	89,54%
AS(1ul_1:2)_PrepF	1,6160	1,5350		
NS(1ul_1:2)_CWD+PrepF	0,7518	0,5337	61,28%	75,67%
NS(1ul_1:2)_PrepF	1,9415	2,1938		
AS(1ul)_CWD+PrepF	1,0358	0,7555	57,37%	74,62%
AS(1ul)_PrepF	2,4297	2,9767		
NS(1ul)_CWD+PrepF	1,7131	1,1296	58,92%	76,27%
NS(1ul)_PrepF	4,1703	4,7597		
AS(2ul)_CWD+PrepF	3,3908	2,4099	45,99%	69,86%
AS(2ul)_PrepF	6,2778	7,9948		
NS(2ul)_CWD+PrepF	3,0363	2,2468	57,01%	77,79%
NS(2ul)_PrepF	7,0629	10,114		
AS(5ul)_CWD+PrepF	4,9639	3,6636	79,54%	86,11%
AS(5ul)_PrepF	24,2607	26,3737		
NS(5ul)_CWD+PrepF	12,9630	8,4125	-23,40%	44,69%
NS(5ul)_PrepF	10,5052	15,2104		
AS(10ul)_CWD+PrepF	7,8223	7,2704	42,50%	68,71%
AS(10ul)_PrepF	13,6045	23,2343		
NS(10ul)_CWD+PrepF	29,1269	22,6404	36,24%	63,84%
NS(10ul)_PrepF	45,6843	62,6094		

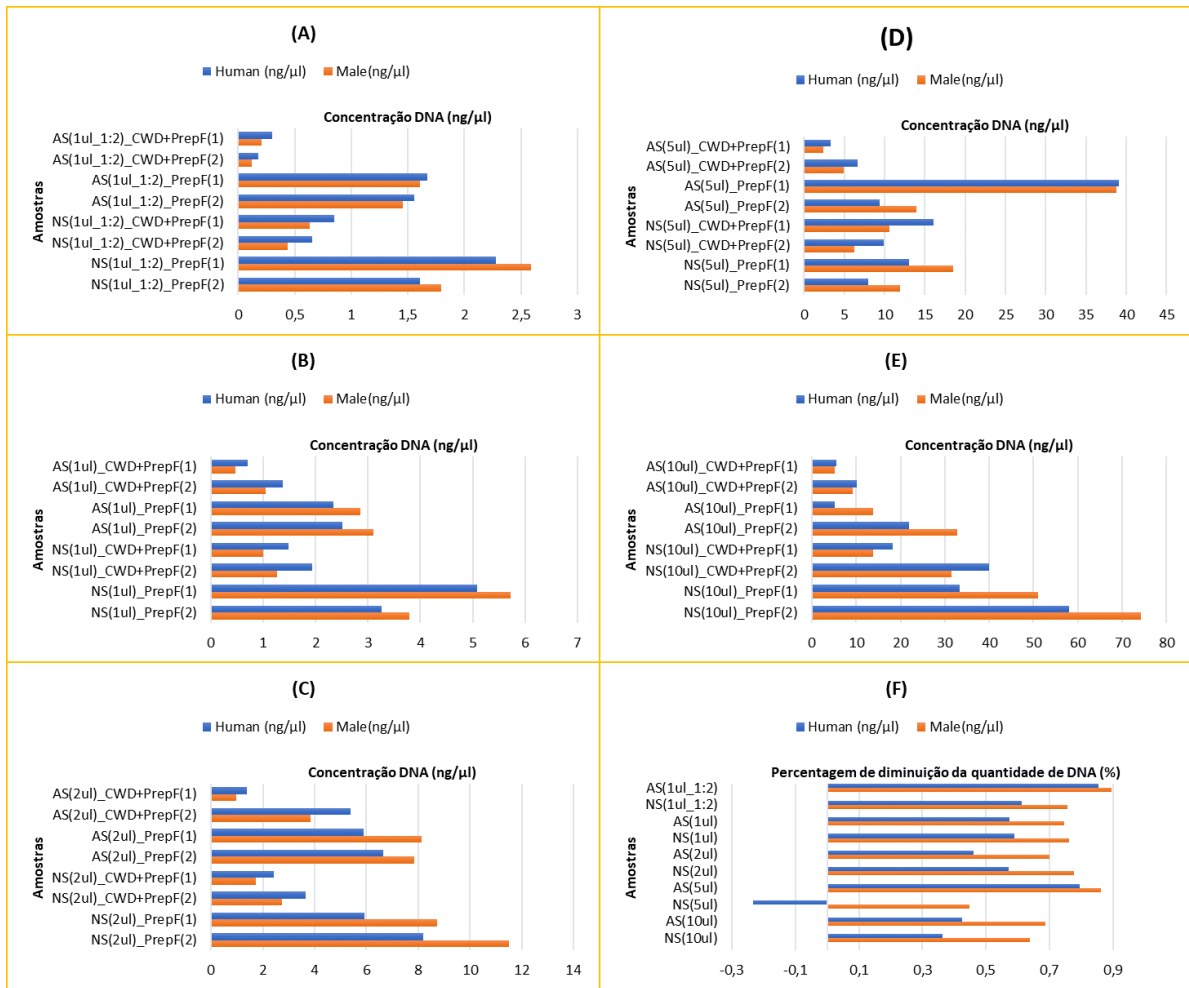


Gráfico V (A) Comparação da quantidade de DNA das amostras extraídas com o *Kit Casework Direct* já purificadas e concentradas no *Automate Express Forensic DNA Extraction System* com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* para 1µl de sêmen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sêmen, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (F) Taxa de diminuição da quantidade de DNA do *Kit Casework Direct* após purificação e concentração no robô em relação às amostras extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XVIII.

4.3 Estudo comparativo entre as zaragatoas de nylon e as zaragatoas de viscosa usando o sêmen, como fluido biológico

A análise dos resultados obtidos do estudo comparativo entre as zaragatoas de nylon e de viscosa estão representados no Gráfico VI, para as amostras extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* e no Gráfico VII, para as amostras extraídas com o *Kit Casework Direct*.

Em relação às amostras extraídas com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* (Gráfico VI), a concentração de DNA eluída das zaragatoas de nylon é consideravelmente superior à concentração de DNA obtida das zaragatoas de viscosa, para as quantidades de 1µl de sêmen diluído 1:2, 1µl, 2µl (Gráfico VI.A - C) e 10µl de sêmen (Gráfico VI.E). Este resultado varia para a quantidade de 5µl de sêmen, para a qual a zaragatoa de viscosa apresentou um melhor desempenho do que a zaragatoa de nylon.

Tabela XIX Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras extraídas da zaragatoa de nylon, em relação às zaragatoas de viscosa, utilizando o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction*, segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de aumento} = \frac{|\bar{X}_{NS_PrepF} - \bar{X}_{AS_PrepF}|}{\bar{X}_{AS_PrepF}} \times 100\%$$

	Média <i>Human</i> (ng/ul)	Média <i>Male</i> (ng/ul)	Percentagem de aumento	
			<i>Human</i> (ng/µl)	<i>Male</i> (ng/µl)
AS(1ul_1:2)_PrepF	1,616	1,5350	20,14%	42,92%
NS(1ul_1:2)_PrepF	1,9415	2,1938		
AS(1ul)_PrepF	2,4297	2,9766	71,64%	59,91%
NS(1ul)_PrepF	4,1703	4,7597		
AS(2ul)_PrepF	6,2778	7,9948	12,51%	26,51%
NS(2ul)_PrepF	7,0629	10,1140		
AS(5ul)_PrepF	24,2607	26,3737	-56,70%	-42,33%
NS(5ul)_PrepF	10,5052	15,2104		
AS(10ul)_PrepF	13,6045	23,2343	235,80%	169,47%
NS(10ul)_PrepF	45,6843	62,6094		

A percentagem de aumento da concentração de DNA da zaragatoa de nylon, em comparação à zaragatoa de viscosa inclui-se no intervalo de [12,51%; 235,80%] para a *Human* DNA e de [26,51%; 169,47%] para *Male* DNA, visível na Tabela XIX e no Gráfico VI.F. Estes resultados verificam-se para todas as concentrações, exceto para a quantidade de 5µl de sêmen.

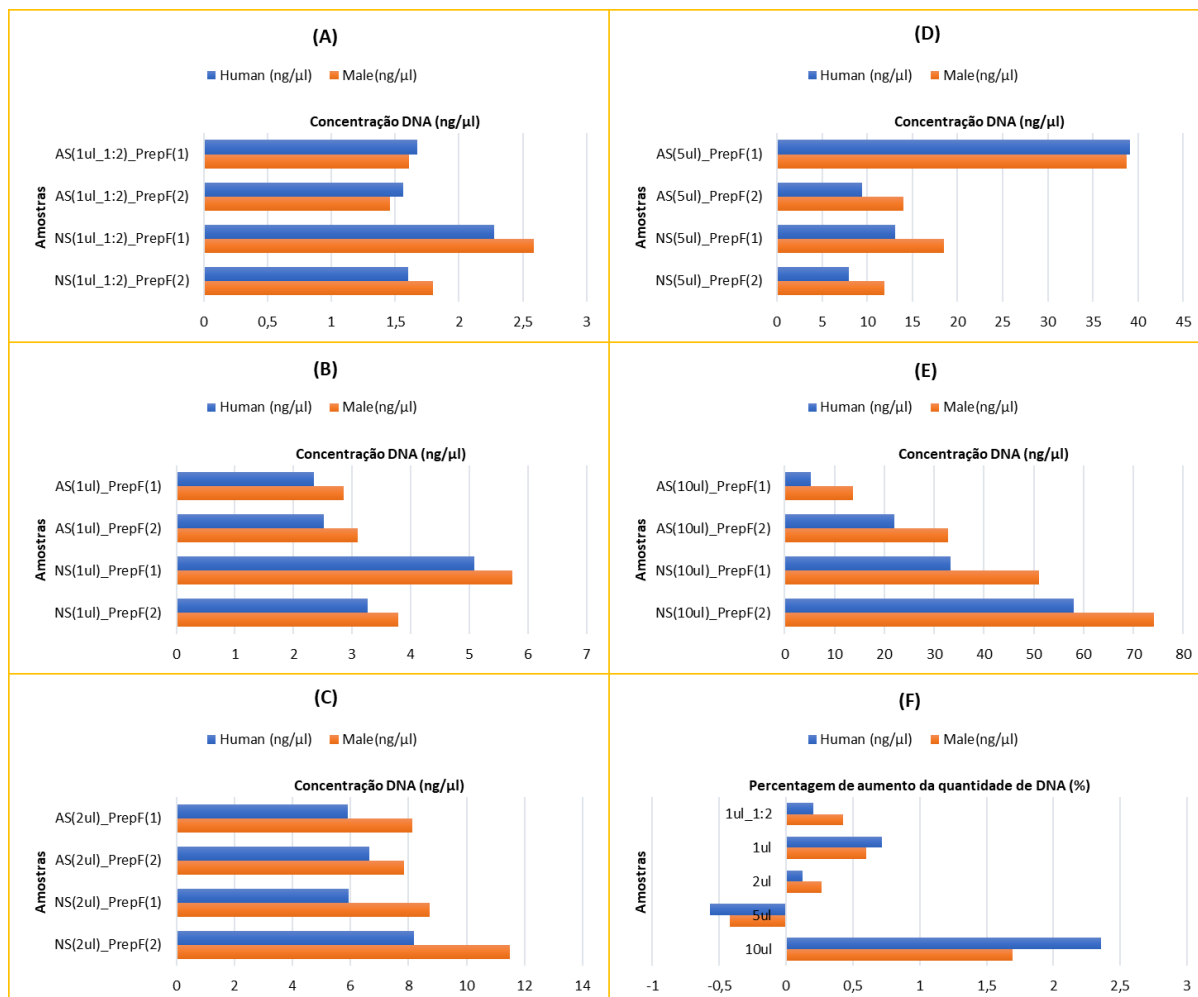


Gráfico VI Comparação da quantidade de DNA extraídas das zaragatoas de nylon e de viscosa com o *Kit PrepFiler Forensic DNA Extraction* para 1µl de sêmen diluído 1:2, (B) 1µl, (C) 2µl, (D) 5µl e (E) 10µl de sêmen, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (F) Taxa de aumento da quantidade de DNA obtida com a zaragatoa de nylon em relação à zaragatoa de viscosa, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XIX.

Analogamente, no Gráfico VII verifica-se, em geral, uma maior concentração de DNA obtida na extração com o *Kit Casework Direct*, para cada concentração, para a zaragatoa de nylon (Gráfico VII.A;D;E), com a exceção das quantidades de 1µl e 2µl de sêmen (Gráfico VII.B;C), onde foi eluída uma maior quantidade de DNA na zaragatoa de viscosa.

Já no que respeita à percentagem de aumento da concentração de DNA da zaragatoa de nylon em relação à zaragatoa de viscosa, esta está compreendida no intervalo de [103,36%; 280,58%] para a *Human* DNA e de [50,69%; 196,67%] para *Male* DNA, visível na Tabela XX e no Gráfico VII.F. Contudo, para as quantidades de 1µl e 2µl de sêmen, tal não se verifica, ou seja, zaragatoa de viscosa eluiu uma maior concentração de DNA do que a zaragatoa de viscosa.

Tabela XX Cálculo da percentagem de aumento a partir das médias (\bar{X}) dos valores de quantificação das amostras extraídas da zaragatoa de nylon, em relação às zaragatoas de viscosa, utilizando o *Kit Casework Direct*, segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem de aumento} = \frac{|\bar{X}_{NS_CWD} - \bar{X}_{AS_CWD}|}{\bar{X}_{AS_CWD}} \times 100\%$$

	Percentagem de aumento			
	Média <i>Human</i> (ng/ul)	Média <i>Male</i> (ng/ul)	<i>Human</i> (ng/µl)	<i>Male</i> (ng/µl)
AS(1ul_1:2)_CWD	0,0294	0,0826	280,58%	196,67%
NS(1ul_1:2)_CWD	0,1117	0,2449		
AS(1ul)_CWD	0,1841	0,5404	19,61%	-20,89%
NS(1ul)_CWD	0,2202	0,4275		
AS(2ul)_CWD	0,87185	1,7640	-52,68%	-52,62%
NS(2ul)_CWD	0,4126	0,8357		
AS(5ul)_CWD	0,9641	2,3408	103,36%	50,69%
NS(5ul)_CWD	1,9606	3,5274		
AS(10ul)_CWD	2,1814	5,0459	254,26%	111,86%
NS(10ul)_CWD	7,7278	10,6903		

Devido à reduzida amostragem, estes resultados não podem ser analisados quanto à sua relevância estatística, porém, pode-se considerar que, na maioria das amostras, a zaragatoa de nylon possibilita uma maior eluição do material biológico para a solução, o que se reflete em valores superiores de concentração de DNA, quando comparada com a zaragatoa de viscosa, em ambas as extrações realizadas com os 2 kits.

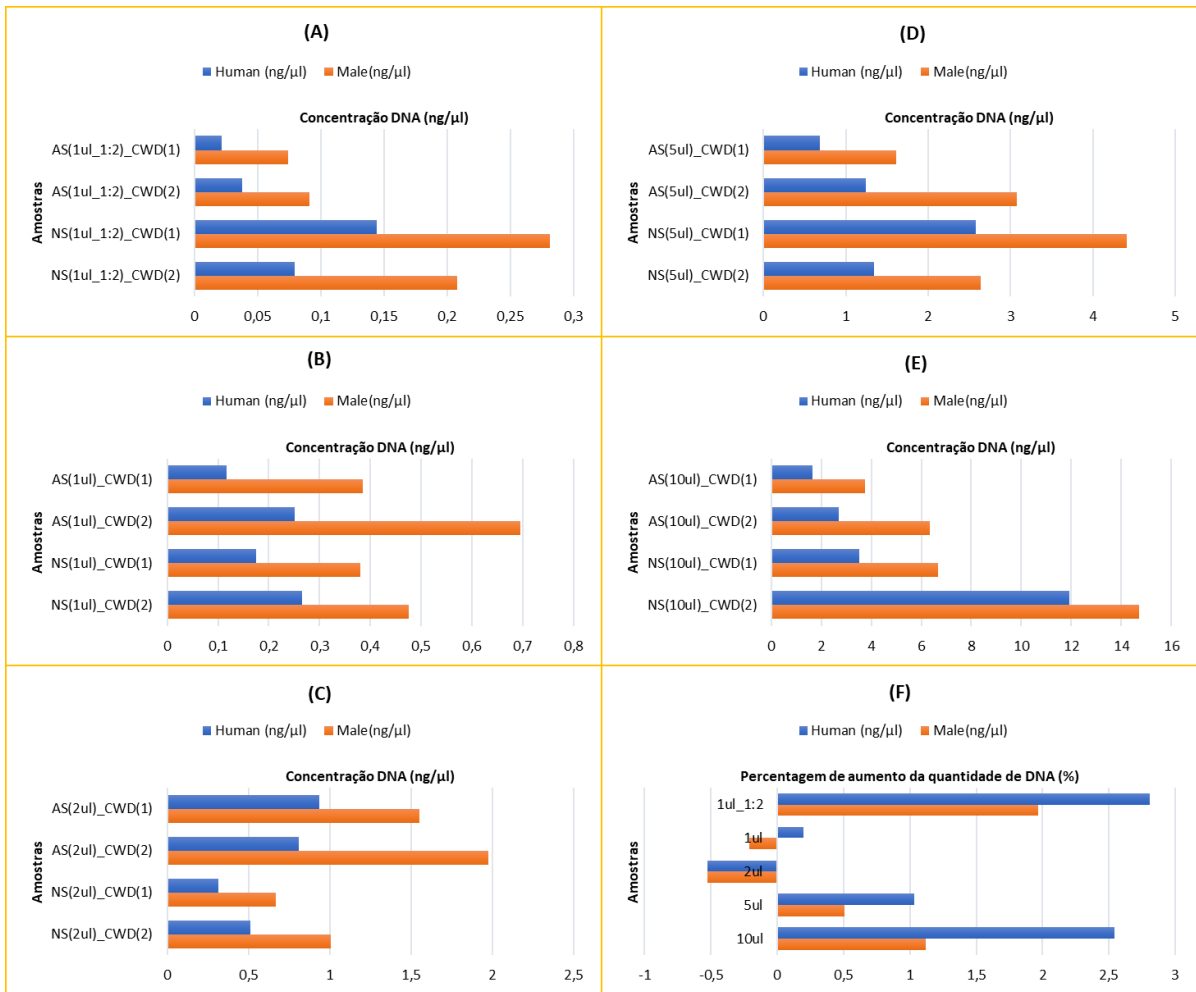


Gráfico VII (A) Comparação da quantidade de DNA extraídas das zaragoas de nylon e de viscose com o *Kit Casework Direct* para 1μl de sêmen diluído 1:2, (B) 1μl, (C) 2μl, (D) 5μl e (E) 10μl de sêmen, usando o *Kit Quantifiler Trio DNA Quantification*. (F) Taxa de aumento da quantidade de DNA obtida com a zaragoa de nylon em relação à zaragoa de viscose, calculada a partir da fórmula expressa na Tabela XX.

4.4 Estudo da compatibilidade entre o *Kit Casework Direct* e o *kit de amplificação PowerPlex Fusion 6C System*

Das 10 amostras amplificadas através do *Kit Powerplex Fusion 6C System*, foram obtidos perfis genéticos completos para todas as amostras (Figura 28, Anexos). Com base nestes resultados pode-se afirmar que existe compatibilidade do *Kit Casework Direct* com o *kit de amplificação Powerplex Fusion 6C System* e com a metodologia de separação dos fragmentos amplificados no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer (AB)* implementado na rotina do laboratório.

5 Conclusões

1. O produto extraído à temperatura de incubação de 24°C, com o *Kit Casework Direct* demonstrou ser compatível com o Teste de Orientação *SERATEC PSA Semiquant* quando aplicado diretamente na cassete. À temperatura de incubação de 70°C, recomendada no protocolo da PROMEGA, detecção da PSA tornou-se inviável. (Figura 27)
2. No processo de extração, a centrifugação a 9000rpm, durante 3 minutos, demonstrou ser insuficiente para que a solução de *Casework Direct* descesse da coluna para o tubo. (Figura 27)
3. O percurso na cassete de SERATEC da mistura do *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen mostrou-se mais fluido e regular, com bandas de teste mais nítidas, quando comparada com o percurso da solução contendo apenas *Casework Direct Reagent*.
4. A mistura de *Casework Direct Reagent*, água destilada e sémen apresentou testes preliminares exequíveis e viáveis até duas semanas de armazenamento.
5. O teste de confirmação ao microscópio usando a Técnica de Coloração *Christmas Tree* é compatível com o *Kit Casework Direct*, uma vez que foram visualizadas cabeças de espermatozoides nas amostras de sémen.
6. Para a realização dos testes preliminares, estes não devem ser realizados no tubo contendo amostra de sémen eluída na solução de extração, devido a perdas consideráveis de material genético. Estes testes devem ser realizados num tubo em separado contendo 120µl da solução.
7. O *Kit Casework Direct* é compatível com a química do *kit* de quantificação *Quantifiler Trio DNA Quantification* (Figura 27).^{11,84,13} A introdução de água destilada otimizou o processo de extração, aumentando o rendimento da extração. Além disso, permitiu obter DNA em ótima quantidade e qualidade, para além de diluir os inibidores da reação de PCR.
8. A extração diferencial utilizando o *Kit I-sep*, da *Biotype*, partindo-se de 50µl do lisado obtido com o *Kit Casework Direct*, não foi viável ao nível da separação eficaz das frações espermática e epitelial das amostras, uma vez que a quantidade de DNA detetada em cada amostra foi extremamente inferior quando comparada com as amostras extraídas diretamente da zaragatoa de nylon (Figura 27).
9. O *Kit Prepfilier Forensic DNA Extraction* apresentou um rendimento de extração muito superior ao *kit Casework Direct*, mesmo após a purificação e concentração das amostras no *Automate Express Forensic DNA Extraction System*, onde se obteve uma concentração de DNA superior às amostras extraídas apenas com o *kit*. O novo *kit* de

extração não é recomendado para amostras que apresentem uma limitada quantidade de DNA.

10. O *Kit Casework Direct* demonstrou ser compatível e viável na obtenção de perfis genéticos completos com o uso do *Kit Powerplex Fusion 6C System* (Figura 27)^{11,84,13} para a amplificação das amostras e com a metodologia de separação dos fragmentos amplificados no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer (AB)*.
11. Em geral, a zaragatoa de nylon apresenta uma eluição e desempenho superior do material biológico para a solução em comparação com a zaragatoa de viscose. Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Daley (2006)⁷¹; Benschop (2010)⁶⁶ e Zasada (2020)⁷⁶. Contudo, a zaragatoa de viscose apresenta uma maior adaptabilidade e flexibilidade à metodologia implementada nos casos de agressão sexual, no SGBF-C, do que a zaragatoa de nylon.

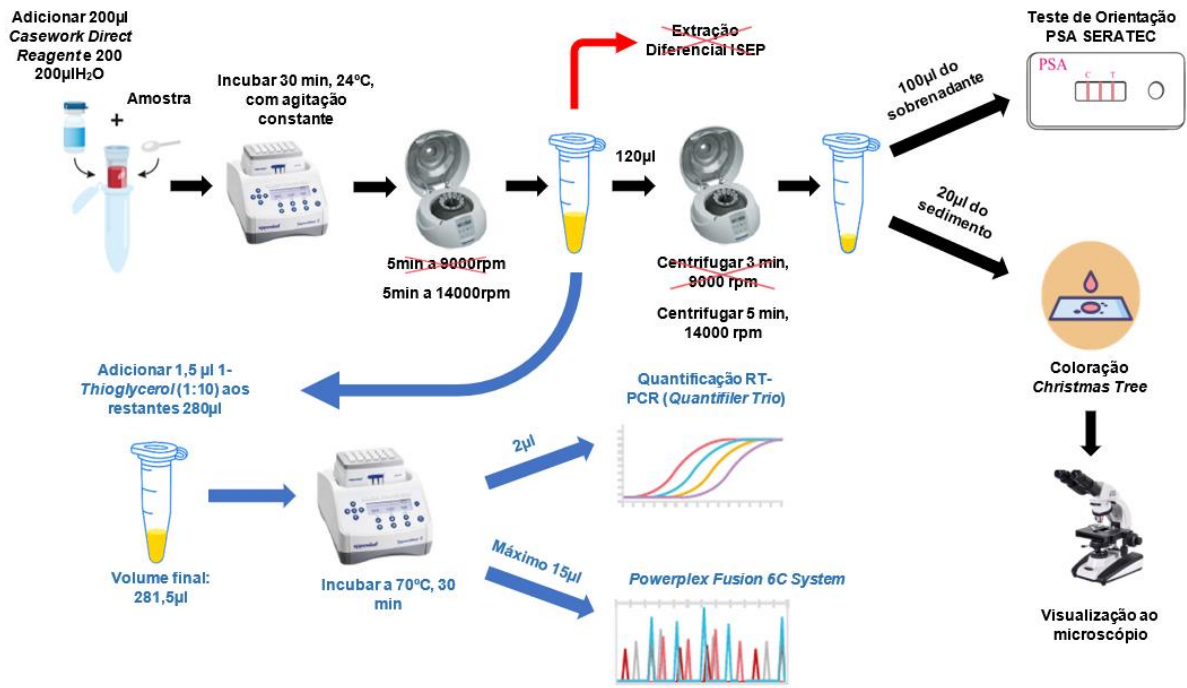


Figura 27 Esquemática da tentativa de implementação do *Kit Casework Direct*, na rotina laboratorial.

6 Considerações Finais

A incompatibilidade do *kit* de extração *Casework Direct* e o *kit* de extração diferencial *I-sep*, dificulta a implementação do *kit* na rotina laboratorial. Por conseguinte, são necessários estudos adicionais de forma a alterar o protocolo, tornando possível a junção das duas metodologias.

Para a aplicação da Técnica de Coloração *Christmas Tree* recomenda-se que sejam estudados os parâmetros da velocidade e do tempo ótimo de centrifugação em sémen fresco, que devam ser aplicados especificamente para o uso do *kit Casework Direct* na rotina laboratorial, tendo em conta que o ideal seria observar espermatozoides inteiros ao microscópio.

O *kit Casework Direct* pode ser implementado na rotina aquando da extração de amostras problema com bastante quantidade de DNA e de amostras de referência, com a vantagem de ser um protocolo simples e reduzir o tempo de extração. Não é recomendado para amostras problema com reduzida quantidade de DNA.

Em geral, a zaragatoa de nylon apresenta um desempenho superior à zaragatoa de viscosa, pois permite uma maior eluição do material biológico para a solução. Adicionalmente, reduz a manipulação da amostra (menor poder de contaminação) e a da perda de DNA, pelo facto de existir uma única extração, de toda a amostra biológica, para uma mesma solução. Contudo, o conceito de subamostragem, em que a zaragatoa pode ser cortada para diferentes tubos, não pode ser aplicado a este tipo de zaragatoa. Por conseguinte, quando englobados outros *kits* para o processamento da amostra, com o objetivo de obter o perfil STR do indivíduo, realizar a extração diferencial e os testes preliminares, no caso das agressões sexuais, pode acarretar problemas de incompatibilidades, como foi o caso do *kit* de extração diferencial *I-sep*, da *Biotype*.

No SGBF-C, são realizados 3 cortes da zaragatoa de viscosa, para 3 tubos diferentes, com o intuito de proceder com a determinação do perfil do perpetuador, a realização dos testes preliminares e a realização da extração diferencial. Neste caso, embora esta metodologia evite os problemas de compatibilidade entre as químicas dos reagentes presentes em cada *kit*, pode existir perda de material genético durante este processo.

7 Bibliografia

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature* [Internet]. 1985;316(6023):76–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/316076a0>
2. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Genetic fingerprinting. *Nature Medicine*. *Nat Med* [Internet]. 2005;11(10):1035–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16211029/>
3. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *An Introduction to Forensic Genetics*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2011. 214 p.
4. Watson JD, Crick FH. A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953. *Nature* [Internet]. 2003 [cited 2020 Nov 7];421(6921):397–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12569935/>
5. Butler JM. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2009. 520 p.
6. Jeffreys A, Brookfield J, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. 1985;317(6040):818–9.
7. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2011. 704 p.
8. Butler JM. *Forensic DNA Typing*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005. 688 p.
9. Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, Calandro LM, Furtado MR, Shewale JG. Developmental Validation of the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit for Extraction of Genomic DNA from Biological Samples. *J Forensic Sci*. 2009;54(3):599–607.
10. Frégeau CJ, De Moors A. Competition for DNA binding sites using Promega DNA IQ™ paramagnetic beads. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2012;6(5):511–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22264505/>
11. Graham EK, Loten M, Thompson JM, Drobac J, Gopalakrishnan A. Developmental Validation of the Casework Direct Kit, Custom: A Method for the Rapid Processing of Casework Samples. Promega Corporation; 2020. p. 16.
12. Promega Corporation. Rapid processing of swabs from casework samples using casework direct kit, Custom. 2019. p. 6.
13. Bourdeau JM, McLaren RS, Stabile M, Staiti N, Cirillo SE, Lago G, et al. Normalization and Direct Amplification of Casework Samples. 2016.
14. Promega Corporation. Casework Direct Kit, Custom: Rapidly Process Challenging Sample Types [Internet]. 2017. p. 8. Available from: <https://www.promega.de/products/genetic-identity/genetic-identity->

workflow/preprocessing-and-differential-extraction/casework-direct-kit/?catNum=AX4560

15. Kharlamov S, Molecular F, State F, Kit Q. New approach to DNA isolation from casework samples in real forensic cases. Russia; 2017.
16. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints.' *Nature*. 1985;318(6046):577–9.
17. Biotype. Sampletype i-sep ® DL DNA separation. p. 2.
18. Horsman KM, Hickey JA, Cotton RW, Landers JP, Maddox LO. Development of a human-specific real-time PCR assay for the simultaneous quantitation of total genomic and male DNA. *J Forensic Sci*. 2006;51(4):758–65.
19. Swango KL, Hudlow WR, Timken MD, Buoncristiani MR. Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int*. 2007;170(1):35–45.
20. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *Int J Biomed Res*. 2011;2(1):81–97.
21. Kilpatrick DG, Edmunds C. Rape In America: A report to the nation [Internet]. National Victim Center. Washington, DC: Charleston, SC Med. Univ. South Carolina; 1992. p. 20. Available from: <https://victimsofcrime.org/docs/Reports and Studies/rape-in-america.pdf?sfvrsn=0>
22. Linden J. Sexual assault. *Emerg Med Clin North Am*. 1999;17(3):685-97.vii.
23. ACOG Committee Opinion No. 777: Sexual Assault. *Obs Gynecol*. 2019;133((4)):e296–302.
24. Breiding MJ, Smith SG, Basile KC, Walters ML, Chen J, Merrick MT. Prevalence and characteristics of sexual violence, stalking, and intimate partner violence victimization - national intimate partner and sexual violence survey, united states, 2011. *MMWR Surveill Summ* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 7];63(8):1–18. Available from: <http://www.ajph.org>
25. Violence against women : An EU-wide survey. European Union Agency for Fundamental Rights. Luxembourg: Office of the European Union; 2014. p. 200.
26. Lievore D. Non-reporting and hidden recording of sexual assault: an international literature review. Australia; 2003.
27. Gomes V, Jardim P, Taveira F, Dinis-Oliveira RJ, Magalhães T. Alleged Biological Father Incest: A Forensic Approach. *J Forensic Sci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2020 Nov 7];59(1):255–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24180349/>
28. Kolopp M, Delbaere-Crespo E, Lecossec C, Guillet-May F, Coudane H, Martrille L. Examen médico-légal des victimes d'agression sexuelle : caractéristiques et liens avec les suites judiciaires. *Gynecol Obstet Fertil Senol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Nov

- 7];45(3):158–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28682757/>
29. Suttipasit P. Genitoanal Injury in Sexually Assaulted Adult Women: Six-Year Retrospective in Bangkok. *Am J Forensic Med Pathol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Nov 7];39(4):312–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30198915/>
 30. Cole J, Logan TK. Interprofessional collaboration on sexual assault response teams (SART): The role of victim alcohol use and a partner-perpetrator. *J Interpers Violence* [Internet]. 2010 Feb [cited 2020 Nov 7];25(2):336–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19498101/>
 31. Greeson MR, Campbell R. Coordinated Community Efforts to Respond to Sexual Assault: A National Study of Sexual Assault Response Team Implementation. *J Interpers Violence* [Internet]. 2015 Sep 7 [cited 2020 Nov 7];30(14):2470–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25315485/>
 32. Magalhães T, Dinis-Oliveira RJ, Silva B, Corte-Real F, Nuno Vieira D. Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. *Sci World J* [Internet]. 2015;2015:11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637504/pdf/TSWJ2015-365674.pdf>
 33. Muldoon KA, Drumm A, Leach T, Heimerl M, Sampsel K. Achieving just outcomes: Forensic evidence collection in emergency department sexual assault cases. *Emerg Med J*. 2018;35(12):746–52.
 34. Vrees RA. Evaluation and Management of Female Victims of Sexual Assault. *Obs Gynecol Surv*. 2017;72(1):39–53.
 35. Newton M. The forensic aspects of sexual violence. *Best Pr Res Clin Obs Gynaecol*. 2013;27(1):77–90.
 36. Benecke MF. Forensic DNA Samples —Collection and Handling. in *Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics*. In: *Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 500–504.
 37. Burg A, Kahn R, Welch K. DNA testing of sexual assault evidence: The laboratory perspective. *J Forensic Nurs*. 2011;7(3):145–52.
 38. Ingemann-Hansen O, Charles AV. Forensic medical examination of adolescent and adult victims of sexual violence [Internet]. Vol. 27, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Bailliere Tindall Ltd; 2013 [cited 2020 Nov 7]. p. 91–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23036587/>
 39. Peterson JL, Hickman MJ, Strom KJ, Johnson DJ. Effect of Forensic Evidence on Criminal Justice Case Processing. *J Forensic Sci*. 2013;58(Suppl 1):5788–90.
 40. Allard JE et al. A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Sci Justice*. 2007;47(4):160–7.
 41. van Oorschot RA, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: A review. *Investig*

- Genet. 2010;1(1):14.
42. Peterson J, Sommers I, Baskin D, Johnson D. The Role and Impact of Forensic Evidence in the Criminal Justice Process. Los Angeles; 2013.
 43. Johnson D, Peterson J, Sommers I, Baskin D. Use of Forensic Science in Investigating Crimes of Sexual Violence: Contrasting Its Theoretical Potential With Empirical Realities. *Violence Against Women*. 2012;18(2):193–222.
 44. van Oorschot RAH, Szkuta B, Meakin GE, Kokshoorn B, Goray M. DNA transfer in forensic science: A review. *Forensic Sci Int Genet*. 2019;38:140–66.
 45. Lee HC, Ladd C. Preservation and collection of biological evidence. *Croat Med J*. 2001;42(3):255–8.
 46. Spohn C, Holleran D. Prosecuting sexual assault: A comparison of charging decisions in sexual assault cases involving strangers, acquaintances, and intimate partners. *Justice Q* [Internet]. 2001 [cited 2020 Nov 7];18(3):651–88. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07418820100095051>
 47. Cross TP, Alderden M, Wagner A, Sampson L, Peters B, Spencer M, et al. Forensic Evidence and Criminal Justice Outcomes in a Statewide Sample of Sexual Assault Cases [Internet]. United States of America; 2014. Available from: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/248254.pdf>
 48. Khaldi N, Miras A, Botti K, Benali L, Gromb S. Evaluation of Three Rapid Detection Methods for the Forensic Identification of Seminal Fluid in Rape Cases. *J Forensic Sci*. 2004;49(4):1–5.
 49. Magalhães T, Vieira DN. Abuso e negligência - Agressões sexuais: intervenção pericial integrada. *Abuso & ne. Sociedade Portuguesa para o Estudo da Criança Abusada e Negligenciada*, editor. Porto; 2013. 317 p.
 50. Joki-Erkkilä M, Tuomisto S, Seppänen M, Huhtala H, Ahola A, Rainio J, et al. Clinical forensic sample collection techniques following consensual intercourse in volunteers - cervical canal brush compared to conventional swabs. *J Forensic Leg Med*. 2014;27:50–4.
 51. Girardet R, Bolton K, Lahoti S, Mowbray H, Giardino A, Isaac R, et al. Collection of forensic evidence from pediatric victims of sexual assault. *Pediatrics*. 2011;128(2):233–8.
 52. Willott GM, Allard JE. Spermatozoa - their persistence after sexual intercourse. *Forensic Sci Int*. 1982;19(2):135–54.
 53. Dahlke MB, Cooke C, Cunnane M, Chawla J, Lau P. Identification of semen in 500 patients seen because of rape. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1977 [cited 2020 Nov 7];68(6):740–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/602911/>
 54. Giardino AP, Alexander R. *Child maltreatment: a clinical guide and reference*. 3rd ed.

- St. Louis: G.W. Medical Publishing; 2005.
55. Jenny C. *Child Abuse and Neglect: Diagnosis, Treatment, and Evidence*. Saunders, editor. Elsevier Inc.; 2010. 688 p.
 56. Kellogg N. The evaluation of sexual abuse in children. *Pediatrics*. 2005;116(2):506–12.
 57. Adams JA, Harper K, Knudson S, Revilla J. Examination findings in legally confirmed child sexual abuse: It's normal to be normal. *Pediatrics*. 1994;94(3):310–7.
 58. Magalhães T et al. Sexual abuse of children. A comparative study of intra and extra-familial cases. *J Forensic Leg Med*. 2009;16(8):455–9.
 59. Gingras F, Paquet C, Bazinet M, Granger D, Marcoux-Legault K, Fiorillo M, et al. Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2009;2(1):138–40.
 60. Palusci VJ, Cox EO, Shatz EM, Schultze JM. Urgent medical assessment after child sexual abuse. *Child Abus Negl*. 2006;30(4):367–80.
 61. Christian C, Lavelle J, De Jong A, Loiselle J, Brenner L, Joffe M. Forensic evidence findings in prepubertal victims of sexual assault. *Pediatrics*. 2000;106((1 Pt 1)):100–4.
 62. Young KL, Jones JG, Worthington T, Simpson P, Casey PH. Forensic laboratory evidence in sexually abused children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006;160(6):585–8.
 63. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*. 2006;12(1):23–37.
 64. Mollen CJ, Goyal MK, Frioux SM. Acute sexual assault: A review. *Pediatric Emergency Care*. *Pediatr Emerg Care*. 2012;28(6):584–90.
 65. Yokota M et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test for forensic examination of semen. *Leg Med*. 2001;3(3):171–6.
 66. Benschop CCG, Wiebosch DC, Kloosterman A, Sijen T. Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic Sci Int Genet*. 2010;4(2):115–21.
 67. Bruijns BB, Tiggelaar RM, Gardeniers H. The Extraction and Recovery Efficiency of Pure DNA for Different Types of Swabs. *J Forensic Sci*. 2018;63(5):1492–9.
 68. Comte J et al. Touch DNA collection – Performance of four different swabs. *Forensic Sci Int Genet*. 2019;43:102113.
 69. Verdon TJ, Mitchell RJ, van Oorschot RAH. Swabs as DNA collection devices for sampling different biological materials from different substrates. *J Forensic Sci*. 2014;59(4):1080–9.
 70. Dalmaso G, Bini M, Paroni R, Ferrari M. Qualification of high-recovery, flocked swabs as compared to traditional rayon swabs for microbiological environmental monitoring of surfaces. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2008;62(3):191–9.

71. Daley P, Castriciano S, Chernesky M, Smieja M. Comparison of flocked and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2265–7.
72. Zain, Z. M. & Bradbury JM. The influence of type of swab and laboratory method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in broth medium. *Avian Pathol.* 1995;24(4):707–16.
73. Rose L, Jensen B, Peterson A, Banerjee SN, Arduino MJ. Swab materials and *Bacillus anthracis* spore recovery from nonporous surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(6):1023–9.
74. Brownlow RJ, Dagnall KE, Ames CE. A Comparison of DNA Collection and Retrieval from Two Swab Types (Cotton and Nylon Flocked Swab) when Processed Using Three QIAGEN Extraction Methods. *J Forensic Sci.* 2012;57(3):713–7.
75. Hedin G, Rynbäck J, Loré B. New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs. *J Hosp Infect.* 2010;75(4):314–7.
76. Zasada AA, Zacharczuk K, Woźnica K, Główka M, Ziółkowski R, Malinowska E. The influence of a swab type on the results of point-of-care tests. *AMB Express* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2020 Nov 7];10(1):46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32166638/>
77. Dadhania A, Nelson M, Caves G, Santiago R, Podini D. Evaluation of Copan 4N6FLOQSwabs™ used for crime scene evidence collection. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2013;43:102–13.
78. Sherier AJ et al. Copan microFLOQ® Direct Swab collection of bloodstains, saliva, and semen on cotton cloth. 2020;134(1):45–54.
79. Warnke P, Warning L, Podbielski A. Some are more equal - A comparative study on swab uptake and release of bacterial suspensions. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 10 [cited 2020 Nov 7];9(7):e102215. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25010422/>
80. Promega Corporation. Casework Direct System Technical Manual TMD067 [Internet]. 2020. p. 12. Available from: file:///C:/Users/pauli/Downloads/Casework Direct System TMD067.pdf
81. Applied Biosystems. PrepFiler® and PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kits. User Man [Internet]. 2012;2012 Rev.B(4468126):8. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_099065.pdf
82. SERATEC. SERATEC PSA Semiquant [Internet]. Germany; 2019. p. 2. Available from: https://www.seratec.com/docs/user_instructions/2019/IFU_PSA_EN_2019-06.pdf
83. Applied Biosystems. Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits:User Guide [Internet]. ThermoFischer Scientific; 2018. p. 118. Available from:

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>

84. Sherier AJ, Kieser RE, Novroski NMM, Wendt FR, King JL, Woerner AE, et al. Copan microFLOQ® Direct Swab collection of bloodstains, saliva, and semen on cotton cloth. *Int J Legal Med* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 Nov 8];134(1):45–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31165261/>

8 Anexos

Tabela XXI Descrição das amostras preparadas para a Experiência 1 “Testar a compatibilidade do *Kit Casework Direct* com o teste de orientação SERATEC PSA *Semiquant*, Técnica *Christmas Tree* e com o *Kit Quantifiler Trio*”. Estas amostras foram primeiramente eluídas com o *Kit Casework Direct*, sem *thioglycerol*

Amostra	Tipo Zaragatoa	Quantidade Sémen	Kit Extração		Amostra extraída
Z1	Nylon	1µl	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z1'
Z2	Nylon	1µl	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z2'
Z3	Nylon	1µl	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z3'
Z4	Nylon	1µl	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z4'
Z5	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z5'
Z6	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z6'
Z7	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z7'
Z8	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD s/ Thioglycerol	CWD c/ Thioglycerol	Z8'

Tabela XXII Descrição das amostras preparadas para a Experiência 2 “Influência da temperatura de incubação na realização do Teste de Orientação SERATEC PSA *Semiquant*”.

Amostra	Quantidade Sémen	Solução de extração	Temp de incubação
T1CWD + Sémen	1µl	400µl CWD	70 °C
T2CWD + Sémen	1µl	400µl CWD	70 °C
T1H2O+SÉMEN	1µl	400µl H2O	70 °C
T2H2O+SÉMEN	1µl	400µl H2O	70 °C
T1CWD+H2O+SÉMEN	1µl	200µl CWD + 200µl H2O	70 °C
T2CWD+H2O+SÉMEN	1µl	200µl CWD + 200µl H2O	70 °C
1CWD+SÉMEN	1µl	400µl CWD	24 °C
2CWD+SÉMEN	1µl	400µl CWD	24 °C
1CWD+H2O+SÉMEN	1µl	200µl CWD + 200µl H2O	24 °C
2CWD+H2O+SÉMEN	1µl	200µl CWD + 200µl H2O	24 °C

Tabela XXIII Descrição das amostras preparadas para a Experiência 3 “Testar o protocolo modificado de extração usando o *Kit Casework Direct*, por comparação ao protocolo recomendado pela PROMEGA”.

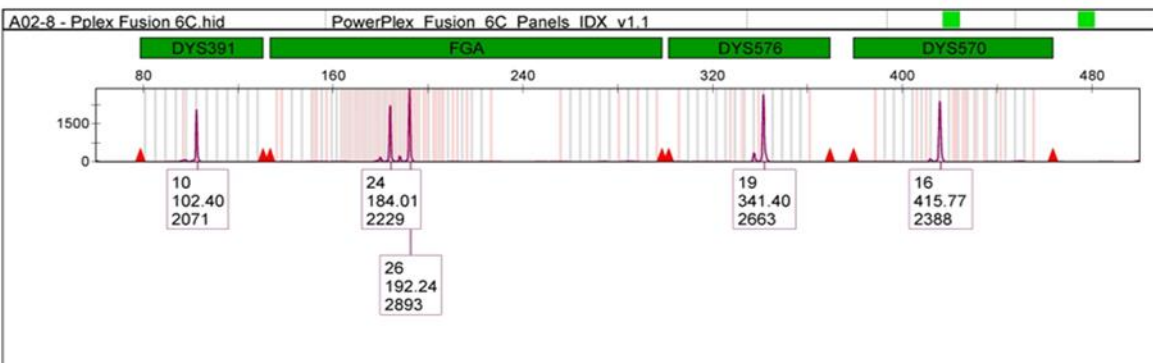
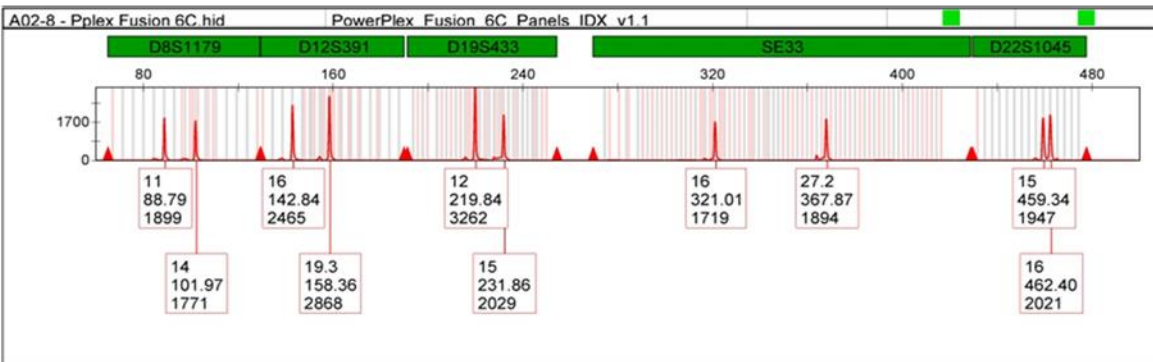
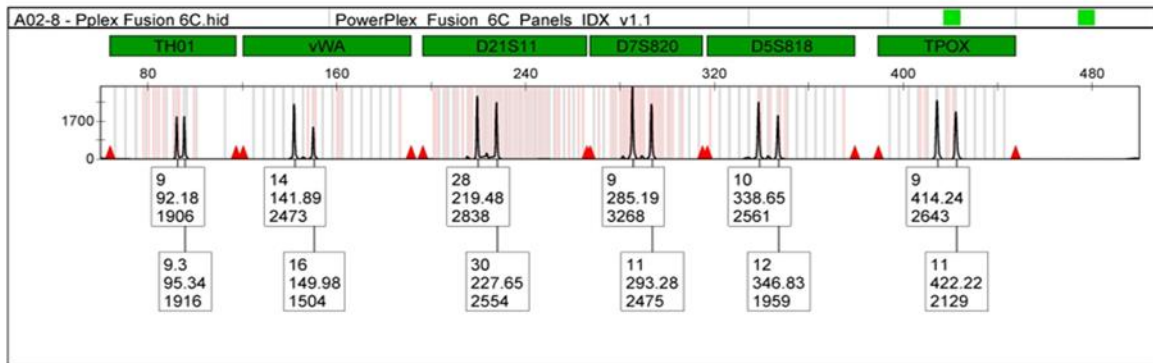
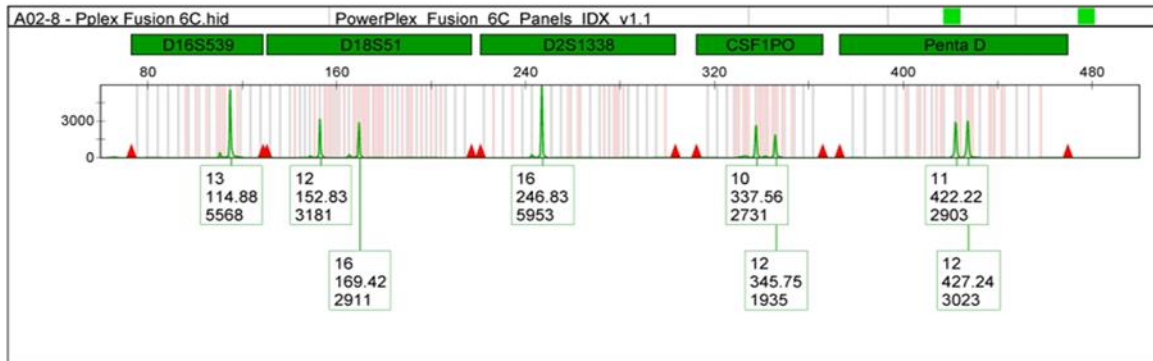
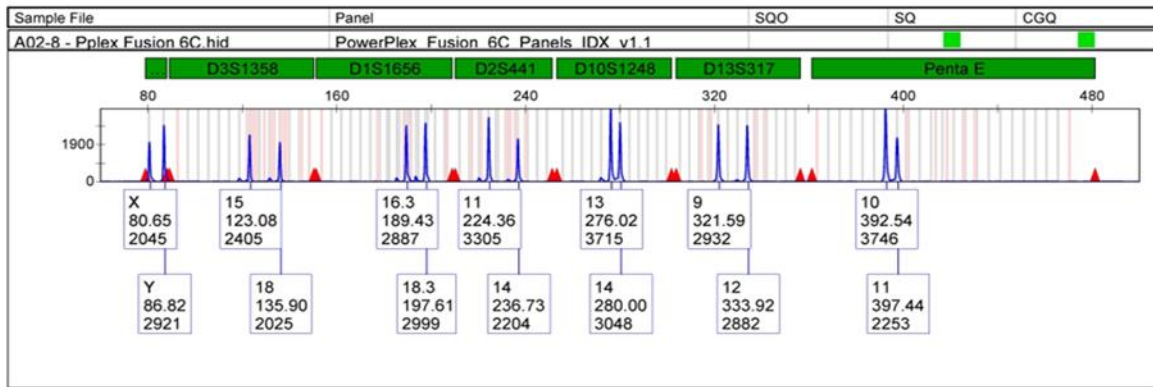
Amostra	Tipo Zaragatoa	Quantidade Sémen	Kit Extração
Z1_PM	Nylon	1µl	CWD protocolo modificado (iv)
Z2_PM	Nylon	1µl	CWD protocolo modificado (iv)
Z3_PM	Nylon	1µl	CWD protocolo modificado (iv)
Z4_PM	Nylon	1µl	CWD protocolo modificado (iv)
Z5_PM	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD protocolo modificado (iv)
Z6_PM	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD protocolo modificado (iv)
Z7_PM	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD protocolo modificado (iv)
Z8_PM	Nylon	1µl diluição 1:5	CWD protocolo modificado (iv)
ZA_PF	Nylon	1µl	CWD protocolo PROMEGA
ZB_PF	Nylon	1µl	CWD protocolo PROMEGA

Tabela XXIV Descrição das amostras preparadas para a Experiência 4 “Testar a compatibilidade do kit de extração diferencial I-sep, da Biotype, com o *kit* de extração *Casework Direct*, da PROMEGA”.

Amostras pós ISEP + Automate Express Forensic					
Amostra	Tipo Zaragatoa	Tipo de amostra (mistura)	Amostra pré ISEP	Fração Epitelial	Fração Espermiática
FB_ISEP	Nylon	Saliva FB + 1µl sémen	ZN + AM	FB_Epit_ISEP	FB_Esp_ISEP
VL_ISEP	Nylon	Saliva VL + 1µl sémen	ZN + AM	VL_Epit_ISEP	VL_Esp_ISEP
VB_ISEP	Nylon	Saliva VB + 1µl sémen	ZN + AM	VB_Epit_ISEP	VB_Esp_ISEP
CS_ISEP	Nylon	Saliva CS + 1µl sémen	ZN + AM	CS_Epit_ISEP	CS_Esp_ISEP
AMB_ISEP	Nylon	Saliva AMB + 1µl sémen	ZN + AM	AMB_Epit_ISEP	AMB_Esp_ISEP
PM_ISEP	Nylon	Saliva PM + 1µl sémen	ZN + AM	PM_Epit_ISEP	PM_Esp_ISEP
FB_ISEP + CWD	Nylon	Saliva FB + 1µl sémen	50µl lisado_kit CWD	FB_Epit_ISEP + CWD	FB_Esp_ISEP + CWD
VL_ISEP + CWD	Nylon	Saliva VL + 1µl sémen	50µl lisado_kit CWD	VL_Epit_ISEP + CWD	VL_Esp_ISEP + CWD
VB_ISEP + CWD	Nylon	Saliva VB + 1µl sémen	50µl lisado_kit CWD	VB_Epit_ISEP + CWD	VB_Esp_ISEP + CWD
CS_ISEP + CWD	Nylon	Saliva CS + 1µl sémen	50µl lisado_kit CWD	CS_Epit_ISEP + CWD	CS_Esp_ISEP + CWD
AMB_ISEP + CWD	Nylon	Saliva AMB + 1µl sémen	50µl lisado_kit CWD	AMB_Epit_ISEP + CWD	AMB_Esp_ISEP + CWD
PM_ISEP + CWD	Nylon	Saliva PM + 1µl sémen	50µl lisado_kit CWD	PM_Epit_ISEP + CWD	PM_Esp_ISEP + CWD

Tabela XXV Descrição das amostras preparadas para o estudo comparativo entre o *Kit Prepfiler Forensic DNA Extraction* e o *Kit Casework Direct* e entre a zaragatoa de nylon e a zaragatoa de viscosa.

Amostra	Tipo Zaragatoa	Quantidade de Sêmen	Kit extração
AS(1µl_1:2)_ (1)_CWD	Viscosa	1µl diluição 1:2	CWD
AS(1µl_1:2)_ (2)_CWD	Viscosa	1µl diluição 1:2	CWD
NS(1µl_1:2)_ (1)_CWD	Nylon	1µl diluição 1:2	CWD
NS(1µl_1:2)_ (2)_CWD	Nylon	1µl diluição 1:2	CWD
AS(1µl)_ (1)_CWD	Viscosa	1µl	CWD
AS(1µl)_ (2)_CWD	Viscosa	1µl	CWD
NS(1µl)_ (1)_CWD	Nylon	1µl	CWD
NS(1µl)_ (2)_CWD	Nylon	1µl	CWD
AS(2µl)_ (1)_CWD	Viscosa	2µl	CWD
AS(2µl)_ (2)_CWD	Viscosa	2µl	CWD
NS(2µl)_ (1)_CWD	Nylon	2µl	CWD
NS(2µl)_ (2)_CWD	Nylon	2µl	CWD
AS(5µl)_ (1)_CWD	Viscosa	5µl	CWD
AS(5µl)_ (2)_CWD	Viscosa	5µl	CWD
NS(5µl)_ (1)_CWD	Nylon	5µl	CWD
NS(5µl)_ (2)_CWD	Nylon	5µl	CWD
AS(10µl)_ (1)_CWD	Viscosa	10µl	CWD
AS(10µl)_ (2)_CWD	Viscosa	10µl	CWD
NS(10µl)_ (1)_CWD	Nylon	10µl	CWD
NS (10µl)_ (2)_CWD	Nylon	10µl	CWD
AS(1µl_1:2)_ (1)_PrepF	Viscosa	1µl diluição 1:2	Prepfiler
AS(1µl_1:2)_ (2)_PrepF	Viscosa	1µl diluição 1:2	Prepfiler
NS(1µl_1:2)_ (1)_PrepF	Nylon	1µl diluição 1:2	Prepfiler
NS(1µl_1:2)_ (2)_PrepF	Nylon	1µl diluição 1:2	Prepfiler
AS(1µl)_ (1)_PrepF	Viscosa	1µl	Prepfiler
AS(1µl)_ (2)_PrepF	Viscosa	1µl	Prepfiler
NS(1µl)_ (1)_PrepF	Nylon	1µl	Prepfiler
NS(1µl)_ (2)_PrepF	Nylon	1µl	Prepfiler
AS(2µl)_ (1)_PrepF	Viscosa	2µl	Prepfiler
AS(2µl)_ (2)_PrepF	Viscosa	2µl	Prepfiler
NS(2µl)_ (1)_PrepF	Nylon	2µl	Prepfiler
NS(2µl)_ (2)_PrepF	Nylon	2µl	Prepfiler
AS(5µl)_ (1)_PrepF	Viscosa	5µl	Prepfiler
AS(5µl)_ (2)_PrepF	Viscosa	5µl	Prepfiler
NS(5µl)_ (1)_PrepF	Nylon	5µl	Prepfiler
NS(5µl)_ (2)_PrepF	Nylon	5µl	Prepfiler
AS(10µl)_ (1)_PrepF	Viscosa	10µl	Prepfiler
AS(10µl)_ (2)_PrepF	Viscosa	10µl	Prepfiler
NS(10µl)_ (1)_PrepF	Nylon	10µl	Prepfiler
NS (10µl)_ (2)_PrepF	Nylon	10µl	Prepfiler



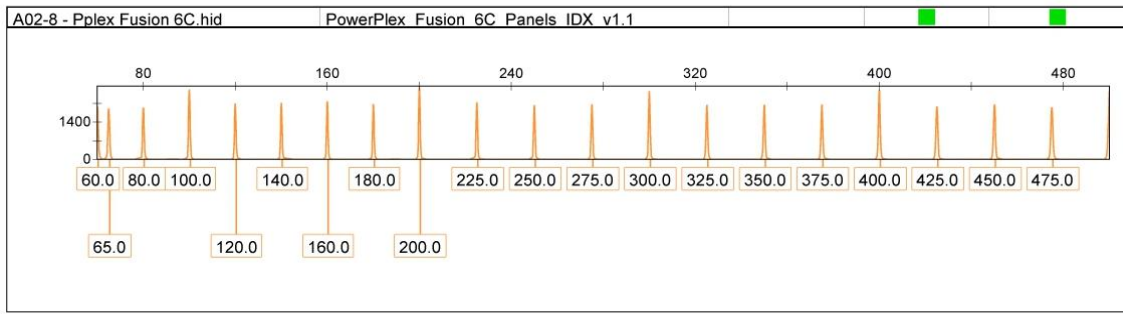


Figura 28 Perfil genético obtido do dador anónimo de sêmen, para as amostras AS(1µl_1:2)_CWD+PrepF(1); NS(1µl_1:2)_CWD+PrepF(1); AS(1µl)_CWD+PrepF(1); NS(1µl)_CWD+PrepF(1); AS(2µl)_CWD+PrepF(1); NS(2µl)_CWD+PrepF(2); AS(5µl)_CWD+PrepF(2); NS(5µl)_CWD+PrepF(1); AS(10µl)_CWD+PrepF(1) e NS(10µl)_CWD+PrepF(1). Em todas as amostras foram obtidos perfis genéticos completos, idêntico ao acima referido.