



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tiago Moderno da Costa

**ESTUDO DE COMPATIBILIDADE QUÍMICA DE UM *KIT*
DE EXTRAÇÃO: *CASEWORK DIRECT KIT, PROMEGA***

Tese de mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Outubro de 2020



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Tiago Moderno da Costa

Estudo de compatibilidade química de um *kit* de extração: *Casework Direct Kit, Promega*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses, realizada sob orientação científica do Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves e da Mestre Filipa Balsa

Outubro de 2020

“There’s as many atoms in a single molecule of your DNA as there are stars in the typical galaxy. We are, each of us, a little universe.”

Neil deGrasse Tyson

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves, coordenador do Mestrado e orientador, pela oportunidade e disponibilidade e por me indicar o Serviço de Genética e Biologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF para realizar este trabalho.

À Mestre Filipa Balsa por ter aceite ser minha orientadora, e me integrar tão bem no Serviço, por todos os conhecimentos que me transmitiu e por todo o acompanhamento ao longo deste trabalho.

À Diretora do Serviço de Genética e Biologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF, Dr.^a Lisa Sampaio, por ter permitido a realização deste trabalho no Serviço e me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar na área da Genética Forense e em ambiente profissional.

Um agradecimento especial à Doutora Vanessa Bogas e ao Doutor Armando Serra por toda a ajuda, acompanhamento e apoio científico ao longo da realização deste trabalho. A todos os colaboradores do Serviço, Dr.^a Maria João Porto, Dr.^a Ana Margarida Bento, Dr.^a Virgínia Lopes, Dr.^a Marta São-Bento, Dr. Pedro Brito, Nair Gouveia, Patrícia Cunha e Celeste Pato por me terem recebido tão bem e por estarem sempre disponíveis para me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas.

À minha família, principalmente aos meus pais e ao meu irmão que ao longo de todo o meu percurso académico me apoiaram e proporcionaram um ambiente positivo e estável.

Por fim, quero agradecer aos meus amigos pelo apoio e momentos de descontração mesmo durante estes tempos de distanciamento social.

Obrigada a todos!

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iii
Lista de siglas e Abreviaturas	v
Resumo	1
Abstract	2
1.Introdução	3
1.1 Fluxo de Trabalho na Rotina do SGBF-C.....	3
1.2 Tipos de amostras em contexto Forense	4
1.3 Extração.....	4
1.3.1 <i>Casework Direct Kit</i>	5
1.4 Identificação da Natureza da Amostra Biológica	6
1.5 Quantificação	7
1.5.1 <i>Kit Quantifiler® Trio</i> ADN Quantification.....	9
1.6 Amplificação de ADN por PCR.....	9
1.6.1 STRs e <i>Kits</i> Comerciais.....	10
1.7. Separação eletroforética, deteção e análise do produto amplificado.....	11
2.Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3.Materiais e Métodos	14
3.1 Prevenção da Contaminação e Segurança Individual	14
3.2 Amostras	14
3.3 Amostras de Referência e Grupos de Estudo.....	15
3.3.1 Mancha de Sangue Muito Impregnada (“MSMI”).....	15
3.3.2 Mancha de Sangue Pouco Impregnada (“MSPI”).....	15
3.3.3 Mancha de Sangue sobre Ganga (“AG”)	15
3.3.4 Mancha de Sangue Antiga (“AA”)	16
3.4 Amostras Problema e Grupos de Estudo	16
3.4.1 Amostra Degradada (“AD”).....	16
3.4.2 Amostra Sangue contaminada com Terra (“ZS”)	16
3.5 Metodologias de Extração e Determinação da natureza de amostra biológica	17
3.5.1 Extração com <i>Casework Direct Kit</i> (Protocolo Original).....	17
3.5.2 Extração com <i>Casework Direct Kit</i> (Protocolo Adaptado).....	18

3.5.3 Testes preliminares para determinação da natureza de amostra biológica através <i>SERATEC® HemDirect</i>	19
3.5.4. Extração automatizada em Automate Express™ Forensic ADN Extration System com o <i>kit PrepFiler™</i>	20
3.6. Metodologia de Quantificação – <i>Kit Quantifiler® Trio</i>	21
3.7. Metodologia de amplificação – <i>Kit PowerPlex® Fusion 6C System</i>	23
3.8. Estudos Realizados e Parâmetros Associados.....	25
3.8.1 Compatibilidade Química de <i>Casework Direct Kit</i> com <i>SERATEC® HemDirect</i>	25
3.8.2 Compatibilidade Química de <i>Casework Direct Kit</i> com <i>kit Quantifiler® Trio</i>	26
3.8.3 Compatibilidade Química do <i>Casework Direct Kit</i> com o <i>kit PrepFiler™</i> no <i>AutoMate Express™</i>	27
3.8.4 Compatibilidade das amostras extraídas com <i>Casework Direct Kit</i> e purificadas com <i>kit PrepFiler™</i> e amplificadas por <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> para obtenção de perfil genético.....	28
3.8.5 Comparação das amostras extraídas com o CWD e purificadas com o <i>PrepFiler™</i> com o método de extração usado na rotina do SGBF-C para amostras problema no Automate Express™	28
3.8.6 Protocolo de fluxo único (sequência de metodologias): extração com CWD, teste preliminar de identificação de natureza biológica e quantificação	29
4.Resultados e Discussão	30
4.1 Compatibilidade Química de <i>Casework Direct Kit</i> com <i>SERATEC® HemDirect</i>	30
4.2 Compatibilidade Química de <i>Casework Direct Kit</i> com <i>kit Quantifiler® Trio</i>	32
4.3 Compatibilidade Química do <i>Casework Direct Kit</i> com <i>kit PrepFiler™</i> no <i>AutoMate Express™</i>	35
4.4 Compatibilidade das amostras extraídas com CWD e purificadas com o <i>kit PrepFiler™</i> e amplificadas por <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i> para obtenção de perfis genéticos.....	38
4.5 Comparação das amostras extraídas com o CWD e purificadas com o <i>PrepFiler™</i> com o método de extração usado na rotina do SGBF-C para amostras problema no Automate Express™	41
4.6. Protocolo de fluxo único (sequência de metodologias): extração com CWD, teste preliminar de identificação de natureza biológica e quantificação	44
5.Conclusões	46
6.Referências Bibliográficas	48

Índice de Figuras

Figura 1. Fluxograma ilustrativo do fluxo de trabalho laboratorial para amostras de referência e amostras problema no SGBF-C	3
Figura 2. Representação esquemática da tecnologia de qPCR baseada na utilização de sondas TaqMan®. Adaptado de https://epidemiologiamolecular.com/estudio-virolgico-virus-gripe/	8
Figura 3. Amostras de referência e grupos de estudos: a) "AA"; b) "MSPI"; c) "AG"; d) "MSMI e amostras problema e grupos de estudos: e) "ZS"; f) "AD".	17
Figura 4. Visualização dos resultados das cassetes SERATEC® HemDirect obtidos em amostras de referência e problema de diferentes grupos de estudo extraídas com CWD (Protocolo adaptado) e amostras de referência extraídas com CWD (Protocolo original).	32
Figura 5. Comparação dos resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras extraídas com kit CWD e das mesmas amostras extraídas com CWD no AutoMate Express™	37
Figura 6. Perfis genéticos obtidos através de amostras extraídas por CWD e purificadas por PrepFiler™ e amplificadas por PowerPlex® Fusion 6C em amostras de referência do grupo de estudo: a) "MSPI"; b) "MSMI; c) "AA" e de amostra problema do grupo de estudo: d) "ZS"	40
Figura 7. Comparação dos resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras extraídas com kit PrepFiler™ e as amostras dos mesmos grupos de estudo extraídas com kit CWD no AutoMate Express™	43
Figura 8. Comparação dos resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras extraídas com kit PrepFiler™ com e sem retirada de volume para Teste Preliminar Intermédio (TPI) para os mesmos grupos de estudo.	45

Índice de Tabelas

Tabela 1. Reagentes constituintes do kit Quantifiler® Trio	21
Tabela 2. Volumes ótimos para cada reação de quantificação	22
Tabela 3. Programa no 7500 Real-Time PCR para Quantifiler® Trio	22
Tabela 4. Constituição do kit PowerPlex® Fusion 6C System	23
Tabela 5. Preparação das amostras para reação de amplificação por PCR	24
Tabela 6. Programa de amplificação kit PowerPlex® Fusion 6C System.	24
Tabela 7. Preparação de amostras para aplicação em sequenciador automático.	25

Tabela 8. Resultados dos testes SERATEC® HemDirect obtidos em amostras de referência de diferentes grupos de estudo extraídas com Casework Direct Kit (Protocolo Original).	31
Tabela 9. Resultados dos testes SERATEC® HemDirect obtidos em amostras de referência de diferentes grupos de estudo extraídas com Casework Direct Kit (Protocolo Adaptado).	31
Tabela 10. Resultados dos testes SERATEC® HemDirect obtidos em amostras problema de diferentes grupos de estudo extraídas com Casework Direct Kit (Protocolo Adaptado).	32
Tabela 11. Resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras de referência extraídas com kit CWD.....	33
Tabela 12. Resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras problema extraídas com kit CWD.	34
Tabela 13. Resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras de referência extraídas pela combinação kit CWD e kit Prepfiler™ no AutoMate Express™.	36
Tabela 14. Resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras vestígios extraídas pela combinação kit CWD e kit Prepfiler™ e AutoMate Express™.....	36
Tabela 15. Resultados obtidos em amostras, extraídas pelo kit Casework Direct purificadas com o kit PrepFiler™ e posteriormente amplificadas para o kit PowerPlex® Fusion 6C System (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina).....	38
Tabela 16. Resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras de referência com o kit Prepfiler™ e AutoMate Express™.....	41
Tabela 17. Resultados da quantificação com kit Quantifiler® Trio das amostras problema com o kit PrepFiler™ no AutoMate Express™.	42

Lista de siglas e Abreviaturas

% – Percentagem

μL – microlitro

Alvo LA – *Large Autosomal Target*

Alvo SA – *Small Autosomal Target*

Automate Express™ – Automate Express™ Forensic ADN Extration System (Applied Biosystems)

CODIS – *Combined DNA Index System*

CWD – *Kit Casework Direct (Promega)*

DI – Índice de degradação

ADN – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – dinucleótidos trifosfatados

ENFSI - *European Network of Forensic Science Institutes* - Rede Europeia de Institutos de Ciências Forenses

FBI – *Federal Bureau of Investigation*

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

IPC – *Internal PCR Control*

Kit GlobalFiler® – Kit GlobalFiler® PCR Amplification (Applied Biosystems)

Kit PowerPlex® Fusion 6C System – Kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega)

Prepfilerm™ – Kit Prepfilerm Express™ (Applied Biosystems)

Kit Quantifiler® Trio – Kit Quantifiler® Trio DNA Quantification (Applied Biosystems)

Mg²⁺ –Magnesium ion

ng - nanograma

ng/μL – concentração em nanogramas por microlitro

pb – pares de base

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

PSA – Antígeno Específico da Próstata

Q – Molécula quencher

qPCR – quantificação por PCR em tempo real

R – Fluorocromo reporter

SGBF-C – Serviço de Genética e Biologia Forenses, delegação do Centro

STRs – *Short Tandem Repeats*

SWGDM – *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*

UV - Ultravioleta

°C – graus Celsius

Resumo

O perfil genético de cada indivíduo pode ser obtido através do estudo de vários marcadores polimórficos presentes no ADN nuclear, nomeadamente os STRs. Em Genética Forense, diferentes amostras podem ter diferentes quantidades de ADN, fator que poderá comprometer a obtenção dos respetivos perfis genéticos. Desta forma, é imperativo extrair a máxima quantidade de ADN possível presente na amostra através de uma metodologia de extração. Esta etapa permite expor o ADN que é o alvo principal das metodologias de biologia molecular subsequentes e neutralizar substâncias que destabilizam as mesmas, como inibidores da PCR.

Com este trabalho, pretendeu-se descrever os procedimentos e parâmetros utilizados para compatibilizar o *kit* de extração *Casework Direct (Promega)*, com as metodologias já existentes na rotina laboratorial do Serviço de Genética e Biologia Forenses da delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, para posterior validação e implementação.

O *kit* de extração *Casework Direct* foi desenvolvido para extrair ADN de amostras em contexto crime rapidamente, neutralizando inibidores sem necessidade de partículas magnéticas e sucessivas lavagens.

O estudo envolveu, com recurso a amostras de sangue em diversos tipos de suportes, verificar e analisar parâmetros qualitativos e quantitativos como a compatibilidade química entre a solução tampão do *kit Casework Direct* e outras soluções já utilizadas no SGBF-C como, *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification*, *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, *kit Prepfiler Express™* e *SERATEC® HemDirect*, bem como, o desempenho deste novo método de extração através da quantificação por *Quantifiler® Trio DNA Quantification* e obtenção de perfis equilibrados com *kit PowerPlex® Fusion 6C System*. Finalmente, testou-se que influência tem um teste de identificação da natureza da amostra biológica na quantificação quando se parte num fluxo único de trabalho a partir do mesmo corte.

Este estudo permitiu verificar a compatibilidade do *kit* de extração *Casework Direct* com as diversas metodologias em vigor no SGBF-C, no entanto as suas vantagens e limitações devem ser exploradas, de modo, a serem estabilizadas e avançar para uma validação do método.

Palavras-chave: *Casework Direct*, *Quantifiler® Trio*, Extração, Quantificação;

Abstract

The genetic profile of each individual can be obtained by studying several polymorphic markers present in nuclear DNA, namely the STRs. In Forensic Genetics, different samples may have different amounts of DNA, a factor that may compromise the achievement of the respective genetic profiles. Thus, it is imperative to extract the maximum possible amount of DNA present in the sample through an extraction methodology. This step allows exposing the DNA that is the main target of subsequent molecular biology methodologies and neutralizing substances that destabilize them, such as PCR inhibitors.

With this work, it was intended to describe the procedures and parameters used to make the *Casework Direct (Promega) extraction kit* compatible with the existing methodologies in the laboratory routine of the Forensic Genetics and Biology Service of the Center's delegation of the Institute National Forensic Medicine and Forensic Sciences, for later validation and implementation.

The extraction *kit* *Casework Direct* was developed to extract DNA from samples in a crime context quickly, neutralizing inhibitors without the need for magnetic particles and successive washes.

The study involved, using blood samples in different types of sources, checking and analyzing qualitative and quantitative parameters such as chemical compatibility between the buffer solution of the *Casework Direct Kit* and other solutions already used in the SGBF-C, such as the Quantifiler® Trio DNA Quantification *kit*, PowerPlex® Fusion 6C System *kit*, Prepfilier Express™ *kit* and *SERATEC® HemDirect*, as well as, the performance of this new extraction method through Quantifiler® Trio DNA Quantification quantification and obtaining balanced profiles with the PowerPlex® Fusion 6C System *kit*. Finally, it was tested what influence a test of identification of the nature of the biological sample has on quantification when it starts in a single workflow from the same cut.

This study allowed to verify the compatibility of the extraction *kit* *Casework Direct* with the different methodologies in force in the SGBF-C, however its advantages and limitations must be explored, in order to be stabilized and proceed with a validation of the method.

Keywords: *Casework Direct*, Quantifiler® Trio, Extraction, Quantification;

1.Introdução

1.1 Fluxo de Trabalho na Rotina do SGBF-C

Em Genética Forense ter um fluxo de trabalho é essencial para manter tempos de perícia consistentes, peritos sincronizados e resultados seguros (Butler, 2010).

Uma amostra forense requer um processamento cuidadoso para que seja garantido o sucesso da análise até à obtenção de um perfil genético sem que se viole a cadeia de custódia e a integridade da mesma. Inicialmente há a colheita e preservação da amostra, de seguida, o ácido desoxirribonucleico (ADN) é extraído das células, devendo ser determinada a quantidade de ADN através de uma metodologia de quantificação. Posteriormente, o ADN é amplificado por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), seguindo-se a separação e deteção dos fragmentos por um processo denominado eletroforese capilar. Por fim, os eletroferogramas são analisados e interpretados, definindo-se, assim, o perfil genético da amostra. Todas estas etapas da análise forense são importantes e o seu sucesso é fundamental. Porém, a quantidade de ADN e o seu estado pode variar consideravelmente entre diferentes amostras, fator que poderá comprometer a obtenção do perfil genético (Butler, 2012). No Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação Centro o fluxo varia conforme o tipo de amostra, tal como é ilustrado na Figura 1.

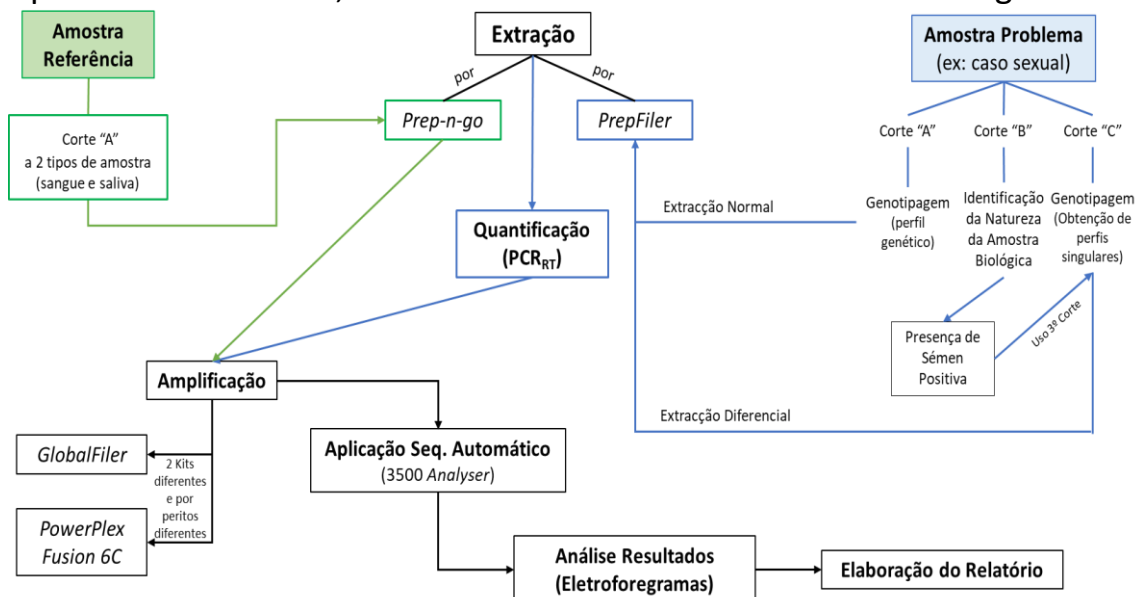


Figura 1. Fluxograma ilustrativo do fluxo de trabalho laboratorial para amostras de referência e amostras problema no SGBF-C

1.2 Tipos de amostras em contexto Forense

Em Genética Forense as amostras podem ser classificadas em amostras problema e amostra de referência tendo em conta as suas proveniências. Uma amostra problema é uma amostra proveniente de um local de crime ou uma amostra colhida em vítimas. Este tipo de amostra é frequentemente associado a baixas quantidades de ADN e de integridade desconhecida, podendo conter material genético de origem incógnita. Estas podem ser amostras biológicas de sangue, saliva, outros fluidos orgânicos, cabelos, tecidos moles, ossos, dentes, unhas, entre outros.

Uma amostra de referência é uma amostra que serve de menção a um determinado indivíduo, para determinação do seu perfil genético. Geralmente a sua colheita é efetuada para fins de comparação com as amostras problema correspondentes. As amostras de referência são normalmente amostras biológicas de sangue e/ou saliva. (Corte-Real et al., 2015).

No SGBF-C, estes dois tipos de amostras são processados em espaços físicos distintos, com metodologias de extração diferentes e a quantificação das amostras depende do tipo de amostra.

As amostras de referência são amostras recolhidas a indivíduos vivos ou cadáveres recentes sem que qualquer processo de decomposição tenha sido iniciado seguindo um protocolo de colheita com confirmação da identidade do indivíduo. Estas caracterizam-se por frequentemente apresentarem quantidade e qualidade de ADN suficiente para a obtenção de um perfil genético completo.

As amostras problema são amostras recolhidas em objetos, indivíduos vivos e/ou cadáveres, cuja quantidade de ADN pode ser muito reduzida e o estado de degradação variável.

1.3 Extração

A extração é um dos primeiros passos laboratoriais, tendo um grande peso em todas as etapas subsequentes. O seu conceito é tão simples como separar as moléculas de ADN de todos os outros materiais celulares, obtendo uma solução de ADN (Butler, 2010). No entanto, chegam aos laboratórios amostras variadas e de diferentes naturezas, que acrescentam dificuldades biológicas e químicas, mas também diferentes suportes, que acrescentam dificuldades físicas.

Sobrepõem-se outros desafios, a mitigação da degradação evitando humidade e exposição a UV natural, dos inibidores da PCR que variam com o suporte da amostra e com a natureza da mesma, sendo os mais comuns a hemoglobina, o corante azul das calças de ganga e a melanina do cabelo (Butler, 2010). Num fluxo laboratorial acrescenta-se a problemática da estabilidade, isto é, após extração, a solução obtida deve manter a suas propriedades estruturais e químicas do ADN para que possa ser processada mais tarde (Butler, 2012). Também importante, a compatibilidade, ou seja, por vezes as técnicas a implementar não possuem químicas compatíveis com as usadas em determinados equipamentos na rotina laboratorial o que pode gerar antagonismos funcionais, logo generalizar um método de extração é difícil.

No SGBF-C as amostras de referência são extraídas com o *kit Prep-n-Go (Applied Biosystems)* e as amostras problema são extraídas com o *kit comercial Prepfiler Express™ (Applied Biosystems)* com o auxílio do extrator automático *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems)*.

1.3.1 Casework Direct Kit

Quando se fala em extração fala-se em adquirir uma solução com ADN de alta qualidade, isto é, em quantidade, homogénea e sem inibidores e contaminantes, no entanto, torna-se um desafio quando se trabalha com amostras com quantidades reduzidas de ADN (Butler, 2012).

O *Casework Direct Kit (CWD)*, da *Promega*, contém uma solução tampão e um agente redutor, uma substância que perde eletrões para outras substâncias carregadas positivamente neutralizando as suas cargas, de modo a impedir a ligação com o ADN carregado negativamente, desenvolvido para produzir rapidamente um lisado de ADN a partir de amostras forenses com diferentes naturezas e origens, principalmente, zaragatoas e tecidos manchados provenientes de casos criminais (Graham, E. K. et al, 2018).

O CWD não recorre a partículas magnéticas que se ligam ao ADN como outros métodos de extração, que posteriormente são sujeitas a lavagens, reduzindo assim, a dependência no sucesso da ligação do ADN às partículas e na perda de material biológico nas várias lavagens, no qual se torna problemático em amostras com pouco ADN.

Protocolos de extração com etapas intermédias, como as lavagens, tornam-se mais morosos e de fácil contaminação devido ao acréscimo de etapas. O propósito da metodologia com o *kit* CWD é saltar etapas de lavagem, no entanto, a extração com este *kit* pode incluir etapas de lavagem e concentração através de partículas magnéticas que captam as moléculas de ADN. Isto, em casos de abordagem mais sensível, normalmente avisada através da informação dos valores de quantificação, como casos de elevada inibição ou degradação.

Os lisados obtidos pelo CWD podem ser avaliados com *kits* de quantificação *PowerQuant*[®], *Plexor*[®] *HY* da *Promega*, associados a equipamentos de outras casas comerciais como o *7500 Real-Time PCR* da *Applied Biosystems*[®] (Graham, E. K. et al, 2018), facilitando a etapa de quantificação, bem como, a tomada de decisão de qual fluxo a amostra deve seguir, principalmente em casos de agressão sexual, poder justificar o termino do processamento da amostra, quando não existe ADN masculino presente.

1.4 Identificação da Natureza da Amostra Biológica

Os laboratórios de Genética e Biologia Forense não se limitam à obtenção de perfis genéticos, mas também à análise da natureza da amostra, isto é, identificar de que tipo de fluido biológico é formada a amostra do qual se vai obter o perfil (Harbinson,S., and R. Fleming, 2016).

Este tipo de análise muitas vezes faz parte dos quesitos dos tribunais. Se o perfil serve para incluir ou excluir uma pessoa numa determinada situação/crime, a natureza auxilia na compreensão do acontecimento bem como fortalecer o valor da prova pericial obtida pela análise de ADN podendo moldar o enquadramento do crime.

É através de testes preliminares que se determina a natureza da amostra biológica (sangue, sémen ou saliva). Estes testes podem ser decisivos nos passos laboratoriais seguintes, por exemplo, numa amostra com presença de sémen deve-se realizar uma extração diferencial para separar a fração feminina da masculina e obter perfis singulares. A determinação de sangue humano numa determinada amostra pode originar o encerramento do processo quando o tipo de amostra não pertence à espécie que o tribunal pressupunha(Butler, 2012).

O SGBF-C é um laboratório acreditado e na sua rotina tem acreditada a metodologia implementada para a realização de testes preliminares para determinação da natureza de amostra biológica:

1) Sangue humano para deteção de hemoglobina humana através do teste *SERATEC® HemDirect*;

2) Sémen para deteção do Antígeno Específico da Próstata (PSA) através de teste *SERATEC® PSA Semiquant*. Se este positivar a realização da coloração de *Christmas Tree* para observação microscópica de espermatozoides;

3) Saliva para deteção de α -*Amylase* humana através de através do teste *SERATEC® α -Amylase*.

1.5 Quantificação

Uma das grandes limitações das amostras problema é o facto de serem variáveis, ou melhor, enigmáticas em vários aspetos, pois, não são colhidas diretamente do indivíduo, estão expostas a fatores ambientais e macroscopicamente são semelhantes a fluidos análogos de outras espécies não humanas. Para tal a metodologia de quantificação ajuda a perceber com que tipo de amostra se está a trabalhar, bem como, em que condições se encontra, indicando se existe na amostra ADN humano, fatores inibitórios, de degradação e contaminantes. Esta informação tem repercussões na tomada de decisão das metodologias a aplicar *a posteriori*, como a abordagem a ter com a reação da *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, repetição da extração recorrendo a outra metodologia ou encerramento do processo devido à não existência de material humano (SWGDM, 2016).

Na maioria dos *kits* comerciais de STRs a quantidade ideal de ADN humano a adicionar está no intervalo dos 0,5 ng a 2,0 ng. A quantificação ajuda a ajustar a quantidade de amostra a usar na amplificação por PCR, de modo a obter eletroferogramas de fácil interpretação. Este fator precisa ser equacionado para evitar eletroferogramas desmedidos de difícil e morosa interpretação quando demasiado ADN, ou, em contraste, a perda de alelos e o seu equilíbrio devido a efeitos estocásticos (Butler, 2012).

A ineficácia de ajustar o volume de ADN a ser processado pode levar ao insucesso da interpretação real dos perfis, logo à repetição de todo ou parcial do fluxo, ou seja, mais despesa e tempo consumido.

A técnica de *quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)* é uma das mais usadas atualmente por vários laboratórios de Genética Forense e baseia-se na utilização de sondas que hibridizam com determinadas seqüências de interesse do ADN, delimitadas por *primers*. Estas sondas encontram-se marcadas com um fluorocromo, *reporter (R)* molécula que emite fluorescência, e um *quencher (Q)*, molécula que absorve fluorescência. Durante a reação enzimática ocorre uma hidrólise que separa espacialmente o R do Q resultando num aumento de fluorescência emitida pelo *reporter*, que é proporcional à quantidade de produto amplificado (Figura 2) (Butler, 2011; Quantifiler Trio, 2014;).

No SGBF-C a quantificação de ADN é realizada com *kit Quantifiler® Trio DNA Quantification (Applied Biosystems)* auxiliado pelo equipamento *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

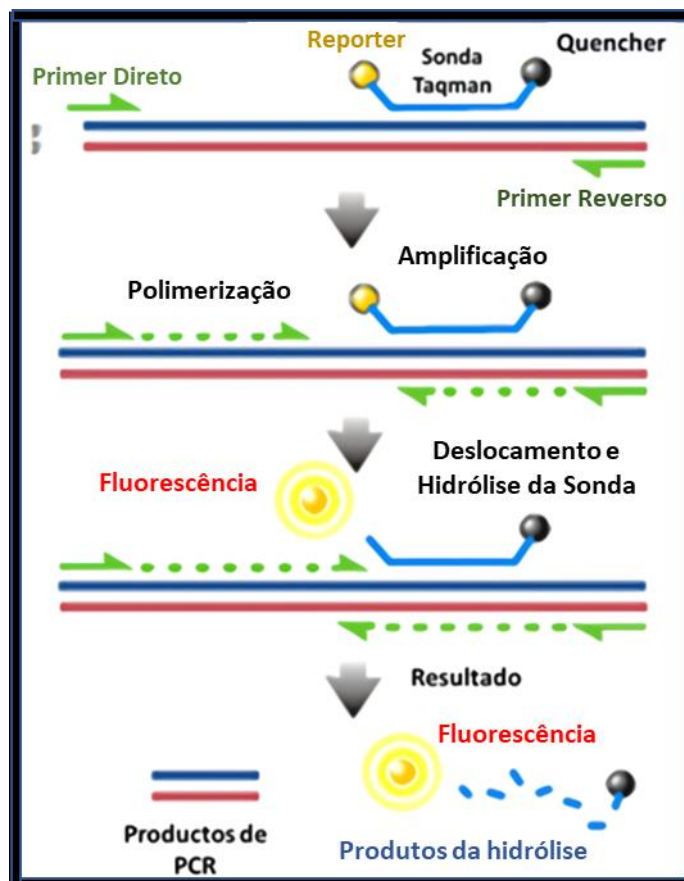


Figura 2. Representação esquemática da tecnologia de qPCR baseada na utilização de sondas *TaqMan®*. Adaptado de <https://epidemiologiamolecular.com/estudio-virolgico-virus-gripe/>

1.5.1 Kit *Quantifiler*[®] Trio ADN Quantification

O kit *Quantifiler*[®] Trio (*Applied Biosystems*) providencia um qPCR mais detalhado, pois incide sobre três alvos distintos, dois alvos no ADN autossômico e um alvo no cromossoma Y, em adição amplifica múltiplas cópias da sequência alvo que estão dispersas nos cromossomas, com o propósito de contornar possíveis alterações presentes nessas regiões dos cromossomas.

Os alvos autossômicos incluem um pequeno fragmento de 80 pares de bases designado *Small Autosomal Target (SA)* e um grande fragmento de 214 pares de bases chamado *Large Autosomal Target (LA)* (*Quantifiler Trio*, 2014). Estes alvos são importantes para avaliar diferentes parâmetros, o SA para determinar a concentração total de ADN e o LA para avaliar o nível de degradação das amostras (*Quantifiler Trio*, 2014).

O índice de degradação (DI) que o *kit* contém, é obtido pela ajuda do software associado, que calcula a razão de concentração do SA sobre a de LA. Sendo o alvo LA um fragmento de maior dimensão este está mais sujeito à degradação, apresentando-se em menor quantidade em amostras degradadas.

Finalmente, o *kit Quantifiler*[®] Trio inclui um controle interno de PCR (IPC) que permite verificar se a polimerase, o ensaio e o instrumento de detecção estão a funcionar corretamente. O IPC é marcado com um fluorocromo repórter de diferente cor e hibridiza com fragmentos sintéticos adicionados a cada reação. Neste *kit* o intervalo de valores ótimos que validam a técnica está entre os 27 e os 30. (*Quantifiler Trio*, 2014; *Applied Biosystems*, 2017c).

1.6 Amplificação de ADN por PCR

A técnica descrita por Kary Mullis e colaboradores em 1985, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, revolucionou a biologia molecular, inovando a capacidade da genotipagem dos Laboratórios de Genética Forense bem como o seu tempo de resposta. A PCR é um processo enzimático, cujos reagentes podem ser adquiridos em *kits* comerciais e requerem vários componentes como água, solução tampão, desoxirribinucleótidos (dNTPS), DNA polimerase (Taq polimerase), Mg²⁺, ADN molde e *primers*, com o objetivo de replicar uma região específica do ADN, múltiplas vezes, através de ciclos de aumento e diminuição de

temperatura obtendo-se centenas de milhões de cópias dessa região em poucas horas. Para a genética forense a PCR tornou-se central na sua rotina, pois possibilitou a análise de amostras com pouco material biológico e obtenção de perfis genéticos que antes não eram possíveis (Butler, 2012; Mullis et al., 1986).

Hoje em dia é normal usar *kits* comerciais de PCR em *multiplex*, isto é, baseiam-se no mesmo processo enzimático com diferentes conjuntos de *primers* marcados com diferentes fluorocromos que copiam várias regiões ao mesmo tempo. Isso possibilitou uma forte individualização de um perfil sem consumo de tempo proporcional (Butler, 2012; Edwards et al., 1994).

No entanto, a PCR é uma técnica sensível à inibição, que é mais comum em amostras problema e criminais. Existe uma panóplia de inibidores em diferentes suportes que afetam diferentes etapas da PCR. Sendo cada vez mais imperativo que as metodologias de extração neutralizem uma maior quantidade de inibidores (Butler, 2012).

1.6.1 STRs e Kits Comerciais

Em genética forense PCR e *Short Tandem Repeats* (STRs) estão intimamente ligados. Estas são sequências de ADN que se repetem ao longo do genoma humano. A maioria das sequências localiza-se entre genes, logo podem variar, entre indivíduos, o seu tamanho sem que isso se expresse fenotipicamente. Os STR tornaram-se os marcadores de eleição, pois têm propriedades vantajosas: têm unidades de repetição pequenas que variam entre 2 a 7 pares de bases, são facilmente amplificáveis por PCR, estão dispersos no genoma, em grande quantidade (milhares) e altamente polimórficos (Butler, 2010).

Nos Estados Unidos, o laboratório do *Federal Bureau of Investigation* (FBI) estabeleceu um conjunto de STRs a incluir na base de dados nacional, designada por *Combined DNA Index System* (CODIS). Este conjunto conta com os *loci*: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 e D22S1045 (Hares, 2012).

Relativamente à situação da Europa, existe também um conjunto de *loci*, definido pela Rede Europeia de Institutos de Ciências Forenses (ENFSI), que funciona como o número mínimo de loci a determinar para o perfil ser inserido nas bases de dados europeias, este conjunto conta atualmente

com 12 *loci* sendo eles: TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 e D12S391 (*The Council of the European Union, 2009*).

A inserção destes conjuntos de *loci* específicos em bases de dados europeias facilita a partilha de perfis entre as mesmas, promovendo assim a cooperação e uniformização entre países para resolução de casos criminais.

O SGBF-C tem como protocolo para todas as amostras, amplificar com dois *kits* de casas comerciais diferentes, realizados por peritos diferentes, a fim de reciprocamente confirmar os resultados obtidos e obter um perfil mais robusto/individualizante com STRs complementares que são únicos em cada *kit*. Sendo especialmente útil para a mesma amostra problema, no qual, por vezes, a combinação dos marcadores de dois perfis incompletos se poder visualizar indiretamente todos os marcadores à semelhança de um perfil completo, pois o insucesso de amplificação com um *kit* para um STR específico pode ser complementado com o sucesso do outro *kit* para o mesmo STR, devido a diferentes pontos de flaqueio dos *primer* para os mesmos marcadores. Esta análise é, atualmente, realizada através dos *kits* GlobalFiler™ PCR Amplification (*Applied Biosystems, 2017b*) e PowerPlex® Fusion 6C System (*Promega, 2016*).

1.7. Separação eletroforética, deteção e análise do produto amplificado

Após a amplificação dos fragmentos de ADN, estes têm de ser separados e detetados. Este procedimento é realizado em sequenciadores automáticos. Os fragmentos amplificados são separados através de eletroforese capilar de acordo com o seu tamanho. As amostras são injetadas no capilar e quando sujeitas a um campo elétrico migram através de um polímero poroso adequado para o tamanho dos fragmentos gerados. Os fragmentos mais pequenos são os primeiros a migrar e a serem detetados (Butler, 2010).

Estes *kits multiplex* além de prover os vários primers para os diversos STR incluem diferentes fluorocromos que marcam cromaticamente os mesmos, permitindo que após a eletroforese capilar se obtenha um ficheiro com vários “picos” coloridos que podem ser espectralmente organizados através de *softwares* como o *GeneMapper*.

Juntamente com a amostra é adicionado um *Internal sizing standard* que contém fragmentos de tamanhos conhecidos, os produtos de PCR podem ser comparados a este, para que seja atribuído o correto tamanho de pares de bases, originando um eletroferograma com “picos” organizados por tamanho e por coloração.

No próprio software os produtos de PCR são comparados com o *Ladder* Alélico que o *kit* integra, o qual sofreu o mesmo processo de organização e que tem uma panóplia de alelos presentes na população para cada sistema de STR atribuindo assim o alelo correspondente (Moretti et al., 2001). Deste modo é concluído o processo de genotipagem que “desfragmenta” os dados aglomerados do final da eletroforese para um formato legível, compreensível e que pode ser trabalhado por diferentes laboratórios (Butler, 2012).

Para a análise dos eletroferogramas, cada Laboratório dependendo dos seus padrões e instrumentos, deve definir um limiar analítico (LA), em unidades relativas de fluorescência (RFU), a partir do qual qualquer pico obtido é realmente a representação de um produto de PCR. Todos os “picos” com valores abaixo deste limiar não devem ser considerados como alelos, pelo facto de não se poder afirmar com segurança a atribuição do pico a um alelo real (Bregu et al., 2013; SWGDAM, 2017).

2.Objetivos

Uma boa extração é determinante para todas as etapas laboratoriais posteriores, especialmente quando existe ADN em pouca quantidade e qualidade. Sendo que cada amostra é única, um maior leque de técnicas de extração beneficia a abordagem laboratorial.

Atualmente, existem algumas publicações do *Casework Direct Kit* associado aos produtos da *Promega*, mas poucas sobre compatibilidade com produtos de marcas concorrentes usadas em laboratórios forenses.

2.1 Objetivo Geral

Estudo de uma nova química na extração de ADN em diferentes amostras biológicas, comparação com as metodologias já implementadas e eventual implementação da nova química na rotina laboratorial.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a compatibilidade do *kit Casework Direct* com as metodologias de extração, quantificação e teste preliminar em utilização no laboratório do SGBF-C;
- Avaliar a robustez e sensibilidade do *kit Casework Direct*;
- Testar o *kit Casework Direct* em amostras forenses (amostras com pouco material biológico, amostras degradadas...);
- Testar o *kit Casework Direct* num fluxo único de processamento de amostra (aplicar várias metodologias só com um corte);
- Diminuição do tempo na realização do fluxo de trabalho;
- Comparar os resultados de quantificação de amostras extraídas pelo *kit Casework Direct* com o *kit PrepFiler™*, já acreditado no SGBF-C;
- Obtenção de perfis genéticos completos e com qualidade partindo de uma extração pelo *kit Casework Direct*.

3. Materiais e Métodos

A componente prática deste trabalho foi realizada no SGBF-C do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

3.1 Prevenção da Contaminação e Segurança Individual

Para evitar qualquer tipo de contaminação indesejada que possa afetar os resultados, os laboratórios, atualmente, munem-se de um conjunto de medidas preventivas. Como tal, existe um documento no qual estão especificadas as normas que devem ser cumpridas no SGBF-C (I-SGBF-C-014, 2018).

Este conjunto de normas prevê a descontaminação da sala, bancada de trabalho, workstations, materiais e/ou equipamentos com recurso à luz ultravioleta (UV) durante 10 a 20 minutos, antes e depois de qualquer procedimento laboratorial. O uso de roupa de trabalho de proteção individual e exclusiva, nomeadamente bata, luvas e máscara descartáveis, sendo que não é permitida a circulação entre salas diferentes com a roupa de trabalho de proteção individual que está a ser utilizada numa determinada sala nem o transporte de materiais e/ou equipamentos. A presença obrigatória de um controlo negativo para detetar possíveis contaminações e rastrear o momento do evento. Por fim, o registo de todos os procedimentos realizados, bem como todos os reagentes, consumíveis e equipamentos utilizados em modelos próprios elaborados pelo serviço, facilitando, assim, a rastreabilidade de qualquer amostra (I-SGBF-C-014, 2018).

Com o aparecimento do Covid-19 estenderam-se algumas medidas como desinfeção com álcool ou sabão na entrada e saída do serviço, laboratórios e gabinetes, limpeza de maçanetas e puxadores das portas e janelas e interruptores. Desinfeção periódica no manuseamento de documentos, uso permanente de máscaras e número limitado de pessoas por laboratório e gabinete.

3.2 Amostras

Para a realização do presente trabalho foram colhidas, voluntariamente, amostras de sangue no SGBF-C, aos colaboradores do serviço. Também foram utilizadas algumas amostras de tese de doutoramento de um dos colaboradores. Nenhuma das amostras foi

colhida ou utilizada sem consentimento prévio e a sua utilização no decorrer dos procedimentos laboratoriais foi sempre feita através de nomenclatura codificada de modo a garantir a sua anonimização. As amostras foram utilizadas somente e exclusivamente para o fim previsto.

3.3 Amostras de Referência e Grupos de Estudo

Tentou-se obter amostras de modo a recriar amostras de referência que surgem na rotina laboratorial do SGBF-C, ou seja, colhidas num ambiente controlado, amostra que tem o seu material biológico intacto ou com pouca degradação e com poucos fatores inibitórios, sendo processadas em espaços físicos distintos sem nunca se cruzarem com as amostras problema.

3.3.1 Mancha de Sangue Muito Impregnada (“MSMI”)

As manchas de sangue foram efetuadas com auxílio de uma lanceta, dispositivo de punção estéril para uso único (Accu-Chek® Safe T-Pro® Plus) sob uma ligeira punção no dedo e de seguida foi impregnado um papel FTA para mancha de sangue (Human ID Bloodstain Card, Whatman™) de modo a formar uma grande mancha visível na frente e verso do papel. Foram obtidas 4 manchas (todas do mesmo indivíduo) e destas perfizeram-se 2 cortes a cada (8 no total).

3.3.2 Mancha de Sangue Pouco Impregnada (“MSPI”)

As manchas de sangue foram efetuadas com auxílio de uma lanceta, dispositivo de punção estéril para uso único (Accu-Chek® Safe T-Pro® Plus) sob uma ligeira punção no dedo e de seguida foi sequencialmente impregnado um papel FTA para mancha de sangue (Human ID Bloodstain Card, Whatman™) de modo a formar várias pequenas manchas, sendo usadas posteriormente as mais pequenas e com pouca pigmentação. Foram obtidas 20 pequenas manchas individuais (todas do mesmo indivíduo).

3.3.3 Mancha de Sangue sobre Ganga (“AG”)

Imediatamente após a colheita de sangue total foram micropipetados 10 µL do mesmo para o centro de um quadrado com 1,5 cm de comprimento e largura de um tecido de ganga dividido em grelha. Foram obtidas 16 manchas individuais (todas do mesmo indivíduo).

3.3.4 Mancha de Sangue Antiga (“AA”)

O SGBF-C providenciou quatro manchas de sangue em pano de algodão (2 indivíduos masculinos e 2 indivíduos femininos) obtidas em Agosto de 1984, que permanecem guardadas no SGBF-C. Foram obtidas 5 cortes de cada mancha (20 no total).

3.4 Amostras Problema e Grupos de Estudo

Tentou-se obter amostras de modo a recriar amostras problema que surgem na rotina laboratorial do SGBF-C, ou seja, representando um ambiente real, amostra que tem o seu material biológico mais exposto a fatores degradativos e inibitórios, sendo processadas em espaços físicos distintos sem nunca se cruzarem com as amostras de referência.

3.4.1 Amostra Degradada (“AD”)

Foram doadas 4 manchas de sangue provenientes de um trabalho de doutoramento duma colaboradora do laboratório. São manchas de sangue depositadas em quadrados de tecido de Licra com 1,5 cm de comprimento e largura que posteriormente foram enterradas no areal durante o verão. Cada mancha é proveniente de indivíduos diferentes sendo duas delas do sexo masculino. Foram obtidas 3 cortes de cada mancha (12 no total).

3.4.2 Amostra Sangue contaminada com Terra (“ZS”)

Estas amostras foram obtidas imediatamente após a colheita de sangue total, no qual, foram pipetados 30 µL do mesmo sobre a ponta de zaragatoas de *nylon* e de seguida com a pipeta de *pasteur* foram adicionadas 3 gotas de uma solução aquosa com terra e deixadas a secar à temperatura ambiente. Foram obtidas 8 zaragatoas individuais (todas do mesmo indivíduo).

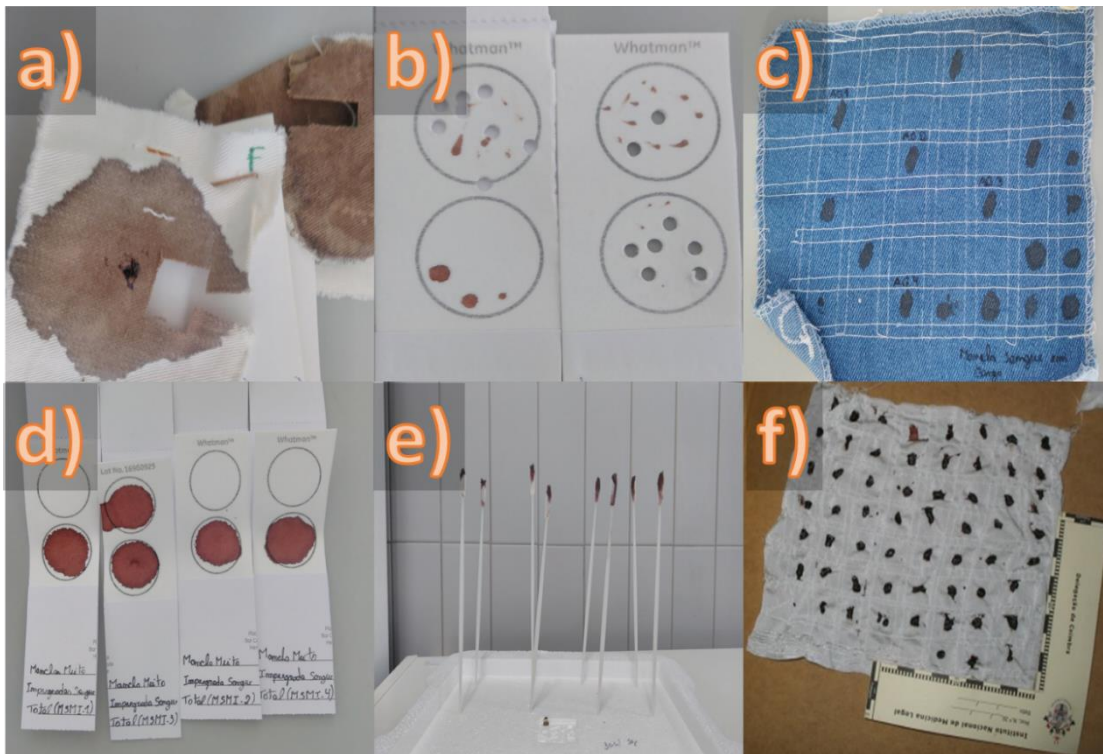


Figura 3. Amostras de referência e grupos de estudos: a) “AA”; b) “MSPI”; c) “AG”; d) “MSMI” e amostras problema e grupos de estudos: e) “ZS”; f) “AD”.

Para adicional informação, em todas as metodologias usadas exceto na quantificação, deve-se considerar o grupo de estudo “MSMI” como controlo positivo, visto que são amostras semelhantes às que o SGBF-C tem como amostras de referência. O material biológico das amostras dos grupos “MSMI”, “MSPI”, “AG” e “ZS” foi colhido do mesmo indivíduo, do sexo feminino.

3.5 Metodologias de Extração e Determinação da natureza de amostra biológica

3.5.1 Extração com *Casework Direct Kit* (Protocolo Original)

Esta metodologia é tipicamente utilizada para extração de zangaratoas em contexto de agressão sexual ou cortes de tecido manchado com fluidos biológicos para posterior quantificação e foi executado conforme o protocolo original e validada pela própria casa comercial, *Promega* (Graham, E.K. et al., 2018).

Inicialmente, colocou-se a coluna de centrifugação *Casework* dentro do Microtubo *ClickFit* (tubo *ependorf*) e procedeu-se à etiquetagem dos mesmos.

Estabelecidas as nomenclaturas fizeram-se os vários cortes dos diferentes tipos de suporte de amostra:

1) Nas manchas de sangue em papel FTA fez-se 1 *punch* com 1,2 milímetros com o alicate para dentro das colunas de centrifugação, fazendo uma limpeza ao alicate entre cada amostra (fazendo 2 a 3 *punchs* em papel de mancha limpo);

2) Com as zaragatoas de nylon separaram-se as hastes da cabeça que contem a amostra através de uma zona de fragilidade (ranhura), colocando a cabeça dentro da coluna de centrifugação;

3) Nas amostras em substrato de ganga, licra e pano foram recortados quadrados com 1,5 cm de largura e comprimento e a partir destes, novamente cortados em pequenos pedaços, inserindo-os dentro da coluna de centrifugação, procedendo posteriormente à limpeza dos utensílios (tesoura e pinça) com lixívia e água destilada entre cada corte.

Adicionou-se 400µL de *buffer Casework Direct* e 2µL de 1-*Thioglicerol* (diluído 10 vezes) a cada amostra e colocaram-se os tubos a incubar num *termomixer* a 70°C, com agitação permanente de 400 rpms, durante 30 minutos para a eluição dos conteúdos de cada amostra para o *buffer*.

Após os 30 minutos os tubos foram centrifugados 5 minutos (14000-15000 x g), para que o lisado atravessasse a coluna para o fundo do tubo, ficando assim a suporte da amostra na coluna e o líquido do lisado no fundo do tubo.

Após verificação de todo o líquido ter atravessado a coluna para o tubo *ependorf*, retirou-se a coluna com o suporte da amostra, descartando-o, fechando o tubo. A solução que ficou no tubo pode ser trabalhada de seguida ou congelada para posterior processamento.

3.5.2 Extração com *Casework Direct Kit* (Protocolo Adaptado)

O protocolo original (Graham, E.K. et al., 2018) dificulta a obtenção de resultados válidos com testes preliminares para determinação da natureza de amostra biológica através *SERATEC® HemDirect*, para tal, modificaram-se algumas etapas ao protocolo original:

1) Adicionou-se 200µL de *buffer Casework Direct*, 200µL H₂O *nuclease-free* e 2µL de 1-*Thioglicerol* (diluído 10 vezes);

2) A 1ª incubação foi feita a temperatura ambiente (24°C), com agitação permanente de 400rpms, durante 30 minutos;

3) Após os 30 minutos os tubos foram centrifugados 5 minutos (14000-15000 x g) e descartada a coluna de centrifugação.

4) Sempre que se executaram testes preliminares para determinação da natureza de amostra biológica através *SERATEC® HemDirect*, o restante da amostra que não foi utilizada no teste preliminar foi incubada uma 2ª vez, num *termomixer* a 70°C, com agitação permanente de 400 rpms, durante 30 minutos.

3.5.3 Testes preliminares para determinação da natureza de amostra biológica através *SERATEC® HemDirect*

O teste *SERATEC® HemDirect* consiste num teste imunocromatográfico de um passo para a pesquisa de hemoglobina humana. Para a realização deste procedimento é necessário que as amostras tenham sido extraídas à temperatura ambiente.

Após a 1ª incubação e centrifugação das amostras através de *CWD* (protocolo adaptado), retirou-se a cassette do kit *SERATEC® HemDirect* do invólucro, nomearam-se com a respetiva identificação da amostra e adicionou-se 100µL da amostra extraída.

Ao fim de 5 minutos à temperatura ambiente foram lidos os resultados, os negativos foram confirmados ao fim de 10 minutos realizando-se o devido registo fotográfico.

Para a interpretação dos resultados seguiram-se as recomendações do protocolo do SGBF-C para *SERATEC® HemDirect* (IT-SGBF-C-010, 2018), sendo:

Teste Positivo: Observação de duas bandas na janela de resultados correspondendo à banda controlo e à banda de teste. A intensidade das bandas pode variar. Qualquer banda na zona de teste ao fim de 10 minutos, mesmo que fraca, deve ser considerada positiva.

Teste Negativo: Observação de uma banda na janela de resultados ao fim de 10 minutos, correspondendo à banda de controlo 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.

3.5.4. Extração automatizada em Automate Express™ Forensic ADN Extration System com o *kit* PrepFiler™

Esta metodologia de extração é utilizada, na rotina pelo SGBF-C, para as amostras problema e permite a extração de ADN a partir de variados tipos de suportes. A metodologia associa a lise celular promovida pelo tampão de lise, com a posterior ligação das moléculas de ADN a um componente magnético, resultando na remoção de potenciais inibidores da PCR e posterior eluição da molécula de ADN mais purificada e concentrada.

A extração foi realizada com recurso ao *kit* *PrepFiler™*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (*Applied Biosystems, 2017b*), e automatizada no equipamento *AutoMate Express™ ADN Extraction System*.

As amostras foram colocadas nas colunas *LySep™ Filter Column* e adicionou-se a solução de lise (500µL *PrepFiler™ Lysis Buffer* + 5µL *DTT* (1M)).

Posteriormente, incubaram-se as amostras, no *termomixer*, durante 40 minutos, à temperatura de 70°C, com agitação de 400 rpms. Durante este período, preparou-se o equipamento *AutoMate Express™* de acordo com as instruções do manual do equipamento (*Applied Biosystems, 2017a*).

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas 2 minutos a 10000 x g para que o lisado atravessasse a coluna descartando esta. De seguida, os tubos com o lisado foram colocados no equipamento e procedeu-se à purificação automática, para um volume final de 50µL.

No equipamento automático as amostras foram sujeitas as várias etapas: 1) a mistura do lisado com partículas magnéticas e outros reagentes, para subsequente ligação de ADN às partículas magnéticas; 2) a separação das partículas magnéticas que contêm ADN do lisado com tampões de lavagem, de modo a remover possíveis inibidores e contaminantes; 3) finalmente, a eluição do ADN concentrado e purificado com o tampão de eluição.

No entanto, a etapa inicial de lise de extração com *PrepFiler™*, para as amostras que foram previamente extraídas com *buffer* de *CWD*, foram

ligeiramente alteradas, visto que parte inicial da metodologia foi substituída com as etapas de extração por *CWD*.

Assim, a estas amostras foi adicionado um volume de *PrepFiler™ Lysis Buffer* até perfazer 500 µL, uma vez que a metodologia tal recomenda.

A etapa de incubação foi eliminada, procedendo-se a uma centrifugação 2 minutos a 10000 x g, prosseguindo-se com a purificação no equipamento automático nas mesmas condições. (Nota: a mistura do *CWD* e *PrepFiler Lysis Buffer* após centrifugação formam uma substância viscosa após alguns minutos, logo a introdução das amostras no *AutoMate Express™* tem que ser célere).

3.6. Metodologia de Quantificação – *Kit Quantifiler® Trio*

A quantificação de ADN foi realizada com o *kit Quantifiler® Trio ADN Quantification* (Tabela 1), de acordo com o protocolo original do fabricante (*Applied Biosystems, 2017c*).

Tabela 1. Reagentes constituintes do *kit Quantifiler® Trio*.

Reagentes do <i>kit Quantifiler® Trio</i>	<i>Quantifiler® Trio Primer Mix</i>
	<i>Quantifiler® THP PCR Reaction Mix</i>
	<i>Quantifiler® THP ADN Dilution Buffer</i>
	<i>Quantifiler® THP ADN Standard</i>

Para preparação/organização de cada aplicação de amostras para quantificação, é necessário criar previamente uma folha de planificação (*plate layout*) no *software* de análise dos resultados *HID Real-Time PCR Analysis Software*, a qual servirá como orientação durante a preparação da placa (*Applied Biosystems, 2016*).

Todos os procedimentos após a planificação foram realizados na sala de pré-PCR destinada às amostras problema.

Procedeu-se então à elaboração de uma mistura com os reagentes *Quantifiler® Trio Primer Mix* e *Quantifiler® Trio PCR Reaction Mix* de acordo com os valores indicados na Tabela 2. Foram dispensados 18µL da mistura por poço da placa (*Optical 96-Well Reaction Plate*) para quantificação.

Posteriormente, foram adicionados 2µL das amostras e dos controlos positivos nos respetivos poços, perfazendo assim um volume final de 20µL, seguindo sempre o esquema da placa previamente planificada.

Além da curva de calibração, em todas as reações de quantificação, foram utilizados controlos positivos em duplicado, com diferentes concentrações, nomeadamente 0.1ng/µL, 10ng/µL e 40ng/µL, que permitiram validar e assegurar os resultados obtidos.

Tabela 2. Volumes ótimos para cada reação de quantificação

Componentes da Reação	Volume (por amostra)	Volume Final (por amostra)
<i>Quantifiler® Trio Primer Mix</i>	8 µL	20 µL
<i>Quantifiler® Trio PCR Reaction Mix</i>	10 µL	
<i>ADN (amostra ou controlo positivo)</i>	2.0 µL	

Após adicionar as amostras e os controlos, é colada uma película transparente, *Optical Adhesive Cover*, sobre a placa que é imediatamente selada através dum utensílio apropriado, a fim de evitar qualquer rugosidade ou poeira que possa interferir com a medição ótica por fluorescência. Finalmente, centrifuga-se a placa para eliminar eventuais bolhas de ar. Conferido que não existe qualquer sujidade ou anomalia e que os poços estão preenchidos uniformemente, introduzimos a placa no equipamento *7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*. O programa de quantificação resume-se na Tabela 3.

Tabela 3. Programa no 7500 Real-Time PCR para Quantifiler® Trio

Desnaturação Inicial	40 ciclos	
95°C 2 minutos	95°C 9 segundos	60°C 30 segundos

Terminada a reação de quantificação, os resultados são analisados com recurso ao *software* de análise, o qual gera as curvas de calibração e calcula a quantidade de ADN total presente em cada amostra, ADN masculino, índice de degradação e IPC, descartando a placa no final.

3.7. Metodologia de amplificação – *Kit PowerPlex® Fusion 6C System*

A amplificação de ADN, foi realizada com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*, (Tabela 4), de acordo com as recomendações do fabricante descrito no manual de utilização (*Promega, 2016*).

Tabela 4. Constituição do *kit PowerPlex® Fusion 6C System*.

Reagentes do <i>kit PowerPlex® Fusion 6C System</i>	Reagentes de Pré-Amplificação	Reagentes de Pós-Amplificação
	<i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix</i>	<i>PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix</i>
	<i>PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	<i>WEN Internal Lane Standard 500</i>
	<i>2800M Control ADN, 10ng/μL</i>	
	<i>Water, Amplification Grade</i>	

Preparou-se uma mistura constituída pelos reagentes *PowerPlex® Fusion 6C Master Mix* e *Primer Pair Mix*, com base na Tabela 5.

O volume da mistura a adicionar foi diferente conforme o tipo de amostra:

1. Em amostras problema, distribuíram-se 10μL da mistura por tubos de *PCR* previamente identificados;
2. Em amostras de referência, distribuíram-se 5μL da mistura por tubos de *PCR* previamente identificados;

De seguida, adicionou-se o ADN de cada amostra, cujo volume pode ser variável dependendo dos resultados da quantificação, para um ideal de 1ng:

1. Em amostras problema colocou-se entre 1 a 15μL de produto extraído;
2. Em amostras de referência, colocou-se entre 1 a 7,5μL de produto extraído;

Sempre que o volume da amostra não atingisse os 15μL ou 7,5μL para amostras problema ou de referência, respetivamente, o restante volume era ajustado com água (*Water, Amplification Grade*), com o fim, de manter o volume final constante.

Tabela 5. Preparação das amostras para reação de amplificação por PCR

Componentes da Reação	Volume (por amostra problema)	Volume (por amostra de referência)
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Master Mix</i>	5 µL	2,5 µL
<i>PowerPlex Fusion 6C 5X Primer Pair Mix</i>	5 µL	2,5 µL
<i>Amostra (ADN)</i>	Até 15 µL	Até 7,5 µL
<i>Water, Amplification Grade</i>	Ajustar até perfazer o volume final	
Volume Final	25 µL	12,5 µL

A acompanhar cada reação de amplificação, foram preparados sempre controlos da reação:

1. Controlo Negativo (Problema) - 10µL da mistura + 15µL de *Water, Amplification Grade*;
2. Controlo Positivo (Problema) - 10µL da mistura + 1µL de 2800M Control ADN, 10ng/µL + 14µL de *Water, Amplification Grade*;
3. Controlo Negativo (Referência) - 5µL da mistura + 7,5µL de *Water, Amplification Grade*;
4. Controlo Positivo (Referência) - 5µL da mistura + 1µL de 2800M Control ADN, 10ng/µL + 6,5µL de *Water, Amplification Grade*;

Posteriormente, as amostras são colocadas num termociclador, (*Veriti® 96-well Thermal Cycler da Applied Biosystems*), no qual decorreu a reação de amplificação por *PCR*. O respetivo programa de amplificação utilizado encontra-se descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Programa de amplificação kit *PowerPlex® Fusion 6C System*.

29 ciclos				
Incubação inicial	Desnaturação	Hibridização	Extensão Final	Hold
96°C 1 minuto	96°C 5 segundos	60°C 1 minuto	60°C 10 minutos	4°C ∞

Terminada a amplificação, as amostras são preparadas para a sua aplicação no sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

Esta preparação consiste numa mistura contendo *WEN ILS 500* e *Hi-Di Formamide*, conforme descrito na Tabela 7, distribuindo 10µL desta mistura pelos vários poços. Foi adicionado 1µL de amostra amplificada no respetivo poço. No final colocou-se num poço diferente, 1µL de *PowerPlex® Fusion 6C Allelic Ladder Mix*.

Tabela 7. 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

De seguida, tapou-se a placa com uma septa, centrifugou-se e desnaturou-se num termociclador próprio a 95°C, durante 3 minutos.

Para finalizar, a placa foi colocada no sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, sendo previamente selecionado o respetivo programa de eletroforese. Posteriormente, obtiveram-se os eletroferogramas, que foram analisados com recurso ao software *GeneMapper® ID-X v1.4 (Applied Biosystems, 2012)*.

3.8. Estudos Realizados e Parâmetros Associados

3.8.1 Compatibilidade Química de *Casework Direct Kit* com *SERATEC® HemDirect*

Para testar se o tampão do *Casework Direct Kit* podia ser utilizado como tampão de eluição para uso na cassette do cassette do *SERATEC® HemDirect* avaliou-se:

- Percurso da solução na cassette – observou-se se a solução percorria até à zona de banda de controlo e até à banda de teste, bem como, se o percurso era uniforme;
- Validação da metodologia – observou-se se a banda de controlo interna da cassette estava presente.

- Detecção de hemoglobina – observou-se se no final do percurso da amostra na cassete se estava ausente ou presente a banda de teste e, se em caso positivo, se nítida ou ténue.

Estes parâmetros foram avaliados usando o protocolo de extração com *Casework Direct Kit* (Protocolo Original) com 5 amostras de referência e *Casework Direct Kit* (Protocolo Diluído) com 16 amostras (8 de referência e 8 problema).

3.8.2 Compatibilidade Química de *Casework Direct Kit* com *kit Quantifiler® Trio*

Tornou-se necessário estudar a compatibilidade das químicas do tampão do CWD e do *kit Quantifiler® Trio*, e desta mistura aquando colocada no equipamento do *7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)* para a reação de quantificação .

Assim, para testar esta compatibilidade usaram-se 22 amostras (16 de referência e 6 problema) extraídas com *Casework Direct Kit* (Protocolo Original) e avaliaram-se os seguintes aspetos:

- Validação da metodologia de quantificação – através dos controlos negativos e positivos observando os valores do ADN Humano (total) em ng/ μ L, ADN masculino (cromossoma Y) em ng/ μ L. Degradação e o IPC e se estes enquadravam dentro dos parâmetros utilizados pela casa;
- Validação das amostras analisadas – avaliou-se o IPC de cada amostra, verificando se se enquadrava nos parâmetros da casa comercial;
- Sucesso na amplificação do ADN das amostras – analisou-se a quantidade de ADN humano e masculino em (ng/ μ L) e se apresentava quantidade suficiente para se proceder às etapas laboratoriais subsequentes ou se teriam que ser novamente purificadas e concentradas no *AutoMate Express™*;
- Capacidade de purificação do CWD – O *kit Quantifiler® Trio* permite calcular o índice de degradação e este foi analisado

para as diferentes amostras, a fim de saber em que categoria se enquadravam segundo a casa comercial.

Segundo o manual da casa comercial para o *Quantifiler® Trio da Promega (Quantifiler Trio, 2014)* os valores ótimos de IPC devem estar compreendidos entre 27 e 30. Para o Índice de degradação é protocolado: 1) Valores inferiores a 1 indica que o ADN não está degradado; 2) Entre 1 e 10 o ADN está ligeiramente a moderadamente degradado; 3) Superior a 10, o ADN está altamente degradado.

3.8.3 Compatibilidade Química do *Casework Direct Kit* com o kit *PrepFiler™* no *AutoMate Express™*

Dada a necessidade de ter de se purificar alguns tipos de amostras extraídas por CWD houve o dever de se estudar a compatibilidade entre a química do tampão do CWD e dos reagentes do kit *PrepFiler™* e sua utilização no *AutoMate Express™*.

As mesmas amostras que foram trabalhadas no ponto anterior (3.8.2), seguiram as etapas descritas no subcapítulo 3.4.5 para amostras extraídas com CWD. Avaliaram-se alguns parâmetros qualitativos:

- Anomalias na mistura – Após mistura das duas soluções tampão dos diferentes kits (*CWD e PrepFiler™*) e até à utilização do *AutoMate Express™* observou-se se havia formação de algum depósito/precipitado.
- Química do CWD no *AutoMate Express™* – Na sequência do parâmetro anterior observou-se se o equipamento fez todas as suas etapas com sucesso à semelhança do que é observado na rotina do SGBF-C quando se executa esta metodologia.

Posteriormente, as amostra purificadas pelo *AutoMate Express™* foram novamente quantificadas e comparadas com os resultados das mesmas extraídas com o CWD.

3.8.4 Compatibilidade das amostras extraídas com *Casework Direct Kit* e purificadas com *kit PrepFiler™* e amplificadas por *kit PowerPlex® Fusion 6C System* para obtenção de perfil genético

Neste ponto, o objetivo era saber se as amostras extraídas com CWD e purificadas com *PrepFiler™* dariam bons resultados na amplificação com o *kit PowerPlex® Fusion 6C System*.

Para tal, escolheram-se 6 amostras uma de cada grupo de estudo e procedeu-se ao método descrito no ponto 3.6, avaliando-se:

- Validação da metodologia através dos controlos usados – verificou-se ausência de perfil genético no controlo negativo e presença com qualidade de perfil genético no controlo positivo “MSMI” e o *Ladder alélico do PowerPlex® Fusion 6C*.
- Qualidade dos perfis genéticos das amostras – aqui avaliou-se o número de marcadores amplificados, representando perfis completos ou incompletos ou ausência de perfil. Em adição, o balanceamento dos “picos” e a singularidade dos mesmos.

3.8.5 Comparação das amostras extraídas com o CWD e purificadas com o *PrepFiler™* com o método de extração usado na rotina do SGBF-C para amostras problema no *Automate Express™*

Como termo de comparação entre resultados de diferentes metodologias de extração usou-se o método de extração para amostras problema do SGBF-C (*PrepFiler™*). Estudaram-se 22 amostras (16 de referência e 6 problema) dos mesmos grupos de estudo e procedeu-se à metodologia que está implementada na rotina do SGBF-C (extração por *PrepFiler™*, quantificação com *Quantifiler® Trio* e amplificação com *PowerPlex® Fusion 6C*)

Os parâmetros avaliados foram iguais aos descritos em 3.8.2, para posterior comparação com os dados da quantificação provenientes de amostras extraídas com *Casework Direct Kit*, (3.7.2), bem como, os dados da quantificação resultantes da interação do CWD com *kit PrepFiler™* no *AutoMate Express™*, (3.7.3).

3.8.6 Protocolo de fluxo único (sequência de metodologias): extração com CWD, teste preliminar de identificação de natureza biológica e quantificação

O objetivo foi avaliar se a partir de uma extração com o *kit Casework Direct* se poderia avançar para uma quantificação tendo ocorrido um teste preliminar entre estas duas etapas.

Para tal usaram-se 12 amostras de referência para cada extração com *Casework Direct Kit* (Protocolo Diluído) como descrito no ponto 3.5.2, no qual, na extração: 1) entre as duas incubações mencionadas existe centrifugação da amostra com remoção da coluna e posterior retirada de 100µL; 2) não há retirada de 100µL, as duas incubações ocorrem sequencialmente com a retirada da coluna de centrifugação no final.

Finalmente, realizou-se a quantificação para cada tipo de extração (referidos acima) e analisaram-se os dados referentes à concentração total de ADN semelhante aos parâmetros estudados no ponto 3.8.2.

4. Resultados e Discussão

Um dos objetivos deste trabalho consiste na exploração de várias competências do *Casework Direct Kit* e se estas podem ser adaptadas para a realidade do SGBF-C, para uma posterior implementação na rotina laboratorial. Para cumprir esses requisitos, estudaram-se as várias compatibilidades com métodos, química de *kits* e equipamentos, implementados no SGBF-C, para que este novo *kit* de extração possa vir a ser implementado.

A extração é uma das primeiras etapas laboratoriais que permite o posterior processamento pelas várias técnicas de biologia molecular disponíveis a um laboratório de genética forense. No entanto, só nas etapas posteriores à extração é que é obtida informação sobre se a técnica anterior teve sucesso. Logo além de aspetos relativos de conciliabilidade logística com os equipamentos instalados ou harmonia entre diferentes produtos químicos de técnicas validadas, também se estudou quantitativamente a atuação do CWD em comparação com a metodologia já implementada no serviço para a etapa de extração de amostras problema, usando amostras de diferentes grupos de estudo à semelhança do que o SGBF-C está habituado a processar.

4.1 Compatibilidade Química de *Casework Direct Kit* com *SERATEC® HemDirect*

Para cada amostra de referência foram estudados o tipo de percurso da amostra na cassette, existência de banda de controlo e banda de teste como referido na Tabela 8 e 9. Quando se usa o CWD de acordo com o protocolo original, em algumas amostras (“PM” e “AS”) o tipo de percurso é irregular o que prejudica a validação da metodologia impossibilitando com consistência o aparecimento da banda de controlo (Figura 3.a). Este fenómeno deve-se ao facto de se incubar a uma temperatura de 70°C que desnatura a hemoglobina a ser detetada. Este associado à própria composição do tampão CWD destabiliza o percurso do fluido na cassette. Estes resultados motivaram a necessidade de adaptar o protocolo original sempre que se extraíam amostras extraídas com CWD que fossem sujeitas a testes preliminares para identificação de natureza biológica.

Para as amostras de referência extraídas com CWD (protocolo adaptado) todas verificaram uma corrida fluída e a existência de uma banda

de controlo validando a metodologia de que o tampão do *CWD* pode ser usado nas cassetes de *SERATEC® HemDirect*, no entanto, nenhuma banda de teste foi detetada (Figura 3.b). Esta última observação pode ser explicada pelo facto do grupo de estudo (“AA”) ser constituído por amostras muito desidratadas devido ao tempo que estão armazenadas, logo um tempo de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente não tenha um poder de eluição suficiente que seja posteriormente detetável pelo teste. No caso das manchas de sangue pouco impregnada (“MSPI”) deve-se ao facto de ser um tipo de amostra com pouco material biológico, que associado ao pouco tempo de incubação perfaz uma solução com pouca amostra eluída, não sendo possível ser detetada pelo teste.

Tabela 8. Resultados dos testes *SERATEC® HemDirect* obtidos em amostras de referência de diferentes grupos de estudo extraídas com *Casework Direct Kit* (Protocolo Original).

Amostras	TC	PM	SB	AS	Ctrl (-)
Percurso da amostra	Fluida	Não Fluida	Fluida	Não Fluida	Pouco Fluida
Banda Controlo	D	ND	D	ND	D
Banda Teste	ND	ND	ND	ND	ND

D: Detetado; ND: Não detetado

Tabela 9. Resultados dos testes *SERATEC® HemDirect* obtidos em amostras de referência de diferentes grupos de estudo extraídas com *Casework Direct Kit* (Protocolo Adaptado).

Amostras	AA.1	AA.2	AA.3	AA.4	MSPI.1	MSPI.2	MSPI.3	MSPI.4	Ctrl (-)
Percurso da amostra	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida
Banda Controlo	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Banda Teste	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

D: Detetado; ND: Não detetado

Para cada amostra problema foram estudados os mesmos parâmetros como se observa na Tabela 10. Todas as amostras tiveram um percurso fluido na cassete e foi detetada a banda de controlo, em todas as amostras de sangue misturado com terra foi detetada uma banda de teste ténue. Nestes casos existe a deteção pelo teste, mas a pouca nitidez da banda deve-se à solução da amostra ter uma tonalidade avermelhada, diminuindo o contraste com a banda teste (Figura 3.c). As amostras degradadas apresentaram todas bandas de teste exceto a “AD.4”, o que pode ser explicado pelo facto de o tempo de incubação não ser suficiente

associado à degradação da hemoglobina inerente ao tipo de amostra, podendo-se constatar pela diferença de coloração relativamente à outra do mesmo grupo.

Tabela 10. Resultados dos testes *SERATEC® HemDirect* obtidos em amostras problema de diferentes grupos de estudo extraídas com *Casework Direct Kit* (Protocolo Adaptado).

Amostras	ZS.1	ZS.2	ZS.3	ZS.4	AD.1	AD.2	AD.3	AD.4	Ctrl (-)
Percurso da amostra	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida	Fluida
Banda Controlo	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Banda Teste	Ténue	Ténue	Ténue	Ténue	Nítida	Nítida	Nítida	ND	ND

D: Detetado; ND: Não detetado

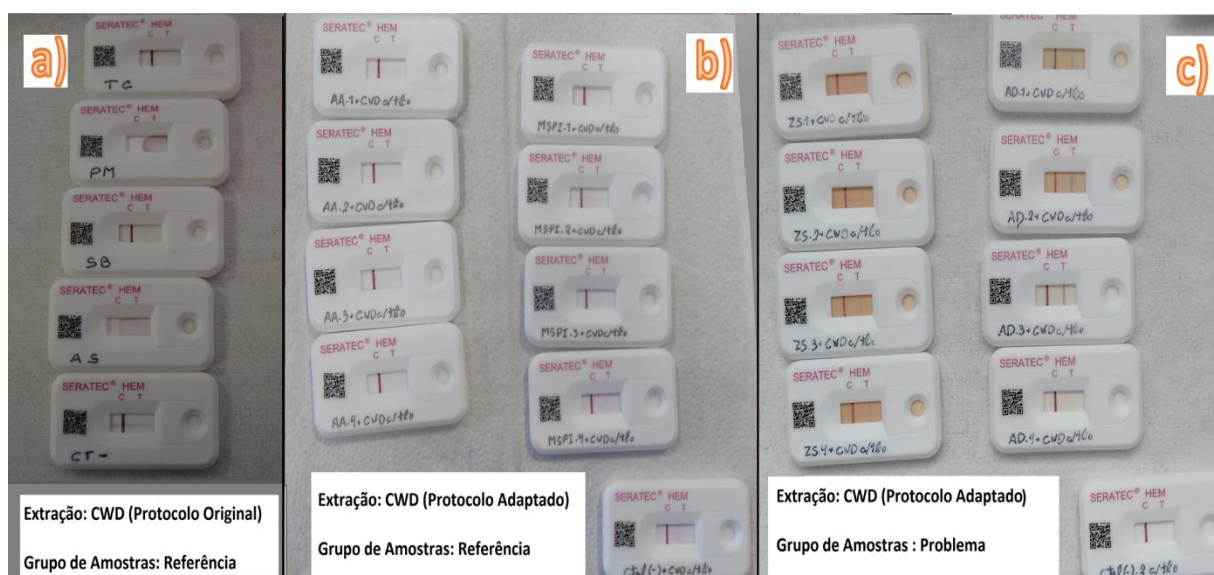


Figura 4. Visualização dos resultados das cassetes *SERATEC® HemDirect* obtidos em amostras de referência e problema de diferentes grupos de estudo extraídas com *CWD* (Protocolo adaptado) e amostras de referência extraídas com *CWD* (Protocolo original).

4.2 Compatibilidade Química de *Casework Direct Kit* com *kit Quantifiler® Trio*

Numa primeira abordagem, tendo em conta que o *kit CWD* tem como principal objetivo extrair amostras problema proveniente de casos criminais, era imperativo testá-lo com a metodologia de quantificação implementada no SGBF-C, sendo esta uma etapa obrigatória quando se trata de amostras problema.

As amostras de referência entram no conjunto de amostras estudadas, para dar uma perspetiva do desempenho do *kit CWD* na

extração em diferentes tipos de suportes e material biológico intacto, mas nem sempre em abundância como no caso do grupo de estudo “MSMI”.

Na Tabela 11, pode-se observar que a metodologia de quantificação é compatível com o CWD, pois os IPCs estão dentro dos valores normais definidos pelo manual da casa comercial para o *Quantifiler® Trio* (entre 27 a 30) e o controlo negativo só amplificou os fragmentos do IPC.

Tendo em conta que para uma amplificação de amostras de referência pode-se usar o volume máximo de 7,5 µL de produto extraído para que se obtenha uma concentração final ideal de 1 ng de ADN, podemos definir, teoricamente, que quantificações com concentrações abaixo de 0,1333 ng/µL não garantem que se obtenha um perfil completo. Posteriormente poderá ser necessária uma etapa de purificação/concentração da amostra pelo *AutoMate Express™*. Seguindo este raciocínio os grupos de estudo “MSPI” e “MSMI” não cumprem esses requisitos. Confirma-se a existência de ADN masculino (cromossoma Y) nas únicas amostras de indivíduos masculinos (“AA_CWD_1” e “AA_CWD_4”). Também, pode-se observar que o grupo de estudo das amostras “AA” apresenta um valor significativo de degradação, valor explicado pela deterioração natural do material biológico ao longo do tempo, visto que estas amostras têm décadas, o que motivaria que fosse feita uma nova etapa de extração/purificação pelo *AutoMate Express™*.

Tabela 11. Resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras de referência extraídas com *kit CWD*.

Amostras	Humano (ng/µL)	Male (ng/µL)	Degradação	IPC
AA_CWD_1	0,3404	0,3487	5,2217	29,3
AA_CWD_2	0,8530	0	5,3895	28,7
AA_CWD_3	0,4441	0	4,2574	29,08
AA_CWD_4	0,5617	0,4187	7,9463	28,88
MSPI_CWD_1	0,0016	0	0,9884	29,3
MSPI_CWD_2	0,0007	0	0,3834	29,15
MSPI_CWD_3	0,0012	0	0,3834	29,02
MSPI_CWD_4	0,0024	0	0,3828	29,37
AG_CWD_1	0,2629	0	0,5577	29,47
AG_CWD_2	0,3490	0	0,6872	29,11
AG_CWD_3	0,6001	0	0,9237	28,78

AG_CWD_4	0,5160	0	0,9683	28,83
MSMI_CWD_1	0,0492	0	0,8169	28,58
MSMI_CWD_2	0,0933	0	0,9601	28,87
MSMI_CWD_3	0,0832	0	0,8538	28,85
MSMI_CWD_4	0,1105	0	1,5254	28,9
Ctrl_(-)_CWD	0	0	0	29,39

Quanto às amostras problema, representadas na Tabela 12, existe validação da metodologia, visto que o IPC está dentro do intervalo de valores esperados e o controlo negativo não apresenta valores de ADN total e masculino.

Tendo em conta que para uma amplificação de amostras problema pode-se usar o volume máximo um volume de 12,5 µL de produto extraído para que se introduza, idealmente, 1 ng de ADN, podemos definir, teoricamente, que quantificações com concentrações abaixo de 0,0800 ng/µL não garantem que se obtenha um perfil genético completo e poderá ser necessária de uma etapa de purificação/concentração da amostra pelo *AutoMate Express™*. Somente duas amostras não preencheram os requisitos (“AD_CWD_2” e “AD_CWD_3”), podendo ser explicado pelos elevados valores de degradação das mesmas, motivando que estas devessem seguir para uma nova etapa de extração/purificação no *AutoMate Express™*.

Tabela 12. Resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras problema extraídas com *kit CWD*.

Amostras	Humano (ng/µL)	Male (ng/µL)	Degradação	IPC
ZS_CWD_1	1,9674	0	1,1239	29,32
ZS_CWD_2	1,3584	0	0,725	28,89
AD_CWD_1	0,2757	0,2952	1,0711	28,9
AD_CWD_2	0,0004	0	!!!*	28,45
AD_CWD_3	0,1722	0,2306	1,0523	28,88
AD_CWD_4	0,0023	0	!!!*	28,55
Ctrl_(-)_CWD	0	0	0	29,24

Nota: “!!!” significa que o valor de degradação é tão elevado que o *software de Quantifiler® Trio* não atribui um valor numérico.

4.3 Compatibilidade Química do *Casework Direct Kit* com *kit PrepFiler™* no *AutoMate Express™*

A necessidade deste teste deve-se ao facto de, no SGBF-C, a extração de amostras problema ser feita com o *kit PrepFiler™* e este estar associado ao *AutoMate Express™*. Assim, interessa saber se o tampão do CWD, sendo de outra casa comercial (*Promega*), não causaria incompatibilidades quando misturado com os reagentes do *PrepFiler™*, tanto a nível químico como a nível instrumental.

A mistura dos reagentes dos 2 *kits* criou precipitados decorridos alguns minutos após a centrifugação das mesmas, no entanto, diferentes amostras dentro dos mesmos grupos de estudo tiveram comportamentos diferentes, incluindo os controlos negativos que continham somente as duas soluções tampão. É difícil de definir uma causa específica, mas foi possível introduzir as amostras no equipamento automático com sucesso, mesmo em condições fora do ideal, quando as amostras apresentavam um precipitado mínimo ou a solução tinha uma aparência turva (homogénea).

Como se pode observar, na Tabela 13, a metodologia de quantificação com *kit Quantifiler® Trio* usando amostras eluídas na mistura de soluções tampão, já referidas, é válida constatando-se em todas as amostras um valor de IPC dentro do intervalo de valores esperados. Tendo em conta, que o limite mínimo de concentração de ADN, no caso de amostras de referência, para assegurar a amplificação sob condições ideais é de 0,1333 ng/μL. Podemos reparar na Tabela 13 que as amostras do grupo de estudo “MSPI” continuam a não atingir o limite mínimo, no entanto, devido à concentração/purificação da amostra que a etapa com o *AutoMate Express™* providencia, 3 das 4 amostras do grupo de estudo “MSMI” atingiram o limiar mínimo.

Tabela 13. Resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras de referência extraídas pela combinação *kit CWD* e *kit Prepfilier™* no *AutoMate Express™*.

Amostras	Humano (ng/μL)	Male (ng/μL)	Degradação	IPC
AA_CWD_PF_1	1,4647	1,2993	6,1573	28,8
AA_CWD_PF_2	2,9440	0	4,923	28,6
AA_CWD_PF_3	1,4762	0	4,3882	28,56
AA_CWD_PF_4	1,8885	1,5768	7,182	28,61
MSPI_CWD_PF_1	0,0030	0	1,0923	28,22
MSPI_CWD_PF_2	0,0029	0	2,2932	28,27
MSPI_CWD_PF_3	0,0015	0	1,3029	28,38
MSPI_CWD_PF_4	0,0044	0	0,8625	28,44
AG_CWD_PF_1	2,1755	0	1,2026	28,96
AG_CWD_PF_2	2,3668	0	1,2166	28,86
AG_CWD_PF_3	2,3531	0	1,0322	29,14
AG_CWD_PF_4	1,4761	0	1,0385	28,49
MSMI_CWD_PF_1	0,1194	0	0,8382	28,41
MSMI_CWD_PF_2	0,2376	0	1,0904	28,23
MSMI_CWD_PF_3	0,2129	0	1,136	28,37
MSMI_CWD_PF_4	0,1683	0	1,4137	28,45
Ctrl_(-)_CWD_PF	0	0	0	28,2518

Quanto às amostras problema, a validade da metodologia de quantificação volta-se a verificar. No entanto, não existe um aumento do número de amostras que atingem o limiar mínimo de concentração (0,08 ng/μL) para proceder a uma amplificação com uma quantidade ideal de ADN, que no caso da amostra (AD_CWD_PF_2) vai de encontro ao esperado, visto que apresenta um menor nível de degradação quando comparado com a quantificação anterior.

Tabela 14. Resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras vestígios extraídas pela combinação *kit CWD* e *kit Prepfilier™* e *AutoMate Express™*.

Amostras	Humano (ng/μL)	Male (ng/μL)	Degradação	IPC
ZS_CWD_PF_1	8,3377	0	1,1393	29,03
ZS_CWD_PF_2	8,6725	0	1,1096	28,9
AD_CWD_PF_1	1,5862	1,4869	1,0457	28,46
AD_CWD_PF_2	0,0015	0	3,6645	27,99

AD_CWD_PF_3	0,6714	0,7217	1,4117	28,46
AD_CWD_PF_4	0,0085	0	113,229	28,07
Ctrl_(-)_CWD_PF	0	0	0	27,9334

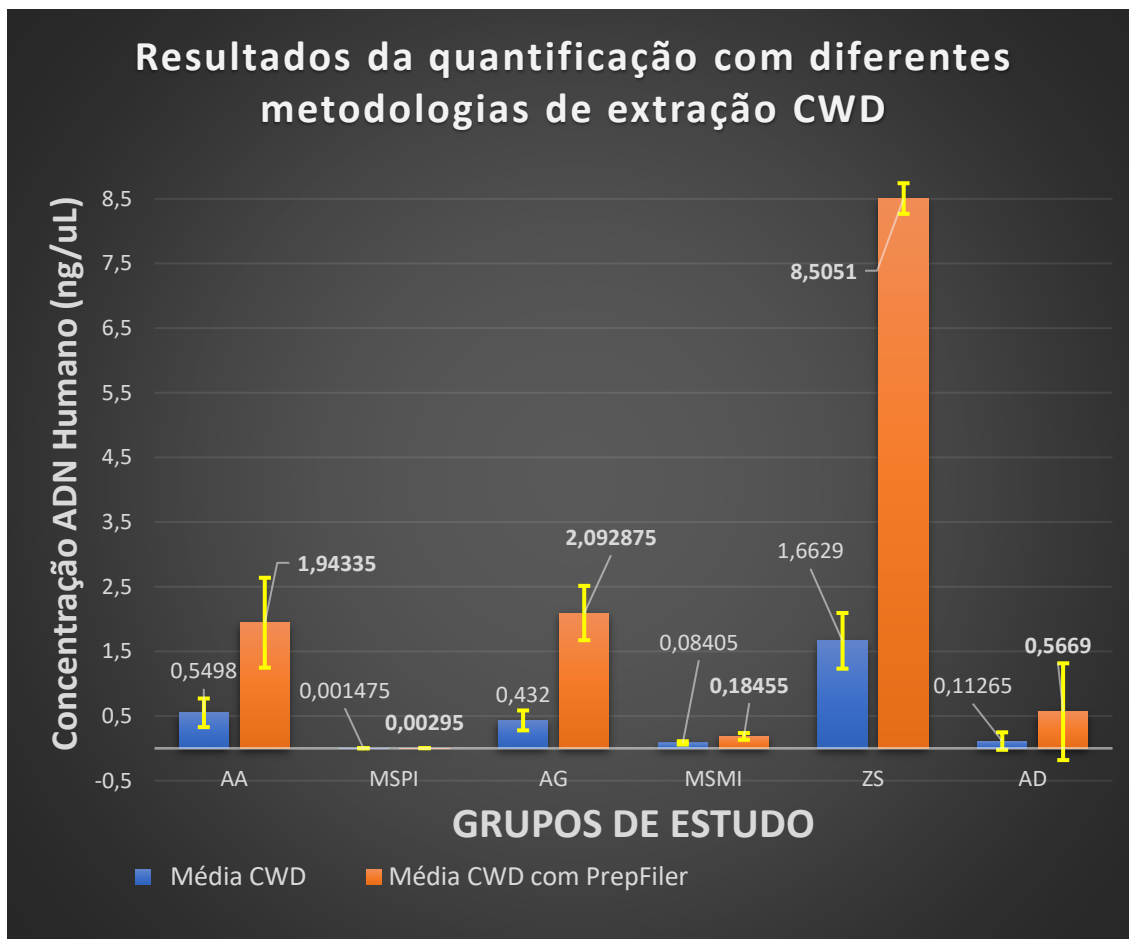


Figura 5. Comparação dos resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras extraídas com *kit CWD* e das mesmas amostras extraídas com *CWD* no *AutoMate Express™*.

A utilização do *kit PrepFiler™* no *AutoMate Express™* torna a etapa da extração mais demorada e dispendiosa. Assim procurou-se saber de que modo esta adição na metodologia beneficiava a performance de extração. Como se pode observar na Figura 4, o incremento no grupo de estudo das “MSPI” é quase nulo, enquanto o incremento das “MSMI” é mínimo (120%), estes valores já se colocam dentro da janela de amplificação. Os grupos de estudo “AA” e “AG” tiveram um incremento de 253% e 384%, respetivamente. No conjunto de amostras problema, os grupos de estudo “ZS” e “AD” tiveram um incremento de 411% e 403%, respetivamente. Os aumentos do rendimento da extração devem-se ao facto do *AutoMate Express™* captar as moléculas de ADN para as suas partículas magnéticas que posteriormente são lavadas e eluídas num volume final menor (50µL),

concentrando e purificando as amostras. Para tal acontecer é necessário que haja uma determinada quantidade inicial de ADN na amostra que faça com que a etapa de captação de ADN seja significativa, o que não acontece com as amostras do grupo “MSPI”, que mesmo que tenham aumentado a sua concentração, continua a ser numa ordem de grandeza ínfima.

4.4 Compatibilidade das amostras extraídas com CWD e purificadas com o kit PrepFiler™ e amplificadas por kit PowerPlex® Fusion 6C System para obtenção de perfis genéticos

A quantificação é uma excelente ferramenta para determinação das etapas seguintes da perícia forense, mas não garante a obtenção de perfis, visto que os *kits* e instrumentos utilizados desde a amplificação até à separação dos fragmentos por eletroforese são distintos. Logo, mesmo com informação positiva vinda da quantificação era necessário confirmar se os *buffers* poderiam ser usados com os reagentes de amplificação do *kit PowerPlex® Fusion 6C System*.

Os resultados de quantificação, o volume de amostra utilizado na amplificação e o número de marcadores presentes nos eletroferogramas obtidos através da análise das amostras encontram-se referidos na Tabela 15. Uma vez que o *kit PowerPlex® Fusion 6C System* contém 3 marcadores alélicos exclusivos do cromossoma Y, nas amostras com perfil genético feminino apenas irão ser contabilizados os marcadores comuns a ambos os géneros (24), e nas amostras com perfil genético masculino serão contabilizados todos os marcadores (27).

Tabela 15. Resultados obtidos em amostras, extraídas pelo kit Casework Direct purificadas com o kit PrepFiler™ e posteriormente amplificadas para o kit PowerPlex® Fusion 6C System (23 STRs, 3 Y-STRs e amelogenina).

Amostras	Humano (ng/μL)	Degradação	Volume de amostra na Amplificação	Resultados c/ 15'' de Injeção	Resultados c/ 40'' de Injeção
AA_CWD_PF_4	1,4647	7,182	1μL e (10 μL*)	16/27	27/27*
MSPI_CWD_PF_4	0,0044	0,8625	7,5 μL	0/24	-
AG_CWD_PF_1	2,1755	1,2026	1,0 μL	24/24	-
MSMI_CWD_PF_1	0,1194	0,8382	7,5 μL	24/24	-
ZS_CWD_PF_1	8,3377	1,1393	1,0 μL (dil 1:8)	24/24	-
AD_CWD_PF_3	0,6714	1,4117	2,0 μL	27/27	-

Nota: O “*” indica conexão entre valores/parâmetros

Após a análise da Tabela 15 é visível consistência nos resultados obtidos, com o esperado, podendo esta ser explicada pelas variações inerentes ao tipo de suporte da amostra, ao seu nível de degradação ou quantidade de ADN presente. Obtiveram-se perfis completos em todas as amostras com exceção da amostra “MSPI_CWD_PF_4”, na qual nenhum marcador foi amplificado e detetado, visto que a ordem de grandeza da sua concentração de ADN é muito baixa. A amostra “AA_CWD_PF_4” mesmo tendo quantidade ideal de ADN para poder ser amplificada com sucesso o seu nível de degradação era significativo (7,182), só sendo possível obter um perfil completo com o uso de 10µL de amostra na amplificação e posteriormente um aumento de volume de amostra injetado no capilar (4µL) e tempo de injeção de amostra de 40 segundos. Em adição, na Figura 6 estão apresentados eletroforegramas das amostras de referência e problema de alguns grupos de estudo, para ilustrar a compatibilidade e a obtenção de perfis genéticos singulares a partir de amostras extraídas com CWD, purificadas com PrepFiler™ e amplificadas com o kit PowerPlex® Fusion 6C. Através dos eletroforegramas pode-se confirmar a informação prévia que as amostras dos grupos de estudo “MSMI” e “ZS” são originárias do mesmo indivíduo, robustamente confirmado com a totalidade dos diferentes *loci* estudados. Pode-se observar, com exceção dos grupos de estudo “AA” e “MSMI” no caso de deteção de alelos, que estes têm valores de RFU elevados acima do limiar estocástico, bem como a obtenção de equilíbrio acima de 70% entre alelos presentes nos marcadores nos indivíduos heterozigóticos.

Estudo de compatibilidade química de um kit de extração: *Casework Direct Kit, Promega*

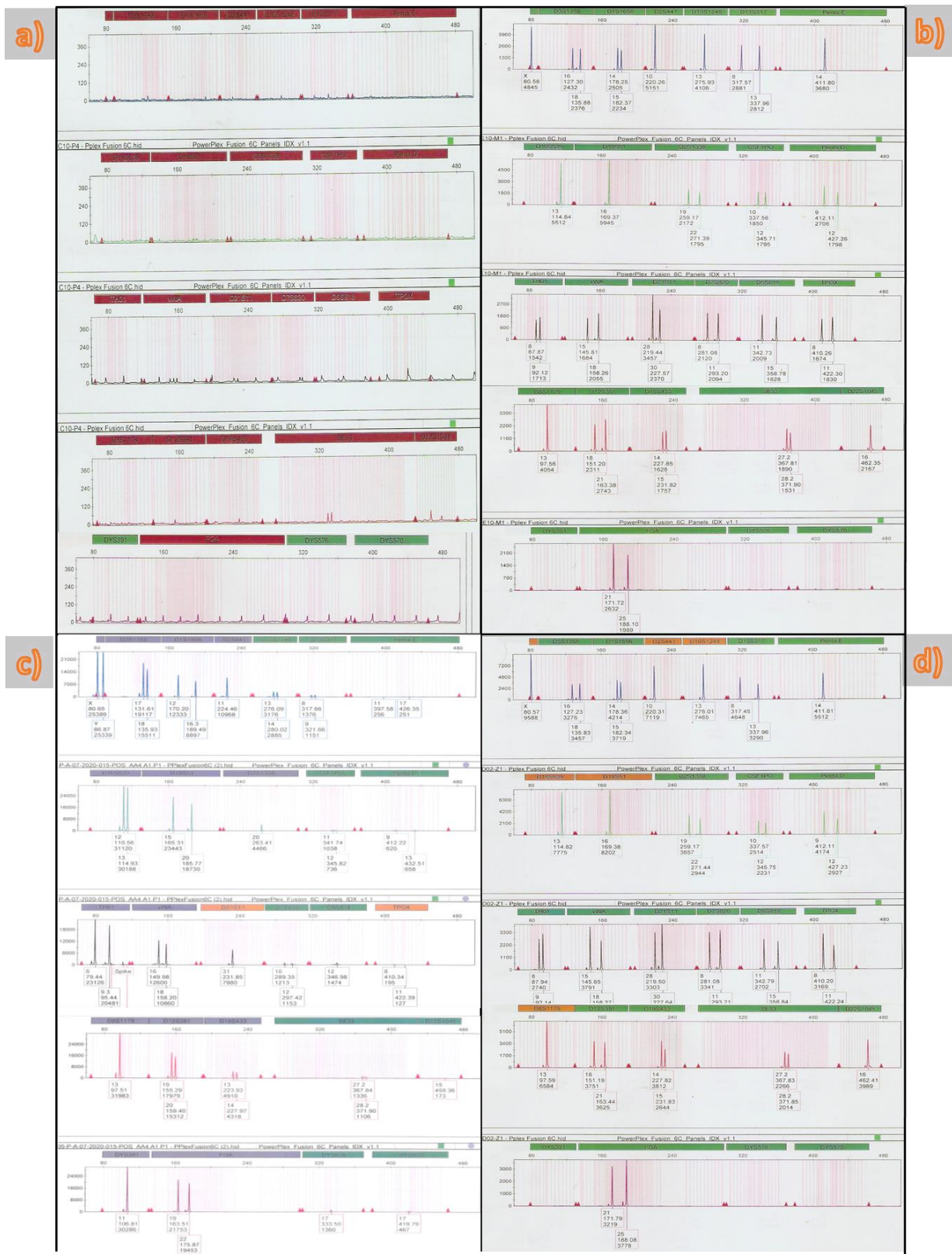


Figura 6. Perfis genéticos obtidos através de amostras extraídas por CWD e purificadas por PrepFiler™ e amplificadas por PowerPlex® Fusion 6C em amostras de referência do grupo de estudo: a) "MSPI"; b) "MSMI"; c) "AA" e de amostra problema do grupo de estudo: d) "ZS".

4.5 Comparação das amostras extraídas com o CWD e purificadas com o *PrepFiler™* com o método de extração usado na rotina do SGBF-C para amostras problema no *Automate Express™*

Esta etapa do estudo serviu para saber como o mesmo tipo de amostras interagem com o método que o SGBF-C usa como rotina. Também se avaliou os mesmos parâmetros e o seu desempenho comparado com o *kit Casework Direct* com a finalidade de descobrir a utilidade ou vantagem(s) do *CWD*.

Para as amostras de referência pode-se observar na Tabela 16 que a metodologia de quantificação é validada com um IPC médio dentro dos valores esperados. O controlo negativo a registar somente valores de IPC. Quanto às concentrações de ADN das amostras o grupo de estudo “MSPI” não apresenta valores ideais para realizar uma futura amplificação, suportando a hipótese de que se partiu de pouquíssima quantidade de material biológico para a extração. De todas as amostras o grupo de estudo “AA” é o grupo que apresenta uma maior degradação, reforçando que são amostras com alguma deterioração do seu material biológico devido ao longo tempo expostas ao meio ambiente (mesmo estando armazenadas no SGBF-C). No entanto, quando comparado com o *CWD*, a discrepância dos valores de degradação obtidos podem ser justificados ligeiramente com a variação da zona de corte do tecido e significativamente com a metodologia de extração utilizada.

Tabela 16. Resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras de referência com o *kit Prepfiler™* e *AutoMate Express™*.

Amostras	Humano (ng/μL)	Male (ng/μL)	Degradação	IPC
AA_PrepFiler_1	0,6335	1,0205	2,6407	29,5
AA_PrepFiler_2	1,6420	0	3,3499	28,4
AA_PrepFiler_3	0,3443	0	1,4087	29,5
AA_PrepFiler_4	0,0827	2,137	2,4936	30,23
MSPI_PrepFiler_1	0,0110	0	1,0850	27,3
MSPI_PrepFiler_2	0,0005	0	0,3979	30,32
MSPI_PrepFiler_3	0,0107	0	0,5512	27,32
MSPI_PrepFiler_4	0,0158	0	0,9102	28,1
AG_PrepFiler_1	5,3582	0	0,9159	28,2

AG_PrepFiler_2	6,8027	0	0,5849	28,95
AG_PrepFiler_3	4,0285	0	0,5458	30,27
AG_PrepFiler_4	5,4123	0	0,5099	29,35
MSMI_PrepFiler_1	1,4323	0	0,5986	27,46
MSMI_PrepFiler_2	1,4429	0	0,6121	27,45
MSMI_PrepFiler_3	1,7101	0	0,6941	27,11
MSMI_PrepFiler_4	2,1860	0	1,0097	26,5551
Ctrl_(-)_PrepFiler	0	0	0	28,47

Quanto às amostras problema (Tabela 17) no caso do grupo de estudo “ZS” os níveis de IPC e degradação são elevados. Isto pode ser explicado pelo facto de as zaragatoas terem em atuação ácidos húmicos em excesso, provenientes da terra, que este *kit* tem maior dificuldade em neutralizar e remover da solução do que o CWD. As amostras “AD_PrepFiler_2” e “AD_PrepFiler_4” demonstram baixa concentração de ADN com elevados níveis de degradação, suportando a explicação de que estas amostras estiveram expostas a fatores ambientais degradativos como humidade, calor, oxidação e pequenos organismos.

Tabela 17. Resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras problema com o *kit PrepFiler™* no *AutoMate Express™*.

Amostras	Humano (ng/μL)	Male (ng/μL)	Degradação	IPC
ZS_PrepFiler_1	4,2921	0	492,1405	34,55
ZS_PrepFiler_2	6,7616	0	!!!	Indeterminado
AD_PrepFiler_1	3,7246	3,8366	0,8309	28,1
AD_PrepFiler_2	0,0025	0	16,8423	27,8
AD_PrepFiler_3	0,5104	0,6224	0,8979	28,1
AD_PrepFiler_4	0,0240	0,0235	25,8695	28,02
Ctrl_(-)_PrepFiler	0	0	0	28,05

Nota: “!!!” significa que o valor de degradação é tão elevado que o software de *Quantifiler® Trio* não atribui um valor numérico.

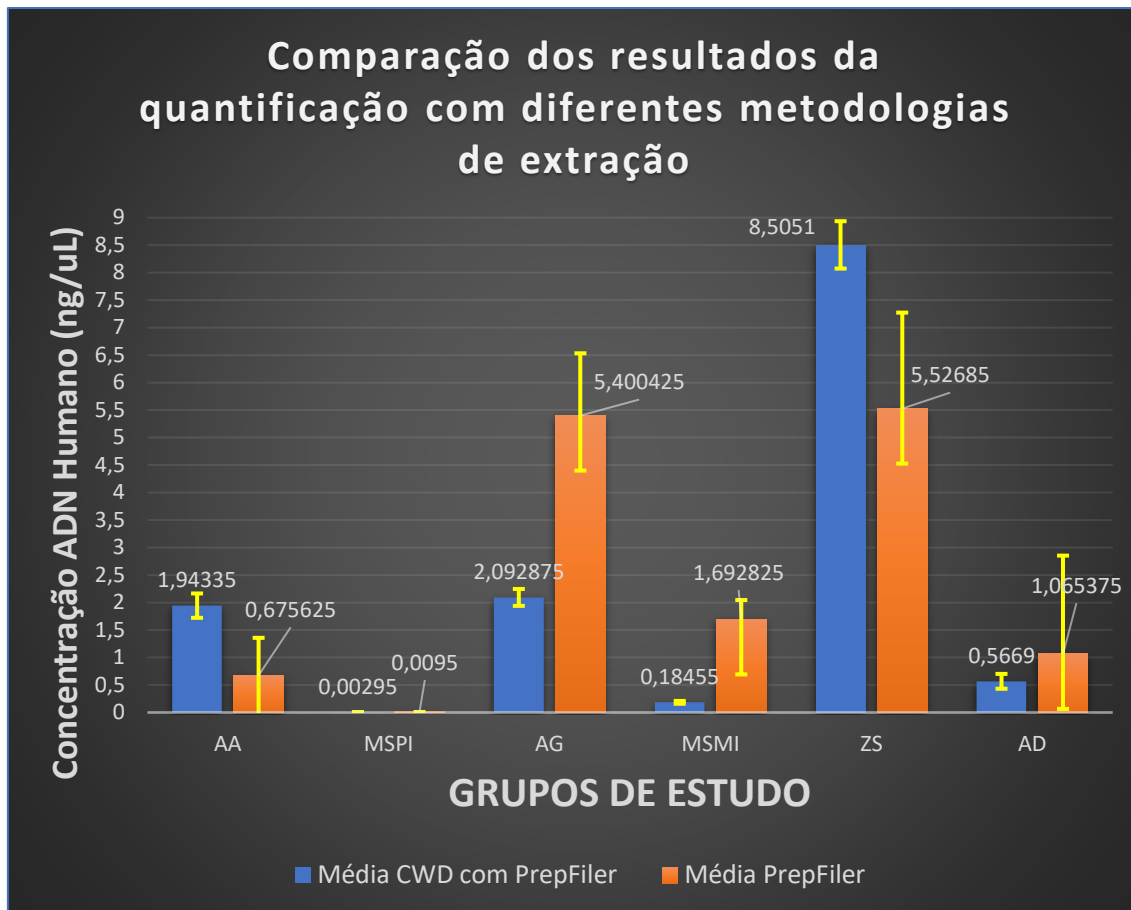


Figura 7. Comparação dos resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras extraídas com *kit PrepFiler™* e as amostras dos mesmos grupos de estudo extraídas com *kit CWD* no *AutoMate Express™*.

A Figura 7 ilustra as médias de concentração ADN humano total quantificado nos grupos de estudo que foram extraídos com o *kit PrepFiler™* que está implementado na rotina do do SGBF-C e com o *kit CWD* usando posteriormente o *AutoMate Express™* para concentrar e purificar as amostras. Esta comparação justifica-se com o facto de ambas terem uma etapa automática de purificação, logo submeteram-se ao mesmo nível de processamento de amostras problema e a etapa com o *AutoMate Express™* beneficiar as metodologias de extração.

Podemos constatar que para os grupos de estudo “AA” e “ZS” a metodologia usando o *kit CWD* apresenta maiores quantidades de ADN em solução, havendo um incremento de 188% e 54%, respetivamente, face ao método de extração implementado no SGBF-C. Isto pode ser explicado pelo desenho do *kit* que foi otimizado para produzir um lisado em pouco tempo a partir de zaragatoas e tecidos manchados, de casos criminais, que tenham pouco material biológico (Graham, E. K. et al, 2018). No entanto, mesmo

não se verificando um superior desempenho nos outros grupos de estudo, o CWD obteve concentrações viáveis para uma subsequente amplificação, tanto para as amostras de referência como para as amostras problemas, com exceção já mencionada das “MSPI” no qual nenhum dos métodos teve sucesso em obter um lisado com ADN.

4.6. Protocolo de fluxo único (sequência de metodologias): extração com CWD, teste preliminar de identificação de natureza biológica e quantificação

O objetivo dum fluxo único de uma amostra é a partir da fonte de material biológico original obter-se uma eluição total desse material e que possa ser submetida às diferentes metodologias, sequencialmente.

A Figura 8 ilustra as concentrações de ADN nas amostras dos diferentes grupos de estudo para a metodologia de extração com remoção de 100µL de volume para a realização de teste preliminar (intermédio), (TPI), e para igual metodologia sem essa remoção. Pode-se observar que mesmo com o protocolo diluído sem remoção de volume os grupos de estudo “AA” e “AG” mantêm uma concentração superior a 0,1335 ng/µL, necessária para uma amplificação com sucesso, no entanto, quando se realiza a centrifugação com descarte da coluna e a remoção do volume necessário para o teste preliminar a meio da extração, os mesmos grupos de estudo apresentam valores de concentração de ADN nas amostras muito baixos, próximos de zero. O grupo de estudo “MSPI” apresentou valores muito baixos para ambos os protocolos.

Esta avaliação demonstra uma das limitações que um fluxo único apresenta laboratorialmente, mesmo partindo duma concentração maior de material biológico, porque se processa a amostra num todo, conforme as metodologias “paralelas”, que requeiram outras moléculas que não ADN para sua análise, estas retiram volume de amostra eluída reduzindo diretamente a concentração de ADN, como é visível nos grupos de estudo “AA” e “AG”.

Neste caso, para o tempo de eluição da amostra, o volume retirado é um dos fatores que explica a redução de ADN, no entanto, o ponto crítico é o descartar da coluna, visto que, nesta está o suporte onde se encontra o material biológico, ou seja, a partir deste ponto o tubo contém uma quantidade fixa de amostra (ADN) e qualquer procedimento que retire a

esta volume tem um efeito subtrativo para a concentração de ADN existente. Quanto maior e mais vezes se retirar volume da amostra, maior será o impacto na concentração total de ADN, homogeneidade e perigo de contaminação.

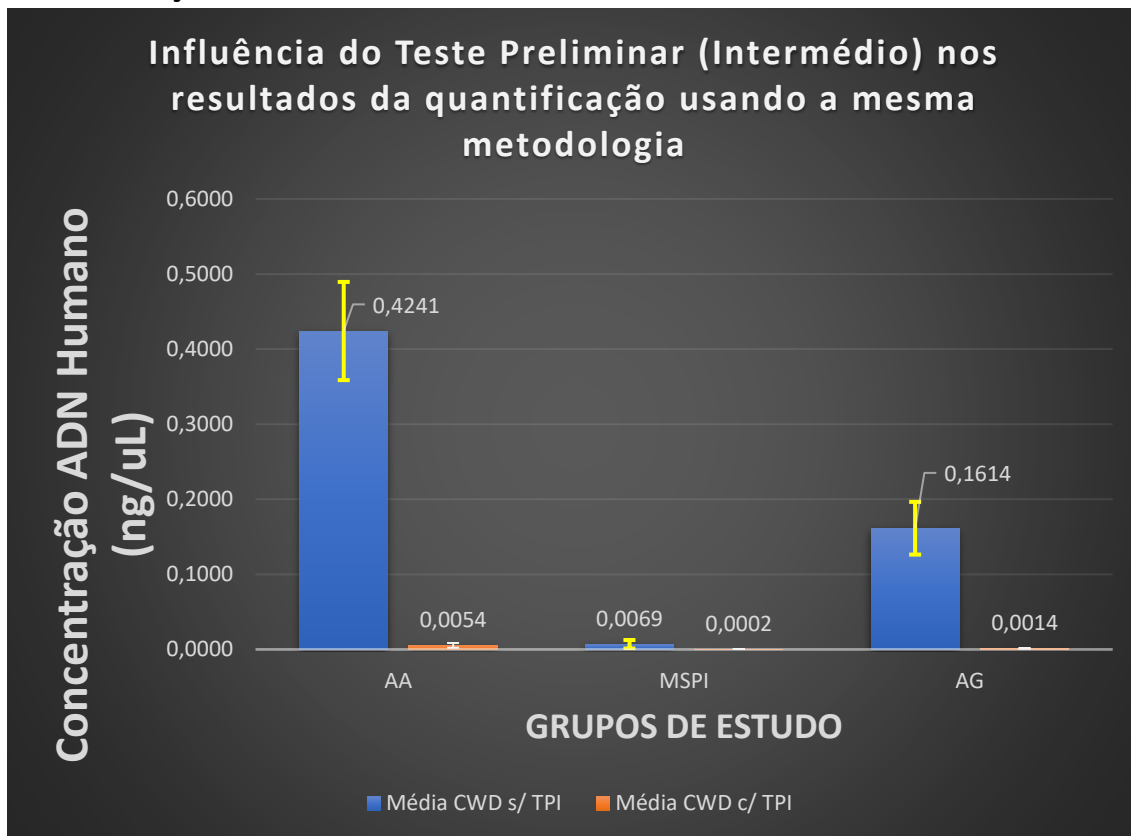


Figura 8. Comparação dos resultados da quantificação com *kit Quantifiler® Trio* das amostras extraídas com *kit PrepFiler™* com e sem retirada de volume para Teste Preliminar Intermédio (TPI) para os mesmos grupos de estudo.

5. Conclusões

A extração, sendo uma das primeiras etapas laboratoriais, tem grande peso no desenrolar de todo o processo para a obtenção de perfis genéticos com qualidade. A capacidade de expor as moléculas de ADN torna possível que todas as etapas subsequentes se tornem possíveis, em adição, a habilidade de se neutralizar fatores degradativos e inibitórios, potencia o sucesso e qualidade de todas as metodologias que a seguem, sendo necessário explorar e avaliar vários parâmetros para saber a extensão das suas funcionalidades.

Com a realização deste trabalho foi possível testar várias valências da extração com *kit Casework Direct (Promega)*, imperativas para a sua implementação na rotina do SGBF-C.

O *kit Casework Direct* indicou ter compatibilidade química com o *SERATEC® HemDirect*, quando adaptado, apresentando em todas as cassetes uma fluidez no percurso da amostra, bandas de controlo e bandas de teste positivo, no entanto, estas últimas não foram obtidas com consistência em amostras de referência, sendo necessário avaliar com profundidade a sua sensibilidade.

A compatibilidade química do *buffer* do *kit Casework Direct* com o *kit Quantifiler® Trio* demonstrou-se positiva, com obtenção de valores aceitáveis de IPC e ADN total humano, no entanto, não foi possível obter valores de concentração ideais para amostras de grupos de estudo, como amostras de sangue em papel FTA (“MSPI” e “MSMI”), o que não era esperado no caso do último grupo, podendo haver uma dificuldade do *buffer* do CWD conseguir extrair a amostra das fibras do papel. As amostras com fatores degradativos apresentaram dados inconsistentes, apresentando na maioria valores de quantificação dentro do intervalo esperado para uma boa amplificação, tendo algumas atingido valores significativos de degradação.

A mistura dos *buffers* e reagentes do *kit Casework Direct* e do *kit PrepFiler™* demonstrou-se possível, no entanto, sem o devido cuidado e análise crítica da consistência da mistura, após alguns minutos, esta pode adquirir textura que pode ser prejudicial para o bom funcionamento do equipamento automático *AutoMate Express™*. O uso desta nova mistura é compatível e apresenta uma melhoria nos resultados, havendo, na

generalidade, um incremento de desempenho de 279%, possibilitando que alguns grupos de estudo, que anteriormente não tiveram sucesso, atinjam um valor de concentração de ADN na amostra razoável.

Obteve-se compatibilidade química da mistura dos *buffers* dos 2 kits de extração *Casework Direct Kit* e do *kit PrepFiler™* com *kit* de amplificação *PowerPlex® Fusion 6C System*. Nos diferentes grupos de estudo foi possível amplificar os vários marcadores estudados e ter resultados equilibrados, exceto o grupo “MSPI” que devido à baixa quantidade de ADN não se conseguiu obter um perfil genético. O grupo “AA” só obteve um perfil genético completo e equilibrado quando amplificado com maior volume e aplicado no sequenciador automático com maior tempo de injeção.

A metodologia de mistura dos *buffers* CWD e PrepFiler™ apresentou melhorias na performance nos grupos de estudo de amostras de referência antigas (“AA”) e amostras problema de zaragatoas com sangue e terra (“ZS”), quando comparado à metodologia de extração já utilizada no SGBF-C. Os restantes grupos, à exceção de amostras de referência com sangue pouco impregnado, apresentaram concentrações de ADN ideais segundo as recomendações dos *kits* de amplificação utilizados no SGBF-C.

A utilização do CWD para a criação de um fluxo único de trabalho em amostras de referência demonstrou-se ineficaz na obtenção de uma quantidade de ADN que possa ser amplificável quando aplicado um teste preliminar (intermédio) na extração que retire volume à solução com a amostra eluída. Torna-se necessário explorar alternativas para tornar a eluição do material biológico mais robusto capaz de acautelar perdas de volume para outras metodologias sem que tenha muito impacto na concentração de ADN.

O *kit Casework Direct* revela ser uma ferramenta alternativa, com vantagens em amostras de referência como problema com uma quantidade razoável de material biológico, sem necessitar de equipamentos automáticos, que em casos mais delicados, sendo compatível, podem ser utilizados para obtenção de melhores resultados. No entanto, a sua eficácia não é consistente, estando muito dependente do êxito da fase da eluição que é variável em diferentes suportes de amostra e do próprio material. Para uma eventual implementação do *kit Casework Direct* no SGBF-C é necessário delimitar e validar a sensibilidade para os vários tipos de

suportes de amostra, bem como modificações nos parâmetros da própria extração para solucionar eventuais insucessos.

6. Referências Bibliográficas

Applied Biosystems (2010). Manual do 7500 Real-Time PCR System. Disponível em <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4387783c.pdf>. [Acedido 7-03-2020]

Applied Biosystems. (2012). GeneMapper® ID-X Software Version 1.4

Applied Biosystems (2014). Manual do kit *Quantifiler® Trio* DNA Quantification. Disponível em <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4485354.pdf>. [Acedido 7-03-2020]

Applied Biosystems. (2016). HID Real-Time PCR Analysis Software

Applied Biosystems. (2017a). AutoMate Express™ Instrument - User Guide for use with: PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit.

Applied Biosystems. (2017b). PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits for use with: AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System.

Applied Biosystems. (2017c). Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits - User Guide.

Bregu, J., Conklin, D., Coronado, E., Terrill, M., Cotton, R. W., Grgicak, C. M. (2013). Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J Forensic Sci*, 58(1), 120-129.

Butler, J. M. (2010). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Academic Press, Elsevier.

Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press, Elsevier

Butler, J. M. (2015). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Academic Press, Elsevier.

Corte-Real, F., Vieira, D. N. (2015). *Princípios de Genética Forense*. Imprensa da Universidade de Coimbra.

Edwards, M. C., Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl*, 3(4), S65-75.

ENFSI. (2010). Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process.

Federal Bureau of Investigation (2020). Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories. Disponível em https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_d73afdd0007c4ed6a0e7e2ffbd6c4eb8.pdf. [Acedido 20-07-2020].

Graham, E. K., Loten, M., Tompson, J. M., Drobac, J. & Gopalakrishnan, A. (2018). Developmental validation of the Casework Direct Kit, Custom: a method for the rapid processing of casework samples, Disponível em <https://www.promega.com/-/media/files/resources/white-papers/wp108.pdf>. [Acedido 20-11-2019]

Harbison, S., and R. Fleming. (2016) "Forensic body fluid identification: state of the art." *Res Rep Forensic Med Sci* 6.2016: 11-23.

Hares, D. R. (2012). Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci Int Genet*, 6(1), e52-54.

Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Brown, A. L., Budowle, B. (2001). Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *J Forensic Sci*, 46(3), 661-676.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.

Promega. (2016). PowerPlex® Fusion 6C System - Technical Manual.

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação do Centro (2018). Instrução: Prevenção da Contaminação na fase pré-PCR (I-SGBF-C-014).

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação do Centro (2018). Instrução Técnica: *SERATEC*® HemDirect (IT-SGBF-C-010)

SWGAM (2016) Scientific Working Group on DNA Analysis Methods Recommendations for the efficient DNA processing of sexual assault evidence *kits*. Disponível em https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_4daf2bb5512b4e2582f895c4a133a0ed.pdf. [Acedido 20-07-2020]

SWGAM. (2017). SWGAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. Disponível em https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_50e2749756a242528e6285a5bb478f4c.pdf [Acedido 21-07-2020]

The Council of the European Union. (2009). Council Resolution of 30 November 2009 on the exchange of DNA analysis results (2009/C 296/01) .

Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., Montagna, P.: Quantifiler® Trio *Kit* and forensic samples management: A matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 16: 77 –85.