

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Estágio na área das Ciências Forenses na Delegação do Sul do Instituto Nacional de
Medicina Legal e Ciências Forenses

Ana Rita Monte Amador das Dores

Orientadora: Professora Doutora Carina Ladeira - Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa

Orientadora: Professora Mestre Cláudia Vieira Silva - Instituto Nacional de Medicina
Legal e Ciências Forenses

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2024

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Estágio na área das Ciências Forenses na Delegação do Sul do Instituto Nacional de
Medicina Legal e Ciências Forenses

Ana Rita Monte Amador das Dores

Orientadora: Professora Doutora Carina Ladeira - Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa

Orientadora: Professora Mestre Cláudia Vieira Silva - Instituto Nacional de Medicina
Legal e Ciências Forenses

Júri:

Presidente: Professor Mário Maia Matos - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de
Lisboa

Vogal (Arguente): Professora Doutora Ana Mónica Carvalho - Instituto Nacional de
Medicina Legal e Ciências Forenses

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais
(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2024

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam e apoiaram ao longo deste percurso académico.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu namorado, Pedro Castro, cujo apoio foi indispensável para que eu chegasse até aqui. A sua paciência, apoio emocional e presença constante nos momentos mais difíceis foram fundamentais, especialmente quando eu duvidava da minha própria capacidade. Agradeço-lhe por acreditar em mim, mesmo quando eu não conseguia.

Aos meus pais, expresso a minha profunda gratidão pelo apoio incondicional e pela confiança que sempre depositaram em mim, possibilitando-me alcançar os meus objetivos e acreditando nas minhas capacidades.

Agradeço igualmente aos colaboradores do INMLCF, em especial aos profissionais do Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Sul, em Lisboa, cujo acolhimento e apoio durante o estágio foram essenciais para o sucesso desta experiência, contribuindo significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de reconhecer o apoio inestimável da minha orientadora, Professora Cláudia Silva, por ter acreditado desde o início que este relatório seria possível. As suas valiosas dicas, conselhos e constante disponibilidade foram cruciais para a realização deste trabalho.

Agradeço igualmente à minha orientadora, Carina Ladeira, pela atenção e disponibilidade demonstradas ao longo do estágio.

À Professora Ana Ramos, expresso a minha gratidão por facilitar a comunicação com o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) e por me proporcionar a oportunidade de realizar este estágio.

Por fim, agradeço ao INMLCF, por me ter aceitado como estagiária e proporcionado uma experiência enriquecedora que certamente marcará positivamente a minha formação.

Resumo

O presente relatório de estágio detalha as atividades realizadas e as técnicas aplicadas durante o estágio no serviço de Genética Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Sul, em Lisboa, no âmbito do mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais. Este estágio proporcionou uma experiência prática na aplicação de técnicas de genética molecular no contexto forense, consolidando os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado e desenvolvendo competências essenciais para a atuação na área da Genética Forense.

As atividades laboratoriais incluíram a extração e quantificação de ADN, amplificação por PCR, eletroforese e análise de perfis genéticos, utilizando kits específicos, equipamentos avançados e *softwares* de análise genética. A observação das práticas realizadas em contexto laboratorial forense permitiu ainda a consolidação dos conhecimentos adquiridos, realçando a importância da área para fundamentar as decisões tomadas nas investigações criminais.

A aquisição de competências técnicas e analíticas foi fundamental para a aplicação dos conhecimentos em contextos práticos, destacando a importância do papel do perito em genética forense no sistema de justiça. Este relatório demonstra uma formação abrangente e prática, refletindo as atividades realizadas no estágio e os objetivos do mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais.

Palavras-chave: ADN; Estágio; Genética Forense; INMLCF; Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Abstract

The present internship report details the activities carried out and the techniques applied during the internship at the Forensic Genetics service of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, South Delegation, in Lisbon, within the scope of the master's degree in Clinical Laboratory Technologies. This internship provided practical experience in the application of molecular genetics techniques in a forensic context, consolidating the theoretical knowledge acquired throughout the master's program and developing essential skills for working in the field of Forensic Genetics.

The laboratory activities included DNA extraction and quantification, PCR amplification, electrophoresis, and genetic profile analysis, using specific kits, advanced equipment, and genetic analysis software. Observing practices performed in the forensic laboratory context further consolidated the acquired knowledge, highlighting the importance of the field in underpinning decisions made in criminal investigations.

The acquisition of technical and analytical skills was fundamental for the application of knowledge in practical contexts, emphasizing the importance of the role of the forensic genetics expert in the justice system. This report demonstrates comprehensive and practical training, reflecting the activities carried out during the internship and the objectives of the master's degree in Clinical Laboratory Technologies.

Keywords: DNA; Internship; Forensic Genetics; INMLCF; Clinical-Laboratory Technologies

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Objetivos | 2 |
| 1.2. Estrutura do Relatório de Estágio | 3 |
| 2. Organização da Instituição | 5 |
| 2.1. História do INMLCF | 5 |
| 2.2. Organização do INMLCF | 6 |
| 2.3. Serviço de Genética e Biologia Forenses | 7 |
| 2.4. Qualificação dos colaboradores | 9 |
| 2.5. Controlo de Qualidade no SGBF | 10 |
| 2.6. Validação de Métodos Forenses..... | 11 |
| 2.7. Cadeia de Custódia | 13 |
| 3. A importância do ADN na genética forense | 15 |
| 3.1. História da Genética Forense | 15 |
| 3.2. Ácido Desoxirribonucleico | 17 |
| 3.3. Análise de marcadores STR em Contexto Forense | 18 |
| 3.4. Importância do cromossoma Y | 21 |
| 4. Provas de orientação | 23 |
| 4.1. Detecção de saliva | 24 |
| 4.2. Detecção de sangue | 24 |
| 4.3. Detecção de sémen | 26 |
| 5. Técnicas de Análise de ADN | 27 |
| 5.1. Método de Chelex-100 | 27 |
| 5.2. Método de PrepFiler™ Express..... | 28 |
| 5.3. Quantificação de ADN através do Quantifiler® Trio | 30 |
| 5.4. Amplificação por PCR | 32 |
| 5.5. Eletroforese Capilar..... | 34 |
| 5.6. Kit PowerPlex ® Fusion 6C System..... | 36 |
| 5.7. Kit Yfiler™ Plus | 37 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.8. | Kit Investigator ® Argus Y-28 QS..... | 38 |
| 6. | Metodologia prática aplicada..... | 41 |
| 6.1. | Extração de ADN pelo método de Chelex ® 100 | 41 |
| 6.2. | Extração de ADN pelo método de PrepFiler™ Express..... | 42 |
| 6.3. | Amostras quantificadas através do Quantifiler® Trio (Applied Biosystems) . | 43 |
| 6.4. | Procedimento do Kit PowerPlex ® Fusion 6C System (Promega) | 44 |
| 6.5. | Procedimento do kit Yfiler™ Plus (Applied Biosystems™)..... | 46 |
| 6.6. | Procedimento do kit Investigator ® Argus Y-28 QS..... | 48 |
| 6.7. | Validação do Kit Investigator ® Argus Y-28 QS..... | 49 |
| 6.7.1. | Análise da Sensibilidade (Avaliação indireta)..... | 52 |
| 6.7.2. | Especificidade (Avaliação indireta) | 53 |
| 6.7.3. | Comparação com o kit Yfiler™ Plus – Applied Biosystems (Avaliação direta) 53 | |
| 7. | Considerações finais..... | 55 |
| 8. | Referências bibliográficas | 57 |
| 9. | Anexos | 65 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 6.1 Programa do termociclador adequado ao kit PowerPlex® Fusion 6C System (Adaptado de Promega Corporation (2023))..... | 45 |
| Tabela 6.2 Programa do termociclador (Adaptado de Promega Corporation (2023) ... | 46 |
| Tabela 6.3 Programa do termociclador adequado ao kit Yfiler™ Plus (Adaptado de Thermo Fisher Scientific Inc. (2019))..... | 47 |
| Tabela 6.4 Programa do termociclador (Adaptado de Thermo Fisher Scientific Inc. (2019))..... | 47 |
| Tabela 6.5 Programa do termociclador adequado ao kit Investigator® Argus Y-28 QS. Adaptado de QIAGEN (2022) | 48 |
| Tabela 6.6 Programa do termociclador Adaptado de QIAGEN (2022) | 49 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 3.1 Etapas para Obtenção de Perfil de ADN em Investigação Criminal. (Adaptada do livro “An Introduction to Forensic Genetics” (2011a, p. 3)) | 16 |
| Figura 3.2 Etapas para obtenção de perfis genéticos até à elaboração de relatório pericial nos processos de investigação de parentesco..... | 16 |
| Figura 3.3 Posição dos Y-STR ao longo do cromossoma Y. Fonte: Ali Almahasneh et al. (2018)..... | 22 |
| Figura 4.1 Teste de Seratec® HemDirect. Adaptado de Seratec (2009)..... | 26 |
| Figura 5.1 Gráfico de amplificação por RT-PCR mostrando a fluorescência normalizada (ΔR_n) ao longo dos ciclos de PCR. As curvas representam a amplificação de diferentes tipos de DNA: masculino (“MALE DNA”), fragmentos grandes (“LARGE DNA”), fragmentos pequenos (“SMALL DNA”)..... | 32 |
| Figura 5.2 Representação do funcionamento da PCR. Fonte: Smith (2024). https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction | 33 |
| Figura 5.3 Kit Investigator® Argus Y-28 QS. Fonte: https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/investigator-solutions/investigator-argus-y-28-qs-kit?catno=383625 | 38 |
| Figura 6.1 Representação do procedimento de chelex-100. Adaptado do livro “Tratado de Medicina Legal – Criminalística Biológica” (2022)..... | 41 |
| Figura 6.2 Representação do método de extração. Adaptado do livro “Tratado de Medicina Legal – Criminalística Biológica” (2022)..... | 42 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------|---|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| CCD | <i>Charge-Coupled Device</i> (Dispositivo de Acoplamento de Carga) |
| CODIS | <i>Combined DNA Index System</i> (Sistema de Índice Combinado de ADN) |
| ESS | <i>European Standard Set</i> |
| FBI | <i>Federal Bureau of Investigation</i> (Agência Federal de Investigação) |
| FSS | Serviço de Ciência Forense |
| GMLF | Gabinete Médico-Legal e Forense |
| INMLCF | Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses |
| INDEL | Regiões de Inserção e Deleção |
| IPC | Controlo Interno de PCR |
| LAT | <i>Large Autosomal Target</i> |
| MRC | Materiais de Referência |
| NTC | <i>Non-Template Control</i> |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PSA | <i>Prostate-Specific Antigen</i> (Antigénio Específico da Próstata) |
| QS1 | Sensor de Qualidade 1 |
| QS2 | Sensor de Qualidade 2 |
| RFID | <i>Radio Frequency Identification</i> (Identificação por Radiofrequência) |
| RM-YSTR | Y-STR de mutação rápida |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RFLP | Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição |
| SAT | <i>Short Autosomal Target</i> |
| SGBF-S | Serviço de Genética e Biologia Forenses - Sul |
| SNP | Polimorfismos de Nucleotídeo Único |
| SOP | Procedimentos Operacionais Padrão |
| STR | Sequências Repetidas Curtas |
| VNTR | Número Variável de Repetições em Tandem |

1. Introdução

O presente relatório de estágio documenta a experiência adquirida ao longo de 600 horas no Serviço de Biologia e Genética Forenses da Delegação do Sul (SGBF-S) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), realizado no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa - Instituto Politécnico de Lisboa (ESTeSL-IPL). O estágio visou desenvolver competências técnicas e práticas na área das tecnologias clínico-laboratoriais, com especial foco na análise forense. As atividades realizadas proporcionaram uma compreensão detalhada dos procedimentos e protocolos aplicados na prática diária de um laboratório forense, sob a orientação de profissionais experientes.

O INMLCF é uma instituição pública de grande relevância em Portugal, que presta serviços médico-legais e forenses essenciais ao funcionamento do sistema de justiça. Com sede em Coimbra e delegações no Porto, Coimbra e Lisboa, o instituto dispõe de uma rede nacional de 27 Gabinetes Médico-Legais e Forenses (GMLFs) organizados em diversas unidades, incluindo os Serviços de Clínica e Patologia Forenses, e os Laboratórios de Genética e Biologia Forenses e de Química e Toxicologia Forenses.

A relevância do INMLCF estende-se para além da assistência técnica, contribuindo substancialmente para a administração da justiça ao assegurar que as decisões judiciais sejam baseadas em provas científicas rigorosas. Como principal entidade responsável pelas perícias médico-legais e forenses em Portugal, o INMLCF garante a integridade das investigações criminais e protege os direitos humanos. A colaboração do INMLCF com entidades internacionais reforça a posição de Portugal no cenário global da medicina legal e, ao liderar projetos científicos para aprimorar técnicas e procedimentos, promovendo investigação e formação, mantém-se na vanguarda da investigação forense e fortalece a confiança pública no sistema judicial.

O SGBF-S do INMLCF realiza perícias e exames de identificação genética, incluindo testes de parentesco e análises criminalísticas biológicas, além de oferecer assessoria técnico-científica. Durante o estágio neste serviço, foram realizadas diversas atividades, incluindo a receção e catalogação de amostras destinadas ao banco de dados de ADN, bem como de manchas de sangue provenientes de autópsias e investigações criminais, assegurando a sua integridade para análises subsequentes. Foram efetuadas extrações de ADN de amostras antigas e preparadas amostras para amplificação de ADN por PCR, além de se prestar apoio na aplicação de testes para deteção de sangue e sémen em

vestígios forenses e na observação de vestígios. Adicionalmente, observaram-se procedimentos técnicos de manutenção de equipamentos laboratoriais, garantindo a precisão dos resultados obtidos.

Assim, o estágio proporcionou uma experiência completa e enriquecedora, focada no desenvolvimento de competências práticas e teóricas fundamentais no campo das tecnologias clínico-laboratoriais e forenses. Sob a supervisão de profissionais experientes, foi possível adquirir uma visão detalhada das atividades do SGBF-S, complementada por um estudo aprofundado de protocolos laboratoriais e técnicas. Esta abordagem integrada permitiu consolidar os conhecimentos teóricos e compreender as bases científicas dos procedimentos realizados, preparando para a superação de desafios futuros na área.

1.1. Objetivos

O estágio no SGBF-S do INMLCF, em Lisboa, tem como propósito proporcionar uma experiência prática e aprofundada na aplicação de técnicas de genética molecular no contexto forense. Este estágio visa consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos durante o curso de mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais e desenvolver competências específicas necessárias para atuar na área da Genética Forense.

Durante o estágio, é essencial integrar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado com a prática laboratorial, compreendendo a aplicação de diferentes metodologias e técnicas de genética forense. Esta integração permite a aquisição de experiência prática na execução de procedimentos laboratoriais essenciais, como a extração de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), eletroforese e análise de perfis genéticos.

Além disso, o desenvolvimento de competências técnicas e analíticas é fundamental, incluindo a operação de equipamentos laboratoriais avançados e a utilização de *softwares* de análise genética, bem como a capacidade de interpretar resultados laboratoriais.

A aplicação de conhecimentos em contextos reais de investigação forense permite participar ativamente em investigações forenses, contribuindo para a resolução de casos através da análise genética. Esta experiência é crucial para compreender o papel do perito em genética forense no sistema de justiça, bem como a importância da ética e da precisão científica nas investigações criminais.

O domínio das técnicas de extração e quantificação de ADN é uma das competências a desenvolver, através da execução de procedimentos em amostras biológicas, como sangue e saliva, e, no caso da quantificação, com recurso a técnicas como o PCR em tempo real. A amplificação de *loci* específicos de ADN por PCR e a análise dos perfis genéticos obtidos por eletroforese capilar são etapas essenciais, incluindo a interpretação de perfis de *Short Tandem Repeat* (STR) para identificação individual.

A participação na validação de métodos laboratoriais permite aplicar os critérios de qualidade essenciais para a credibilidade dos resultados forenses e a integridade do sistema de justiça, garantindo a robustez, reprodutibilidade e precisão dos procedimentos. Este processo destaca a importância da padronização e do cumprimento das diretrizes estabelecidas, sendo igualmente crucial a documentação e o reporte dos processos de validação em conformidade com os *standards* internacionais de acreditação laboratorial.

Por fim, é indispensável compreender e aplicar os princípios legais e éticos que regem a prática da genética forense, com especial atenção à proteção de dados pessoais e à confidencialidade dos resultados.

Através destas atividades e aprendizagens, pretende-se desenvolver uma formação completa e abrangente, capacitando para atuar de forma competente e ética no campo da genética forense.

1.2. Estrutura do Relatório de Estágio

O presente relatório está estruturado em várias secções que abordam diferentes aspetos do estágio e das áreas de atuação do INMLCF. A Introdução apresenta uma visão geral do estágio, seguida dos objetivos definidos para o estágio e da estrutura do trabalho. O capítulo dois foca-se na organização da instituição, incluindo a história do INMLCF, a sua estrutura organizacional, o Serviço de Genética e Biologia Forenses e o seu controlo de qualidade, a cadeia de custódia e a qualificação dos colaboradores.

A importância do ADN na genética forense é discutida no capítulo três, abrangendo a história da genética forense, a relevância do cromossoma Y e a análise de marcadores STR em contextos forenses. O capítulo quatro aborda as provas de orientação, incluindo métodos de deteção de saliva, sangue e sémen. O capítulo cinco foca-se nas técnicas de análise de ADN, descrevendo métodos de extração, quantificação, amplificação por PCR, eletroforese capilar e a utilização de diversos kits de análise forense. A metodologia prática aplicada, capítulo seis, descreve os procedimentos laboratoriais

realizados durante o estágio, como extrações de ADN, utilização de kits específicos e a validação de métodos forenses. O trabalho conclui com as considerações finais, que resumem as principais conclusões e reflexões sobre o estágio.

2. Organização da Instituição

2.1. História do INMLCF

O INMLCF de Portugal, entidade central na prática forense do país, possui uma história rica e uma evolução marcada por importantes marcos.

As primeiras instituições forenses públicas em Portugal, conhecidas como morgues, foram criadas em 1899 nas cidades do Porto, Coimbra e Lisboa, operando em conjunto com as Escolas Médicas. Estas surgiram em resposta a reivindicações de sociedades científicas e da imprensa da época e tinham como principal propósito realizar autópsias, exames clínicos médico-legais e variados testes laboratoriais (Marques, 2022; Vieira, 2012).

A partir de 1918, estas morgues passaram a ser designadas como Institutos de Medicina Legal (IML) do Porto, Coimbra e Lisboa, abrangendo todas as áreas de intervenção forense e desenvolvendo diversos domínios da prática médico-legal e forense (Marques, 2022; Vieira, 2012).

Em 1960, algumas dessas áreas foram transferidas para o recém-criado Laboratório de Polícia Científica (LPC), sob a responsabilidade da Polícia Judiciária (PJ), o que representou um avanço significativo na especialização e eficiência dos processos forenses em Portugal. O LPC assumiu responsabilidades em áreas como a análise de documentos, balística e exames físico-químicos, enquanto os Institutos de Medicina Legal mantiveram a sua competência em patologia forense, medicina clínica forense, genética forense e toxicologia forense (Marques, 2022; Vieira, 2012).

No final do século XX, reconhecendo a necessidade de otimizar os recursos técnicos e humanos disponíveis, bem como a importância de uma coordenação unificada da atividade forense em Portugal, o governo decidiu proceder a uma profunda reestruturação do sistema médico-legal. Assim, no início do milénio, os Institutos de Medicina Legal de Lisboa, Porto e Coimbra foram dissolvidos e unificados num único organismo, o 'Instituto Nacional de Medicina Legal' (Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de março, 2001; Marques, 2022; Vieira, 2009).

O sucesso alcançado e o seu crescente reconhecimento a nível nacional e internacional conduziram, 11 anos mais tarde, à expansão e reforço das suas competências, culminando na alteração da sua designação para 'Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses', segundo o Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de Julho (2012). Esta

mudança reflete não apenas uma expansão nas áreas de atuação, mas também um compromisso com a integração e a inovação nas ciências forenses (Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho, 2012; Vieira, 2009).

Este instituto desempenha um papel crucial na prestação de serviços médico-legais e forenses, na coordenação de investigação e formação na área da medicina legal e outras ciências forenses, e na supervisão e orientação das atividades dos seus departamentos e especialistas. A sua missão e funções são fundamentais para o apoio ao sistema de justiça em Portugal, garantindo a aplicação de conhecimentos especializados em contextos legais e judiciais (Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho, 2012; Vieira, 2009).

2.2. Organização do INMLCF

O INMLCF, entidade pública com autonomia administrativa e financeira sob a tutela do Ministério da Justiça, possui atualmente jurisdição em todo o território nacional a partir da sua sede em Coimbra e opera através de delegações regionais no Porto, Coimbra e Lisboa, que cobrem o Norte, Centro e Sul do país, respetivamente, complementadas por uma rede de 27 GMLFs (Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho, 2012). Configura-se como um laboratório do Estado, onde a definição das orientações estratégicas e o acompanhamento da execução são responsabilidades partilhadas com o Governo, particularmente com o ministro encarregado das áreas de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior.

Todas as unidades estão subordinadas a uma estrutura de supervisão composta pelo Fiscal Único, pelo Conselho Médico-Legal, pelo Conselho Diretivo, que inclui o Presidente, o Vice-Presidente e dois vogais, e pela Comissão de Ética. Estes órgãos asseguram a conformidade com as normas legais e éticas, garantindo a eficiência e integridade das operações realizadas em cada unidade (Dario & Silva, 2019). A cada delegação estão associados vários GMLFs, distribuídos por diversas cidades, conforme as necessidades das respetivas comarcas e a pressão populacional. A delegação do Sul realiza perícias forenses para as comarcas da Amadora, Lisboa e Loures, e supervisiona os GMLFs que cobrem a Península de Setúbal, Alto Alentejo, Baixo Alentejo e Alentejo Central, Sotavento e Barlavento Algarvio, Alentejo Litoral, Lezíria do Tejo, zona Oeste (Torres Vedras), e a Grande Lisboa Norte (Vila Franca de Xira) e Noroeste (Cascais) (Dario & Silva, 2019).

Cada delegação organiza-se internamente em várias unidades: o Gabinete de Administração, que gere os aspetos administrativos e operacionais; o Serviço de Clínica e Patologia Forenses, subdividido na Unidade de Clínica Forense, responsável pela avaliação médico-legal, e na Unidade de Patologia Forense, que realiza autópsias e investigações *post-mortem*; o Serviço de Genética e Biologia Forenses, encarregado da análise de evidências biológicas e genéticas; e o Laboratório de Química e Toxicologia Forenses, que se dedica à análise de substâncias químicas e tóxicas em amostras biológicas e não biológicas (Dario & Silva, 2019).

Além das delegações, o INMLCF dispõe de serviços centrais organizados em departamentos que incluem Administração Geral, Investigação, Formação e Documentação, bem como serviços especializados como Genética e Biologia Forenses, Química e Toxicologia Forenses, e Tecnologias Forenses e Criminalística. Estes departamentos são regulados pela Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro (2013), que define as competências específicas de cada divisão.

A missão do INMLCF envolve a prestação de serviços periciais médico-legais e forenses, coordenação científica das atividades de medicina legal e outras ciências forenses, promoção de formação e investigação na área, e supervisão da atividade dos serviços médico-legais e dos profissionais na área pericial. Especificamente, o SGBF-S desempenha um papel crucial na realização de perícias e exames de identificação genética a nível nacional, apoiando as delegações e GMLFs, e prestando assessoria técnico-científica no seu âmbito de competência (Dario & Silva, 2019; Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho, 2012).

2.3. Serviço de Genética e Biologia Forenses

O Serviço de Genética e Biologia Forenses, conforme delineado no artigo 5.º da Portaria n.º 19/2013, de 21 de Janeiro (2013), tem como função principal a realização de perícias e exames de identificação genética em Portugal. Este serviço é responsável por testes de investigação biológica de parentesco, identificação individual e análises em criminalística biológica, essenciais em diversos contextos judiciais e de investigação criminal.

Além da execução destes exames, este serviço desempenha um papel consultivo, emitindo pareceres e prestando assessoria técnico-científica dentro do seu domínio de competência, o que sublinha a sua relevância não apenas na prática operacional, mas também na contribuição para decisões fundamentadas em evidências genéticas e biológicas.

O artigo 5.º da Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro (2013) também destaca a capacidade deste serviço para estabelecer unidades operativas em diferentes delegações, além da sua localização central. Esta disposição facilita a disponibilização dos seus serviços e recursos a nível nacional, garantindo acessibilidade e eficiência na resposta às necessidades.

No que concerne especificamente o SGBF-S, este encontra-se dividido em quatro setores de modo a assegurar a precisão e eficiência nos processos de análise forense, sendo eles o Secretariado, o Setor de Receção de Amostras, o Setor de Perícias de Parentesco Biológico e o Setor de Perícias de Criminalística Biológica e Identificação Individual.

No Secretariado, as responsabilidades abrangem o atendimento ao público e o processamento de todo o expediente interno e externo. Este setor assegura o envio e arquivo de documentação crucial como autos de colheita, amostras, ofícios, relatórios de perícias e faturação, em colaboração com outras unidades administrativas. Além disso, este setor tem o papel de diligenciar pela obtenção de documentos em falta e pelo esclarecimento de dúvidas que possam impactar as operações do SGBF-S, assim como o encaminhamento de requisições para aprovisionamento e receção de encomendas.

O Sector de Receção de Amostras é essencial para a gestão inicial das amostras e documentos recebidos e divide-se em duas equipas distintas. A Equipa I foca-se na identificação dos intervenientes e na colheita das amostras requeridas nos processos em curso, garantindo que todos os materiais biológicos são corretamente recolhidos e identificados. Paralelamente, a Equipa II é responsável pela receção e registo das amostras que chegam ao serviço, assegurando que a documentação está completa e que as amostras são adequadamente armazenadas para análises subsequentes.

No Sector de Perícias de Parentesco Biológico, encontram-se três equipas especializadas, cada uma desempenhando funções críticas no processo de análise de parentesco. A Equipa III dedica-se à extração de amostras de referência em processos de Investigação de Paternidade. A Equipa IV prossegue com a amplificação de ADN nuclear por técnicas como PCR e RT-PCR, aplicando e analisando o produto amplificado para garantir resultados precisos. A Equipa V, por sua vez, concentra-se na avaliação e interpretação dos resultados através de cálculos estatísticos complexos, fundamentais para as conclusões dos relatórios de parentesco.

Similarmente, o Sector de Perícias de Criminalística Biológica e Identificação Individual também é organizado em subsectores com tarefas específicas. A Equipa VI é encarregue da extração de amostras problema em processos criminais e de identificação, enquanto a Equipa VII realiza a amplificação de ADN nuclear, crucial para a análise subsequente, aplica o produto amplificado e subsequentemente analisa os resultados obtidos de processos criminais e de identificação. A Equipa VIII avalia os resultados obtidos e elabora relatórios detalhados que servem de base para ações legais e decisões judiciais. Finalmente, a Equipa IX especializa-se na amplificação e sequenciação de ADN mitocondrial, uma técnica essencial para casos onde o ADN nuclear não está disponível ou é insuficiente.

Além destas funções específicas, o SGBF-S está igualmente envolvido no desenvolvimento de projetos científicos que visam não apenas aprimorar as técnicas e procedimentos existentes, mas também servir as necessidades dos seus clientes e parceiros, reforçando assim a sua posição como um centro de excelência em ciências forenses (Dario & Silva, 2019).

2.4. Qualificação dos colaboradores

Segundo o Procedimento de Gestão de Pessoal do Serviço de Genética do INMLCF (2023) a qualificação dos colaboradores é feita seguindo um processo detalhado que inclui o recrutamento, formação inicial, formação básica, formação contínua, manutenção da qualificação e requalificação, de forma a garantir que estes têm a competência necessária para a realização das atividades.

Todos os colaboradores do SGBF passam por um processo de qualificação inicial que inclui formação no Sistema de Gestão da Qualidade e qualificação inicial para o desempenho das atividades laboratoriais. O processo de qualificação inicial para uma nova função envolve várias etapas essenciais de forma a garantir a competência e qualidade do trabalho.

Esta formação é supervisionada por um avaliador, definido pelo Diretor do Serviço ou Responsável Técnico, o qual tem a responsabilidade de acompanhar e avaliar o desempenho do colaborador. Se o procedimento envolver o ensaio de amostras, o formando deve obter resultados de pelo menos 10 controlos ou amostras cegas com resultados já conhecidos, preferencialmente incluindo amostras de Controlo Externo da Qualidade, escolhidas pelo seu avaliador.

A fase de avaliação estende-se por pelo menos um mês após a conclusão da formação formal, durante o qual o formando é supervisionado na execução de pelo menos 5 ensaios laboratoriais, envolvendo um total de 30 amostras. Os resultados obtidos devem ser interpretados e valorizados de acordo com os critérios definidos no procedimento operacional de Interpretação e valorização de perfis genéticos, ou outros padrões de qualidade relevantes. Durante esta fase, o avaliador verifica e assina todos os registos gerados, garantindo a qualidade e a confiabilidade dos resultados. A formação é considerada completa após este período de avaliação, momento em que a qualificação do colaborador é determinada em conjunto com o DS.

Para procedimentos que não envolvem o ensaio de amostras, mas que ainda impactam a qualidade dos resultados, a formação pode ser limitada ao acompanhamento de pelo menos 5 procedimentos de rotina laboratorial durante um mês. Se os procedimentos não ocorrerem com a frequência necessária, o período de formação pode ser prolongado até que o critério seja cumprido. Tal como nos ensaios de amostras, o avaliador verifica e assina todos os registos gerados (Cerqueira, 2023).

2.5. Controlo de Qualidade no SGBF

O controlo de qualidade é fundamental para garantir a fiabilidade e a precisão dos resultados laboratoriais. Nesse contexto, a introdução do controlo de processos por Walter Shewhart nos anos 1920, que marcou o início da utilização de métodos estatísticos para prevenir a produção de resultados incorretos, foi seguida, nos anos 1950, pela adoção do gráfico de Levey-Jennings, uma ferramenta crucial para avaliar a consistência dos testes laboratoriais, juntamente com a técnica CUSUM e o gráfico EWMA, que permitiram uma monitorização mais eficaz das variações nos processos laboratoriais. Durante as décadas de 1960 e 1970, métodos como o *'delta check'* e a média móvel proporcionaram novas formas de detetar erros através da comparação de resultados de pacientes, enquanto nos anos 1980, o *'multi-rule Shewhart Chart'* de James Westgard trouxe um avanço significativo na aplicação de regras múltiplas para o controlo de qualidade em química clínica. A década de 1990 viu a implementação de variações biológicas como metas analíticas, contribuindo para a melhoria contínua da qualidade nos laboratórios (Zaman, 2018).

No que diz respeito aos laboratórios de genética forense, o desenvolvimento progressivo do controlo de qualidade culmina na elaboração do guia ISO/IEC 25, publicado em 1978, que estabelecia requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Este guia serviu de base para a elaboração da ISO/IEC 17025, cuja primeira

versão foi publicada em 1999 e que é atualmente a norma em vigor. Segundo a International Organization for Standardization (2017), a garantia da qualidade em laboratórios forenses é fundamental para assegurar a fiabilidade e precisão dos resultados, sendo indispensável a implementação de métodos de validação e medidas de controlo rigorosas para prevenir a contaminação cruzada e garantir a integridade das amostras. Na genética forense, a aplicação rigorosa destes princípios é crucial para a obtenção de resultados fiáveis e reprodutíveis, essenciais para a integridade das investigações legais.

É essencial que existam procedimentos documentados e sistematizados para a limpeza e descontaminação das instalações e equipamentos, bem como para a gestão dos reagentes e produtos de PCR. Estes devem ser rotineiramente verificados quanto à sua fiabilidade e devidamente etiquetados para facilitar a rastreabilidade. Além disso, é crucial a manutenção de registos detalhados dos materiais de referência e coleções, assegurando a sua identificação única (ISO, 2017).

A documentação de suporte aos métodos e procedimentos deve incluir detalhes como a descrição das amostras, parâmetros a determinar, equipamento necessário, métodos de preparação de amostras, controlos, calibrações, além de discussões sobre precauções e limitações. Devem ser estabelecidos critérios claros para a rejeição de resultados suspeitos e assegurar a manutenção de registos adequados que permitam a rastreabilidade e revisão dos dados por outros profissionais (ISO, 2017).

Por fim, as atividades de controlo de qualidade devem abranger uma variedade de práticas e são essenciais para assegurar a confiabilidade dos resultados e a credibilidade das análises forenses realizadas (ISO, 2017).

2.6. Validação de Métodos Forenses

A validação de métodos forenses é um processo fundamental que envolve a condução e análise de um conjunto de experiências para determinar a eficácia, fiabilidade e limitações de um método, procedimento ou das suas eventuais modificações, criando uma documentação registada que oferece um elevado grau de confiança de que um processo específico produzirá consistentemente resultados que atendam às suas especificações e atributos de qualidade pré-definidos (AAFS Standards Board, 2020). Assim, procede-se à realização de um conjunto de testes destinados a assegurar que uma metodologia ou instrumento cumpre os critérios previamente estabelecidos pelo laboratório ou pela empresa fornecedora do teste ou instrumento (Decorte, 2013).

No contexto das metodologias forenses, a validação subdivide-se em duas fases distintas: a validação de desenvolvimento e a validação interna. A validação de desenvolvimento é geralmente conduzida por fabricantes de kits e grandes laboratórios para testar novas tecnologias, *loci* STR, e conjuntos de primers, garantindo a sua adequação antes do uso generalizado. Já a validação interna ocorre dentro do próprio laboratório, assegurando que os métodos desenvolvidos sejam eficazes no contexto específico desse laboratório (Butler, 2012).

Os métodos e procedimentos de teste devem ser reconhecidos pela comunidade científica ou suportados por evidências científicas robustas, garantindo assim a obtenção de resultados válidos. A introdução de um novo método validado requer uma verificação interna rigorosa para confirmar a sua fiabilidade, mediante o uso de amostras conhecidas e a manutenção de registos detalhados da verificação. Nos casos em que a sua destruição seja necessário, deve procurar-se reter a maior quantidade de material possível para futuras reanálises (ISO, 2017).

A validação de métodos pode ser realizada por meio de comparação com métodos estabelecidos ou através de estudos conduzidos pelo próprio laboratório, especialmente quando são desenvolvidos métodos internos ou realizadas modificações significativas em métodos existentes. Além da validação dos métodos é importante ter em consideração a amostragem e a receção de provas, de forma a serem conduzidas de maneira a preservar a sua integridade, com procedimentos claros de forma a serem seladas e devidamente identificadas, garantindo a manutenção de um registo de cadeia de custódia detalhado (ISO, 2017).

No contexto operacional dos laboratórios, depois de validadas as metodologias, são estabelecidos procedimentos operacionais padrão (POs) que delineiam com precisão todos os materiais e etapas necessárias para realização de uma análise de forma correta. Adicionalmente, incluem-se diretrizes específicas de interpretação que auxiliam os analistas na correta avaliação dos resultados obtidos, por exemplo o procedimento operacional “PO-SGBF-S-010 -Extração de ADN a partir de zaragatoas bucais e de manchas de sangue com Chelex ® 100”. A clareza destas diretrizes é vital para assegurar que a interpretação dos dados seja consistente entre diferentes analistas e ao longo de diversos casos e para que cada amostra seja manipulada e processada corretamente (Butler, 2012).

Para garantir qualidade na interpretação dos resultados de ADN, é obrigatório o uso de diversos controlos de qualidade. Isso inclui controlos positivos e negativos, bem como

ladders, essenciais para garantir a precisão na *medição* dos tamanhos dos fragmentos de ADN, assegurar a eficácia dos reagentes de PCR e monitorizar possíveis contaminações. A implementação desses controlos é crucial para a deteção e solução de problemas que possam surgir durante as análises, contribuindo significativamente para a confiança nos resultados (Butler, 2012).

2.7. Cadeia de Custódia

A cadeia de custódia assegura a integridade e autenticidade de cada item de prova ao longo da investigação de um caso, definindo claramente o início e o fim do processo e monitorizando todas as etapas desde a colheita/recolha de amostras até ao respetivo armazenamento, garantindo que o material corresponde exatamente ao âmbito do processo (D'Anna et al., 2023).

Na cadeia de custódia são documentadas, em modelos próprios, todas as transferências do objeto de prova de pessoa para pessoa, desde a sua colheita/apreensão. No caso de itens referentes a um processo criminal, são registadas todas as informações sobre as circunstâncias da recolha das provas, as condições em que foram encontradas e/ou como foram entregues, juntamente com as assinaturas das pessoas envolvidas em cada fase (D'Anna et al., 2023; Porto, 2022).

O avanço da tecnologia tem promovido a crescente adaptação da documentação em papel, para formatos digitalizados, recorrendo a sistemas informáticos seguros e rastreáveis (D'Anna et al., 2023). No caso do INMLCF, existe atualmente um sistema integrado (SIIMP) que permite rastrear todas as amostras biológicas recolhidas ou entregues na instituição.

No que respeita à integridade das amostras, em particular as amostras biológicas entregues ou colhidas no INMLCF, cada uma delas possui um número de identificação único e deve ser devidamente embalada para evitar danos durante o transporte, sendo selada em sacos ou com fita à prova de violação (D'Anna et al., 2023; Porto, 2022). Todos os indivíduos responsáveis pelo manuseamento ou transporte das amostras têm a função de verificar o estado das embalagens, confirmando se estão ou não seladas ou deterioradas.

Além disso, a transferência das amostras entre pessoas, instituições ou locais de armazenamento deve ficar registada cronologicamente. Os procedimentos da cadeia de custódia visam manter a integridade das amostras, utilizando métodos que preservem as suas características e propriedades originais, minimizando riscos de contaminação e

destruição física, química ou biológica. É essencial que as embalagens utilizadas para o seu acondicionamento sejam adequadas, garantindo a manutenção das suas propriedades (ISO 18385:2016, 2016; Porto, 2022).

A recolha da amostra deve ser efetuada pelas pessoas qualificadas para o efeito, dado que são materiais sensíveis, fáceis de contaminar e o método de recolha irá depender do estado de degradação da mesma. Deve também ser garantido que a quantidade de material biológico recolhido é suficiente para a identificação genética e para uma possível repetição dos procedimentos analíticos adotados, sendo esta também dependente das condições ambientais ou da condição microbiana em que possa ter estado sujeita.

O material utilizado na recolha de amostras biológicas deve estar livre de ADN humano, sendo preferível o material fabricado especificamente segundo as normas internacionais para prevenir a contaminação (ISO 18385:2016, 2016; Porto, 2022).

Os agentes responsáveis pela investigação devem documentar a localização da cena, a hora de chegada do investigador e do médico legista, e determinar os locais de armazenamento das provas e os laboratórios responsáveis pela recolha de tipos específicos de provas, dando prioridade às provas frágeis. Devem também identificar, proteger, e preservar as provas utilizando recipientes, etiquetas e conservantes apropriados, registando detalhadamente a localização, hora de recolha, depósito, e identidade da pessoa responsável, além de desenvolver listas detalhadas do pessoal e testemunhas, incluindo os horários de chegada e partida (D'Anna et al., 2023).

Para concluir, a rigorosa implementação da cadeia de custódia assegura a integridade e autenticidade das provas ao longo do processo investigativo. A documentação detalhada, o uso de embalagens adequadas, a digitalização dos registos e a formação dos profissionais envolvidos são essenciais para a fiabilidade dos resultados. Estes procedimentos garantem a preservação das amostras, minimizam o risco de contaminação e asseguram que o material biológico seja adequado para as análises forenses. Assim, a cadeia de custódia é crucial para manter a integridade das provas desde a recolha até à apresentação em tribunal.

3. A importância do ADN na genética forense

3.1. História da Genética Forense

O desenvolvimento marcante da genética forense ao longo do século XX iniciou-se com a descrição dos grupos sanguíneos ABO por Karl Landsteiner no início dos anos 1900 (Yamamoto et al., 1990) e, posteriormente, com a caracterização de outros marcadores de grupos sanguíneos e proteínas solúveis do soro sanguíneo, o que ampliou significativamente o potencial para perfis altamente discriminativos (Goodwin et al., 2011a, p. 2; Mitra et al., 2014).

Nas décadas de 1960 e 1970, a biologia molecular ganhou impulso com a introdução de técnicas como as enzimas de restrição, a sequenciação de Sanger e o Southern Blotting, sendo que a capacidade de detetar polimorfismos de ADN, alcançada em 1978, abriu novas possibilidades para análises forenses baseadas em sequências de ADN. A técnica de impressão digital de ADN, desenvolvida por Alec Jeffreys em 1984, revolucionou a genética forense ao permitir a identificação de padrões únicos em *loci* minissatélites (Decorte, 2013; Goodwin et al., 2011a, p. 3). Esta abordagem foi aprimorada com a introdução de sondas específicas para *loci* únicos, aumentando a precisão e reduzindo a complexidade da interpretação dos dados (Goodwin et al., 2011a, p. 3).

A introdução da PCR em 1983 por Kary Mullis representou outro marco, aumentando drasticamente a sensibilidade da análise de ADN. Esta tecnologia permitiu a geração de perfis genéticos a partir de quantidades mínimas de material biológico e facilitou a análise de ADN degradado (Weiss, 2009).

A aplicação da PCR na genética forense começou com a análise de polimorfismos de nucleótidos únicos e foi seguida pela adoção de STRs, que se tornaram o padrão para marcadores genéticos em ciência forense. Paralelamente, avanços nos métodos de extração e quantificação de ADN, aliados ao desenvolvimento de kits comerciais baseados em PCR, impulsionaram um significativo salto tecnológico.

Em 1986, a análise de ADN foi utilizada pela primeira vez num caso criminal em Leicestershire, Reino Unido, relacionado com o homicídio de duas jovens, desempenhando um papel essencial ao exonerar um indivíduo que havia confessado um dos crimes. Posteriormente, um rastreio em massa envolvendo aproximadamente 5000 indivíduos permitiu a identificação de Colin Pitchfork como o autor dos homicídios, levando à sua condenação em janeiro de 1988.

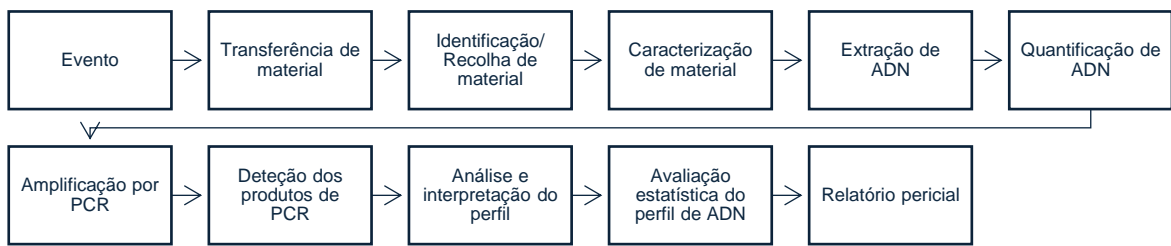


Figura 3.1 Etapas para Obtenção de Perfil de ADN em Investigação Criminal. (Adaptada do livro “An Introduction to Forensic Genetics” (2011a, p. 3))

Importantes também foram as medidas de garantia de qualidade e padronização introduzidas após casos judiciais significativos, como o caso *People v. Castro* em 1989 nos EUA, que impulsionaram a standardização e acreditação em genética forense. Essas medidas asseguraram que a análise de ADN forense se estabelecesse como uma ferramenta confiável e robusta na ciência forense (Goodwin et al., 2011, pp. 1–9).

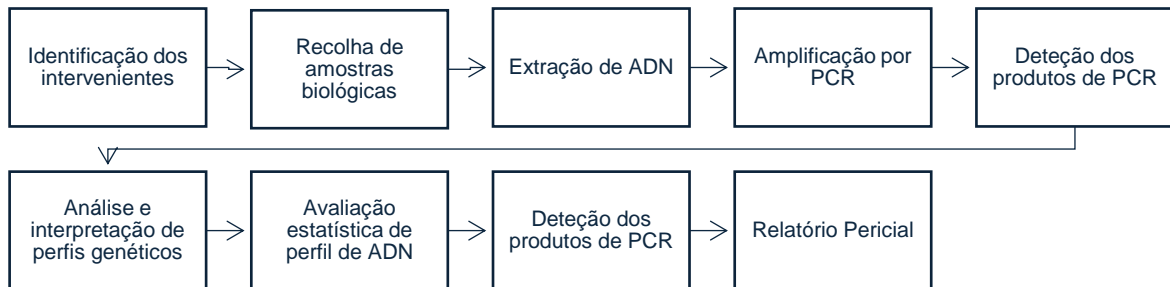


Figura 3.2 Etapas para obtenção de perfis genéticos até à elaboração de relatório pericial nos processos de investigação de parentesco.

A Genética Forense, tem também um papel fundamental, particularmente no campo da identificação de indivíduos desconhecidos, desempenhando um papel crucial em cenários de impacto social, humanitário e histórico, aplicando metodologias que analisam tanto o genoma nuclear como o mitocondrial. Estas técnicas têm sido fundamentais para a identificação de pessoas desaparecidas em consequência de conflitos políticos, guerras, atos terroristas ou desastres em massa, como catástrofes naturais (Amorim, 2015). As Figuras 3.1 e 3.2 ilustram, respetivamente, as etapas para obtenção de perfis de ADN em investigações criminais e os processos para obtenção de perfis genéticos até à elaboração do relatório pericial em investigações de parentesco, complementando a discussão sobre a aplicação da Genética Forense nestes diferentes contextos.

3.2. Ácido Desoxirribonucleico

O ácido desoxirribonucleico (ADN) é uma molécula essencial para a transmissão, codificação e expressão de informações genéticas e para a atividade celular em seres vivos, estando presente no núcleo de todas as células, bem como nas mitocôndrias. É única para cada indivíduo, exceto para gêmeos monozigóticos que partilham a mesma informação genética. Embora 99,9% do ADN dos seres humanos seja idêntico, a caracterização única de cada indivíduo deve-se aos restantes 0,1% de ADN (Elkins, 2013, pp. xiii–xv; Genetic Alliance, 2008, p. 6; Goodwin et al., 2011c; Sampaio, 2022).

Esta molécula integra a classe dos ácidos nucleicos, assim como o RNA e é composta por nucleotídeos, cada um contém uma das quatro bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), guanina (G) ou citosina (C), um grupo de fosfato e um açúcar, neste caso a desoxirribose. Das bases nitrogenadas, a timina é exclusiva do ADN, ao passo que o uracilo é encontrado apenas no RNA. Na estrutura do ADN, as bases ligam-se entre si por pontes de hidrogénio, com a adenina a emparelhar especificamente com a timina e a guanina com a citosina (Elkins, 2013, p. xiv).

A estrutura física do ADN foi proposta por Watson & Crick (1953), de forma a explicar as suas propriedades químicas e físicas. Nesta estrutura, duas cadeias polinucleotídicas helicoidais estão enroladas em torno de um eixo e conectadas por pontes de hidrogénio formando uma dupla hélice, sendo que o exterior é constituído por moléculas de açúcar e grupos fosfato, que são hidrofílicos, enquanto as bases nitrogenadas, de carácter hidrofóbico, estão protegidas no interior da hélice. As cadeias ligam-se através de ligações fosfodiéster, que ocorrem entre o grupo fosfato e o açúcar desoxirribose, formando assim a espinha dorsal da hélice, a partir da qual as bases se estendem para o interior, emparelhando-se com as bases complementares da cadeia oposta (Elkins, 2013, p. xiv; Watson & Crick, 1953).

A sequência de pares de bases ao longo do ADN forma segmentos chamados genes, que são as unidades de informação genética responsáveis pela codificação de proteínas e pela regulação de processos celulares. A estrutura complexa e funcional do ADN assegura a sua capacidade de armazenar e transmitir a informação genética entre gerações com elevada precisão. A complementaridade das cadeias de ADN determina que a sequência de bases de uma cadeia especifica a sequência da outra, o que é essencial para a replicação e transmissão da informação genética (Elkins, 2013, p. xiv; Goodwin et al., 2011; Watson & Crick, 1953).

O genoma nuclear humano, que abrange todo o material genético no núcleo de uma célula, possui cerca de 3,2 mil milhões de pares de bases, organizados em 46 cromossomas, 22 pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais. Cada cromossoma, com extensão entre 50 e 250 milhões de pares de bases, contém múltiplos genes, cada um com uma sequência específica de ADN. Os genes, as unidades básicas da hereditariedade, constituem cerca de 29% do genoma humano, enquanto as regiões restantes, responsáveis por manter a estrutura dos cromossomas e por regular a localização, o tempo e a quantidade de produção de proteínas, ocupam o espaço restante. Estima-se que o genoma humano contenha entre 20.000 e 25.000 genes (Elkins, 2013, pp. xiii–xv; Genetic Alliance, 2008, p. 6).

Com exceção dos gâmetas, como espermatozoides e óvulos, que contêm apenas uma cópia de cada um dos 22 cromossomas autossómicos e um cromossoma sexual, todas as outras células são diploides, o que significa que possuem dois conjuntos de cromossomas. No que se refere aos cromossomas sexuais, os indivíduos do sexo feminino apresentam dois cromossomas X, um proveniente de cada progenitor, enquanto os indivíduos do sexo masculino possuem um cromossoma X e um Y. A mãe biológica contribui sempre com um cromossoma X, sendo o pai biológico responsável pela determinação do sexo da descendência através da transmissão de um cromossoma X ou Y (Elkins K., 2013, pp. xiii–xv).

Com o progresso das técnicas de biologia molecular, é agora viável analisar qualquer região das 3,2 mil milhões de pares de bases que compõem o genoma humano. Para a genética forense, os *loci* de ADN devem possuir características essenciais, como uma grande variabilidade entre indivíduos, serem fáceis e económicos de caracterizar, apresentarem perfis simples de interpretar e facilmente comparáveis entre laboratórios, não estarem sujeitos a pressão seletiva e possuírem uma baixa taxa de mutação (Goodwin et al., 2011c).

3.3. Análise de marcadores STR em Contexto Forense

A Genética Forense é uma disciplina essencial para a resolução de determinados processos judiciais, quer no âmbito civil através da realização de exames de parentesco e identificação de desconhecidos, quer no âmbito da investigação criminal. Em todos estes processos, é efetuada a análise de perfis genéticos, quer em amostras de referência quer em amostras problema (vestígios biológicos ou amostras em avançado estado de decomposição) recolhidos nas diferentes circunstâncias relacionadas com o processo. Nos casos de âmbito criminal permite a identificação de indivíduos através da

análise de perfis genéticos obtidos a partir de vestígios biológicos. A base desta identificação reside no princípio de que cada célula contém um núcleo com toda a informação genética do indivíduo. Os estudos de ADN nesta área, são efetuados recorrendo à análise de marcadores do tipo STR que têm evoluído significativamente, tornando-se um método padrão na análise forense (Kowalczyk et al., 2018).

Nos casos criminais, a obtenção do perfil genético dos vestígios biológicos e a posterior comparação com o perfil genético de um suspeito representam o momento culminante da perícia em Genética Forense. Após este processo, procede-se à avaliação estatística dos resultados e à elaboração do relatório pericial. A correspondência entre o perfil genético do vestígio e o do suspeito pode servir como prova de acusação, enquanto a falta de correspondência pode ser determinante para absolver um suspeito inocente (Pinheiro, 2012).

Esta ciência fundamenta-se no princípio da troca de Locard, que postula que o contacto entre dois objetos num cenário de crime resulta numa troca de material entre eles, permitindo a recolha de vestígios do material genético do criminoso para análise (Kowalczyk et al., 2018). Os perfis genéticos obtidos podem determinar locais de passagem dos intervenientes, pessoas com quem interagem, objetos em que tocaram, já que o ADN pode ser encontrado em todos esses locais por transferência primária, através do toque, ou por transferências secundárias, quando o ADN de um indivíduo é transportado para uma superfície por outro indivíduo após um contacto prévio (Sampaio, 2022).

No entanto, os marcadores genéticos utilizados, não fornecem ao investigador informações sobre quando ou como o material foi depositado, de que célula, fluido ou tecido provém no caso de uma fonte não identificada, ou descrições fenotípicas da pessoa que deixou o material na cena, exceto o seu género (Gunn et al., 2014).

No que diz respeito às metodologias utilizadas para a identificação de perfis genéticos, inicialmente, a genética forense utilizava minissatélites, sequências de ADN que contêm de 9 a 80 nucleótidos, cujas variações entre indivíduos possibilitam a identificação através de polimorfismos. Esta técnica evoluiu com o uso de regiões altamente variáveis (VNTRs) no genoma, analisadas através do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) e técnicas de hibridação, permitindo uma impressão digital genética única para cada indivíduo (DNA *fingerprint*). A introdução da PCR foi determinante neste processo, ao permitir a amplificação de sequências contendo

VNTRs, embora inicialmente exigisse uma quantidade considerável de material biológico não degradado.

Contudo, os microssatélites, ou STR, que são sequências curtas de ADN de aproximadamente 2 a 6 pares de bases e que constituem cerca de 3% do genoma humano, emergiram como a escolha preferencial na análise forense. Devido à sua elevada variabilidade entre indivíduos, os marcadores STR são altamente polimórficos, oferecendo um poder discriminatório significativo mesmo em quantidades vestigiais de material, permitindo assim a identificação quase inequívoca de um indivíduo e associando o seu ADN à cena do crime com elevado grau de certeza (Gunn et al., 2014; Kowalczyk et al., 2018).

Estes marcadores encontram-se tanto nos cromossomas sexuais como nos autossómicos, sendo úteis em diversos contextos, incluindo casos de paternidade, crimes sexuais ou na identificação de pessoas desaparecidas. Nos testes de paternidade, por exemplo, os STRs do cromossoma X são utilizados em casos onde a criança é do sexo feminino, o pai está ausente, ou em situações de incesto.

Apesar dos marcadores autossómicos serem primordiais na identificação individual, a informação contida nos cromossomas sexuais é valiosa na determinação do sexo do indivíduo. Esta análise é frequentemente baseada no gene da amelogenina (AMEL), embora se considerem marcadores adicionais para contornar possíveis mutações nos fragmentos de amelogenina.

A análise de misturas de material biológico, como em casos de violações ou situações com quantidades negligenciáveis de ADN masculino com uma predominância de ADN feminino, recorre a polimorfismos Y-STR. Devido à herança uniparental do cromossoma Y, o perfil Y-STR entre indivíduos masculinos relacionados é idêntico, facilitando a identificação em contextos específicos (Kowalczyk et al., 2018).

Em 1994, o Serviço de Ciência Forense (FSS) do Reino Unido selecionou quatro STRs tetranucleotídicos, TH01, vWA, FES/FPS e F13A1 — para amplificação por PCR, devido às suas sequências repetitivas simples. No entanto, estes marcadores não ofereciam um nível de discriminação satisfatório. Atualmente o estudo dos STRs é efetuado com a utilização de kits de amplificação que permitem o estudo em simultâneo de pelo menos 15 STRs, com grande sensibilidade, exigindo um maior cuidado na interpretação de resultados. Os kits comerciais de amplificação de ADN permitem agora identificar um perfil genético a partir de quantidades muito pequenas de ADN, aproximadamente 80 a

100 picogramas, o que equivale a cerca de 15 células. Os perfis genéticos encontrados são posteriormente comparados com o ADN de referência do suspeito, e a probabilidade de o suspeito ter contribuído para o perfil genético é calculada utilizando uma razão de verosimilhança. Caso não seja possível identificar nenhum suspeito, o perfil genético será pesquisado na Base de Dados de Perfis de ADN nacional ou em bases de dados internacionais (Kowalczyk et al., 2018; Sampaio, 2022).

Na ajuda à investigação criminal, têm sido desenvolvidas bases de dados de perfis genéticos. A primeira base de dados foi criada em 1997, pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI) dos Estados Unidos, que escolheu um conjunto de 13 *loci* STR autossómicos para integrar o Sistema de Índice Combinado de ADN (CODIS), uma base de dados que reúne todos os perfis genéticos elaborados por laboratórios forenses a nível federal, estadual e local. A seleção destes marcadores foi posteriormente revista em 2010, com a inclusão de mais sete STRs a partir de janeiro de 2017.

O CODIS opera sob rigorosos protocolos de proteção à privacidade, permitindo que as amostras sejam utilizadas exclusivamente para fins de identificação por indivíduos autorizados. Os marcadores selecionados estão localizados em regiões não codificantes do genoma e foram escolhidos por não revelarem quaisquer características físicas ou médicas dos indivíduos (Kowalczyk et al., 2018; Wyner et al., 2020).

Em Portugal foi criado um sistema semelhante, em 2008, com a Lei n.º 5/2008, de 12 de fevereiro (2008) que aprova a criação de uma base de dados de perfis de ADN para fins de identificação civil e criminal.

3.4. Importância do cromossoma Y

Desde a década de 1990, a análise do cromossoma Y tem sido desenvolvida com sucesso e incorporada rotineiramente nos laboratórios de investigação criminal. Devido à sua especificidade masculina, o cromossoma Y é particularmente útil em casos de misturas desproporcionais, frequentemente encontradas em crimes sexuais (Pinheiro, 2012; Roewer, 2009).

Este cromossoma, um dos dois cromossomas sexuais nos humanos, desempenha um papel crucial em diversas aplicações forenses, especialmente quando outras formas de ADN se apresentam limitadas ou insuficientes. A capacidade do cromossoma Y para determinar o sexo biológico do suspeito é de grande relevância, facilitando a distinção entre indivíduos do sexo masculino em casos de agressões sexuais em que o ADN do agressor pode estar misturado com o da vítima feminina. Além disso, contribui

elevado poder discriminatório em diversas populações e uma baixa taxa de mutação (Roewer, 2009).

4. Provas de orientação

A identificação de fluidos corporais é um elemento essencial na ciência forense, uma vez que a capacidade de reconhecer fluidos como sangue e sémen é frequentemente determinante em investigações criminais e no seu uso subsequente em tribunal. Muitas manchas de fluidos corporais são invisíveis a olho nu, encontram-se presentes em quantidades mínimas ou em misturas complexas, o que dificulta a sua identificação direta. Tradicionalmente, os testes utilizados baseavam-se em ensaios químicos ou enzimáticos, que eram frequentemente presuntivos e apresentavam limitações em termos de especificidade e sensibilidade, enquanto os testes confirmatórios se baseavam em análises microscópicas ou imunológicas. Muitos dos testes iniciais eram incompatíveis com a análise de perfis de ADN e consumiam o material biológico disponível, que já era escasso (Basset et al., 2022; Harbison & Fleming, 2016).

A investigação forense com provas biológicas começa na cena do crime e continua no laboratório. No local do crime, é essencial preservar a segurança, documentar o local e recolher provas físicas. No laboratório, utilizam-se técnicas científicas para examinar as provas biológicas, identificar fluidos corporais como sangue, saliva e sémen, e comparar características individuais. A identificação de provas biológicas baseia-se na comparação de características de classe, permitindo categorizar e identificar amostras com padrões conhecidos. Este passo é crucial para a posterior análise de ADN e obtenção de perfis genéticos (Li, 2008, p. 46).

Com a crescente importância do perfil genético em investigações forenses e o aumento do interesse em obter informações a partir de quantidades menores de ADN, a identificação eficaz de fluidos corporais na cena do crime torna-se ainda mais relevante, pois permite a obtenção de amostras adequadas para análise. A análise de ADN é amplamente utilizada em investigações criminais, na identificação de vítimas de desastres e em casos de pessoas desaparecidas (van Oorschot et al., 2010).

Para tal, existem métodos específicos de identificação, como a microscopia e ensaios imunológicos, químicos ou enzimáticos. Adicionalmente, existem testes presuntivos ou de orientação e de confirmação, que são seguros, económicos, simples de executar e transportar. Estes testes possibilitam a identificação de saliva, sangue, sémen e urina

com apenas uma pequena quantidade de amostra, permitindo determinar a presença ou ausência de um fluido biológico, sem comprometer a posterior obtenção de perfis genéticos através da análise de ADN. O desenvolvimento contínuo destes testes tem vindo a aumentar a especificidade, reduzindo a ocorrência de falsos positivos (Silva, 2022).

Para garantir a eficácia na identificação de fluidos corporais, qualquer método utilizado deve ser sensível, simples de aplicar no laboratório ou na cena do crime, específico tanto para o tipo de fluido corporal como, idealmente, para a espécie humana, e não destrutivo, permitindo a análise subsequente de ADN para perfil genético. Além disso, os métodos devem ser eficazes em diferentes tipos de substratos, dado que os fluidos corporais podem ser depositados em diversas superfícies (Harbison & Fleming, 2016).

4.1. Detecção de saliva

A transferência de saliva por parte do agressor para a vítima pode ocorrer através de mordeduras, beijos, contacto direto ao comer ou beber, ou por meio de objetos como cigarros, entre outros. A deteção da saliva é efetuada utilizando testes de orientação, como lanternas forenses e óculos com filtros apropriados, devido à fluorescência emitida pelos fluidos biológicos. No entanto, estes testes podem apresentar falsos positivos na presença de fungos, bactérias, secreções pancreáticas, leite humano, sémen e saliva não humana (Goodwin et al., 2011a, p. 29).

Existem vários kits de deteção com maior sensibilidade e especificidade, baseados em ensaios imunocromatográficos, como os kits Rapid Stain Identification Series (RSID) e Seratec® Amylase Test (Seratec, 2017). Estes testes utilizam anticorpos monoclonais que detetam a enzima salivar α -amilase humana, sendo, por isso, fiáveis na deteção de saliva. Adicionalmente, existem equipamentos como o SeraQuant®, que permitem a leitura direta dos kits de deteção e a quantificação, distinguindo entre resultados fracos positivos e negativos (Silva, 2022).

4.2. Detecção de sangue

Existem vários testes de deteção e pesquisa de sangue, sendo estes os vestígios biológicos mais frequentemente encontrados em locais de crime. Mesmo que o sangue no local do crime tenha sido limpo, é possível, com a ajuda de lanternas forenses, realçar as manchas de sangue, que aparecem mais escuras devido à absorção da radiação no comprimento de onda da lanterna. Lanternas, como a Polilight®, podem detetar manchas de sangue em superfícies pintadas, contudo, a exposição a certas luzes

ultravioleta deve ser usada com cuidado devido à possível danificação do ADN (Virkler & Lednev, 2009). De um modo geral, a Polilight® constitui uma técnica segura, simples, não invasiva e não destrutiva, adequada para a utilização em perícias forenses (Vandenberg & Van Oorschot, 2006).

Uma técnica amplamente utilizada é a aplicação de luminol, também denominado 3-amino-ftalidrazida, dissolvido numa solução de peróxido de hidrogénio, que pode ser pulverizada numa grande área. A Bluestar® é uma das marcas que apresenta melhores resultados neste método. A presença de hemoglobina no sangue provoca a oxidação do luminol, resultando na emissão de uma luminescência azul visível em ambientes escuros. Este teste é especialmente útil para detetar pequenas manchas de sangue disfarçadas, ajudando na identificação do padrão de dispersão ou em peças de roupa escuras onde vestígios hemáticos são de difícil visualização. No entanto, a eficácia do teste pode ser comprometida na presença de químicos que interfiram na luminescência.

Foram também desenvolvidos ensaios imunocromatográficos baseados na reação antigénio/anticorpo, como o Seratec® HemDirect, representado na figura 4.1, que deteta hemoglobina humana (Seratec, 2009), e o RSID™, um teste específico para humanos que deteta a glicoforina A, uma proteína abundantemente expressa em glóbulos vermelhos humanos (Schweers et al., 2008). Os testes do Seratec® HemDirect podem ainda ser analisados no Seratec® SeraQuant, que quantifica a quantidade de fluído presente.

Além disso, existe o Seratec® PMB, que deteta e distingue sangue menstrual de sangue periférico. Este teste identifica não só a hemoglobina humana, mas também a presença do fragmento dímero D, resultante da degradação do fibrinogénio durante a fase menstrual, sendo particularmente útil para determinar a origem do sangue encontrado na cena do crime (Holtkötter et al., 2018; Silva, 2022).

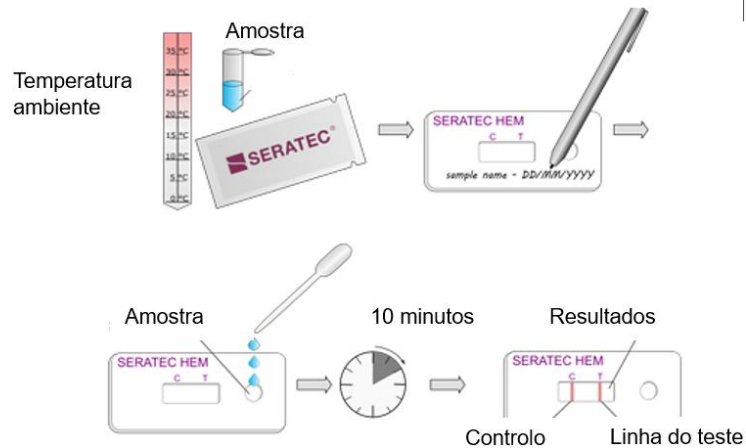


Figura 4.1 Teste de Seratec ® HemDirect. Adaptado de Seratec (2009)

4.3. Detecção de sémen

A composição do sémen envolve espermatozoides suspensos num fluido constituído por secreções provenientes da próstata, das vesículas seminais e da glândula de Cowper. Este fluido apresenta uma elevada concentração de antigénio específico da próstata (PSA), uma glicoproteína que atua como serina protease, facilitando a liquefação do sémen e a mobilidade dos espermatozoides. Dada a alta concentração de PSA, este antigénio tem sido utilizado com eficácia como um marcador proteico na identificação de fluidos seminais. Embora o PSA possa também ser encontrado em outras amostras biológicas masculinas e femininas, as suas concentrações são substancialmente inferiores às encontradas nos fluidos seminais.

O sémen é frequentemente encontrado em investigações de agressão sexual, sendo a sua deteção e identificação de extrema importância. A confirmação da presença de sémen pode ser crucial para sustentar alegações de abuso sexual, o que torna os testes de triagem e confirmação essenciais. A deteção de vestígios de sémen pode ser efetuada através de uma lanterna forense com emissão de luz UV, que induz uma fotoluminescência visível com o uso de óculos de filtro apropriado. Esta técnica serve como um teste preliminar, uma vez que outros fluidos biológicos, como a saliva, também podem apresentar fotoluminescência (Silva, 2022).

Após a deteção inicial da mancha, realizam-se testes presuntivos e confirmatórios para verificar a presença de sémen. A deteção de PSA pode ser realizada por meio de testes químicos, como o kit Phosphatesmo KM®, que deteta a fosfatase ácida e que, apesar da sua sensibilidade, podem gerar falsos positivos devido à especificidade limitada.

Outros fluidos biológicos contendo PSA podem resultar em reações positivas, mas a resposta ao sémen é geralmente mais intensa. A reação da fosfatase ácida é um método rápido, simples e seguro, embora manchas antigas possam apresentar reações menos intensas devido à degradação enzimática (Lunetta & Sippel, 2009; Silva, 2022).

O teste SERATEC® PSA Semiquant identifica PSA utilizando dois anticorpos monoclonais, gerando uma reação imunocromatográfica. Contudo, este teste não é totalmente específico, podendo apresentar reações positivas com urina, fluidos vaginais e amostras anais *post-mortem*. O teste RSID™ é um teste presuntivo baseado na semenogelina, oferecendo menor sensibilidade e a possibilidade de falsos positivos (Silva, 2022). Tal como nos testes de detecção de saliva e sangue, o SERATEC® PSA SeraQuant® pode ser utilizado para quantificar o PSA na amostra, ajudando a determinar a concentração de sémen nas amostras analisadas (Laux & Barnhart, 2011).

Os testes confirmatórios mais frequentemente utilizados para a identificação de sémen baseiam-se na observação microscópica dos espermatozoides, uma vez que o sémen é o único fluido corporal que contém este tipo de células com características específicas. Este método envolve a coloração de lâminas, utilizando pequenas quantidades do fluido biológico em estudo, através da técnica de coloração *Christmas Tree*. Esta técnica permite que as cabeças dos espermatozoides apresentem uma cor vermelha, enquanto as caudas se colorem de verde. Outras técnicas de coloração, como Hematoxilina/Eosina, Papanicolau e Wright, são consideradas menos eficazes (Silva, 2022; Virkler & Lednev, 2009).

5. Técnicas de Análise de ADN

5.1. Método de Chelex-100

A qualidade da extração de ADN é fundamental para a obtenção de perfis genéticos precisos através da amplificação por PCR. Para tal, os métodos de extração devem não só assegurar a recuperação eficiente do ADN, mas também a eliminação de potenciais inibidores que possam afetar as etapas seguintes, como a PCR. Existem várias técnicas de extração, que se dividem em orgânicas e inorgânicas e cuja eficácia pode variar em função do tipo de amostra analisada (Phillips et al., 2012).

Um dos primeiros métodos de extração adotados pela ciência forense foi o uso do Chelex-100, uma resina de troca iónica baseada em quelantes, distinguida pela sua notável capacidade de se ligar a iões de metais de transição. Constituída por copolímeros de estireno divinilbenzeno, que incorporam iões iminodiacetato

emparelhados, funcionando eficazmente como agentes quelantes, especialmente eficazes na captura de íons metálicos polivalentes, como o magnésio, conhecidos pela sua potencialidade em degradar o ADN.

Esta ação previne a degradação do material genético, contribuindo assim para a preservação da sua integridade. O procedimento de extração com Chelex-100 envolve a lise celular, facilitada pela alcalinidade e pelo aquecimento da solução, permitindo que os grupos quelantes se associem de forma eficiente aos componentes celulares, removendo os íons metálicos e garantindo a estabilidade do ADN para análises futuras (Goodwin et al., 2011b; Phillips et al., 2012).

Um estudo realizado por Ba et al. (2007) demonstrou que a extração de ADN de manchas de sangue antigas em papel de filtro pode ser realizada diretamente com a metodologia Chelex-100, sem necessidade de pré-tratamento das manchas para remoção de contaminantes, comprovando a sua eficácia e simplicidade.

A simplicidade do método Chelex-100, juntamente com a ausência de reagentes tóxicos e a rapidez de execução, são vantagens significativas da sua utilização, embora a sua eficácia na remoção de todos os inibidores da PCR possa ser limitada. A extração com Chelex-100 segue um procedimento direto: a resina é preparada numa solução a 5% com água destilada, e o material biológico é incubado com esta suspensão a 56°C, seguido de um aquecimento a 100°C para garantir a completa lise celular. Após a centrifugação, obtém-se uma solução aquosa contendo o ADN, pronto para ser utilizado na PCR. Este método produz ADN de cadeia simples devido ao ambiente alcalino da suspensão de Chelex-100 (Bio-Rad, n.d.; Goodwin et al., 2011b; Walsh et al., 1991).

Apesar das suas limitações, o método de extração de ADN utilizando Chelex-100 permanece uma ferramenta útil na ciência forense, oferecendo um equilíbrio entre eficácia, simplicidade e segurança, facilitando a obtenção de perfis genéticos a partir de uma ampla variedade de amostras biológicas (Goodwin et al., 2011b).

5.2. Método de PrepFiler™ Express

Os kits forenses de extração de ADN PrepFiler™ foram desenvolvidos especificamente para isolar e purificar ADN de amostras forenses através de uma técnica de ligação-lavagem-eluição. A remoção de inibidores é essencial para evitar a amplificação ineficaz, o que torna necessário um método que os elimine eficazmente, assegurando que o ADN extraído seja de alta qualidade e adequado para posterior análise (Foley, 2023).

Este processo pode ser executado manualmente utilizando o kit PrepFiler™ ou de forma automatizada utilizando o sistema AutoMate Express™ da Applied Biosystems com o kit PrepFiler Express™. Ambos o kit PrepFiler™ e o kit PrepFiler Express™ têm duas versões: um kit padrão adequado para amostras comuns como manchas de sangue ou outros fluidos corporais, e um kit BTA, destinado a amostras mais complexas, incluindo ossos, dentes, beatas de cigarro, amostras adesivas ou abas de envelopes (Applied Biosystems by Life Technologies, 2010; Foley, 2023).

Tanto o método manual como o semiautomático começam com uma incubação manual com tampão de lise para libertar o ADN na solução. No método semiautomático, as etapas de purificação e eluição do lisado são realizadas no AutoMate Express™, um sistema automatizado que utiliza cartuchos pré-carregados para simplificar e acelerar a extração de ADN. Após a lise, o ADN adere a esferas magnéticas na presença de um sal caotrópico, que facilita a adsorção, e é submetido a várias lavagens com um tampão à base de etanol para remover impurezas e inibidores de PCR. Posteriormente, é adicionado um tampão de eluição e o conteúdo é aquecido, libertando o ADN das esferas magnéticas. Este procedimento permite que o ADN purificado se concentre no tubo final, garantindo que esteja numa forma adequada e de alta qualidade para a próxima etapa da análise (Foley, 2023).

O kit de extração PrepFiler™ é um método rápido e eficiente para a purificação de ADN de diversas amostras forenses, permitindo obter perfis de STRs de alta qualidade, mesmo em amostras difíceis e com pouca quantidade de ADN (Barbaro et al., 2009), sendo que o PrepFiler Express™ oferece ainda vantagens adicionais. Uma comparação preliminar em 2011 de vários métodos de extração revelou que o kit PrepFiler™ Express™ apresenta resultados superiores na quantificação de ADN em amostras de sangue, resultados satisfatórios em esfregaços bucais, e picos alélicos equilibrados nos perfis genéticos de sémen. Este kit proporciona um processamento mais rápido, melhora a qualidade do ADN, remove inibidores de PCR com eficiência e minimiza a contaminação cruzada. A investigação de Balsa et al. (2011) demonstra que o sistema automatizado fornece ADN puro e em quantidade suficiente para obter perfis genéticos completos em amostras de sangue, sémen e esfregaços bucais.

No entanto, em casos específicos, como amostras ginecológicas ou roupas íntimas das vítimas, os perfis genéticos obtidos frequentemente são misturas desequilibradas de perfis femininos e masculinos. Para abordar esta limitação, a combinação do Samplettype I-sep DL com o PrepFiler Express™, embora não seja uma prática comum,

apresenta uma solução eficaz em situações raras e específicas. Esta abordagem é eficaz em casos de elevada desproporção de ADN feminino em relação ao masculino, superando as limitações do PrepFiler™ e melhorando a qualidade dos perfis genéticos do agressor. A utilização conjunta do I-sep DL, que separa células epiteliais de espermatozoides, com o PrepFiler Express™ permite uma purificação mais eficiente do ADN masculino. No entanto, deve-se ressaltar que estes resultados podem dever-se ao uso de amostras simuladas (Bogas et al., 2017).

Concluindo, os kits de extração de ADN forense PrepFiler™ e PrepFiler Express™ são métodos rápidos e eficientes para purificar ADN de diversas amostras forenses. A versão automatizada, PrepFiler Express™, remove eficazmente inibidores de PCR, minimiza a contaminação cruzada e acelera o processamento, garantindo ADN de alta qualidade para obter perfis genéticos completos em sangue, sémen e esfregaços bucais. Estas características fazem do PrepFiler Express™ uma ferramenta essencial na análise forense.

5.3. Quantificação de ADN através do Quantifiler® Trio

Nas amostras problema, a etapa subsequente à extração do ADN é a quantificação do ADN humano, para verificar se a concentração de ADN é adequada para aplicação nos métodos seguintes. A quantificação assegura que existe ADN suficiente e de qualidade adequada para prosseguir com os testes genéticos, garantindo a precisão e a eficácia dos resultados obtidos nas análises posteriores (Knight et al., 2023).

A análise de ADN recolhido em cenas de crime revela frequentemente variações no grau de degradação, influenciadas por diversos fatores ambientais. Estas variações podem comprometer a obtenção de perfis de STRs, resultando em dados incompletos ou inexistentes e, por vezes, impossibilitando a identificação da amostra. Portanto, é essencial avaliar não apenas a quantidade de ADN, mas também o seu nível de degradação (Knight et al., 2023; Vernarecci et al., 2015).

Por outro lado, em casos de misturas de material celular feminino e masculino, comuns em amostras recolhidas em vítimas de abuso sexual, obtém-se ADN em diferentes proporções. O conhecimento dessas proporções é crucial para selecionar os marcadores genéticos a estudar e determinar o volume necessário para as reações de amplificação. Para garantir a presença de ADN humano na amostra, bem como avaliar a sua concentração e integridade, realiza-se então um método de quantificação, conforme recomendado pelo Scientific Working Group on DNA Analysis Methods

(SWGDM), que deve preceder a amplificação dos marcadores genéticos de interesse forense (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, n.d.; Silva, 2022).

O kit de PCR em tempo real, Quantifiler® (Applied Biosystems™), permite quantificar a concentração de ADN durante cada ciclo de amplificação, sendo ideal para quantificação geral de ADN humano em amostras onde não é necessária a distinção entre ADN humano total e masculino. Por outro lado, o Quantifiler® Trio (Applied Biosystems™), oferece uma análise mais detalhada, diferenciando entre as concentrações de ADN humano total e masculino, o que o torna preferível para amostras complexas, com a escolha do kit a depender dos requisitos específicos da análise forense a ser realizada. Este kit permite ainda detetar a presença de inibidores através de um marcador de qualidade interno, designado por IPC e o índice de degradação das moléculas de ADN (Silva, 2022; Termo Fisher Scientific, 2018).

O kit Quantifiler® Trio facilita a estimativa da quantidade de ADN humano e masculino, mesmo em concentrações tão baixas como 5 pg/μl, medindo tanto a quantidade total de ADN humano como a quantidade de ADN masculino numa amostra, além de fornecer uma avaliação da qualidade do ADN, o que é crucial para orientar os procedimentos subsequentes de análise de ADN (Knight et al., 2023).

O kit fornece resultados de quantificação para quatro alvos específicos: o Short Autosomal Target (SAT), que quantifica o ADN genómico humano total e, devido ao menor tamanho do *amplicon*, é capaz de detetar amostras de ADN degradadas; o Large Autosomal Target (LAT), que serve como indicador da degradação do ADN ao ser comparado com o SAT; o Y-Target, especialmente útil em amostras mistas de ADN masculino e feminino, pois quantifica a quantidade de ADN masculino; e, por fim, o IPC, que verifica se a reação foi realizada corretamente, confirmando a presença de todos os componentes necessários e identificando possíveis inibidores de PCR na amostra (Health Support Queensland Forensic and Scientific Services, 2017). A figura 5.1 ilustra um exemplo típico de amplificação destes diferentes alvos, destacando a importância do IPC na validação dos resultados obtidos.

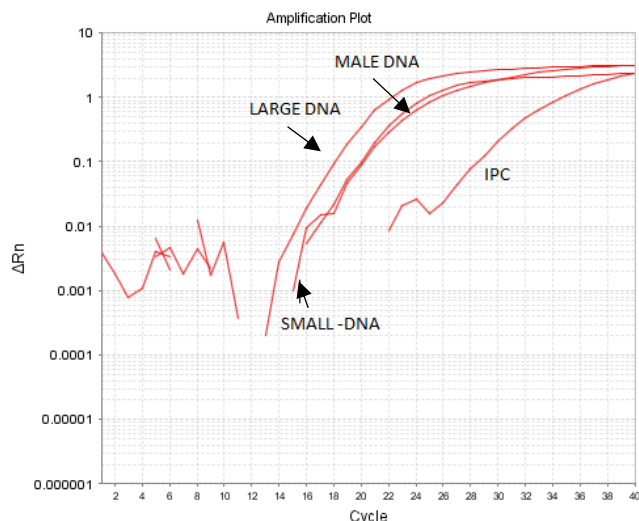


Figura 5.1 Gráfico de amplificação por RT-PCR mostrando a fluorescência normalizada (ΔRn) ao longo dos ciclos de PCR. As curvas representam a amplificação de diferentes tipos de DNA: masculino (“MALE DNA”), fragmentos grandes (“LARGE DNA”), fragmentos pequenos (“SMALL DNA”) e IPC.

Os resultados obtidos são essenciais para que o geneticista forense decida entre o uso de kits de amplificação para marcadores autossômicos ou marcadores do cromossoma Y. Os marcadores autossômicos são recomendados quando a desproporção de ADN feminino é, no máximo, 10 a 20 vezes superior à de ADN masculino. Em outras circunstâncias, deve-se utilizar o kit de marcadores do cromossoma Y para obter um perfil genético masculino completo, mesmo quando a concentração de ADN total é 1000 vezes superior à de ADN masculino. A falta de informação sobre as concentrações de ADN, tanto total quanto masculino, bem como a utilização de volumes inadequados nas reações de amplificação e na escolha dos kits, pode inviabilizar a obtenção de perfis genéticos identificativos de um sujeito (Silva, 2022).

Concluindo, a quantificação precisa e a avaliação da qualidade do ADN são passos fundamentais no processo de análise forense, pois asseguram que as amostras sejam adequadamente preparadas para a amplificação de marcadores genéticos. Esta verificação permite que os procedimentos subsequentes sejam realizados com maior eficácia e precisão, aumentando assim a probabilidade de obter perfis genéticos completos e utilizáveis para a identificação forense.

5.4. Amplificação por PCR

A PCR é uma técnica de biologia molecular que permite amplificar pequenas seções de ADN ou RNA, possibilitando a sua deteção por meio de eletroforese. A invenção de Kary Mullis revolucionou o diagnóstico molecular ao permitir a amplificação exponencial de

uma única molécula de ADN em mil milhões de cópias após 30 ciclos de PCR, utilizando a ADN polimerase.

Esta tecnologia possibilita a deteção rápida e específica de ADN, mesmo em quantidades mínimas, e é essencial na identificação de desordens genéticas, patógenos, agentes virais e bacterianos, incluindo bioterrorismo, além de permitir a identificação individual com alta precisão. A PCR tem uma ampla gama de aplicações, desde a clonagem de genes para pesquisa até diagnósticos de doenças genéticas, identificação forense, testes de paternidade e deteção de patógenos. A automatização da PCR aumentou a eficiência e reduziu o tempo de análise, expandindo as suas aplicações na biologia molecular e nos laboratórios médicos (Canene-Adams, 2013; Weiss, 2009).

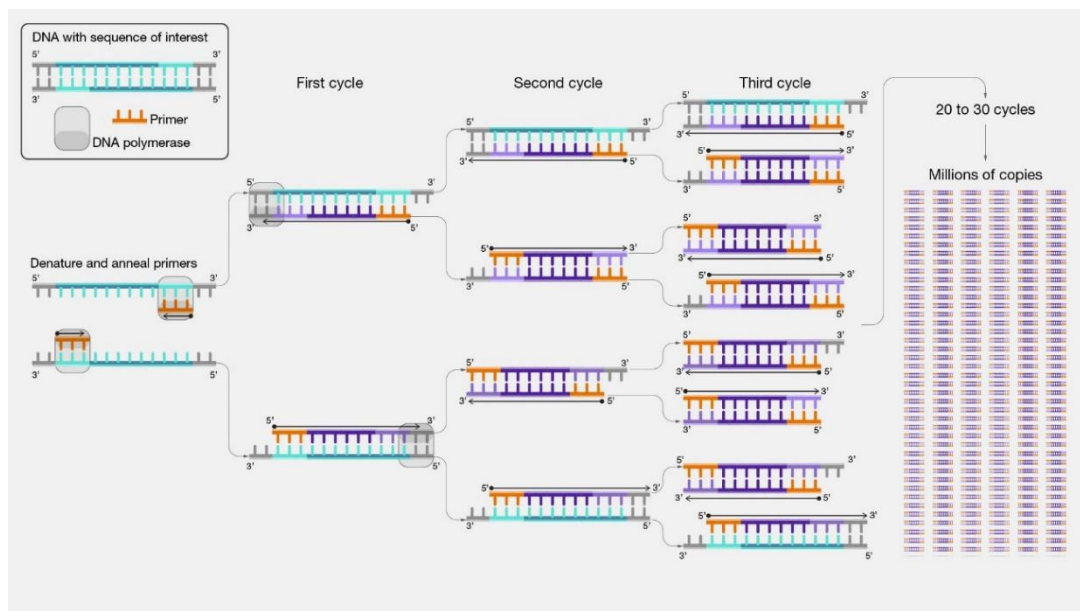


Figura 5.2 Representação do funcionamento da PCR. Fonte: Smith (2024). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>

A PCR é um método enzimático fundamental em biologia molecular para a amplificação de ADN. Este processo envolve um padrão de ciclos térmicos precisos, incluindo o aquecimento e arrefecimento das amostras ao longo de aproximadamente 30 ciclos, e consiste em três fases principais: desnaturação, anelamento e extensão. Inicialmente, a desnaturação ocorre a 94°C, momento em que o ADN de dupla hélice se separa em duas cadeias simples. Segue-se o anelamento, fase na qual a temperatura é ajustada entre 45 e 60°C, permitindo que os primers, curtos oligonucleótidos específicos para a sequência alvo, se liguem às suas sequências complementares no ADN molde. A última fase, a extensão, ocorre aproximadamente a 72°C, onde a enzima ADN polimerase

termoestável sintetiza novas cadeias de ADN, duplicando eficazmente a seção de interesse. Durante cada ciclo, uma cópia da sequência alvo de ADN é gerada para cada molécula que contém a sequência alvo, conforme representado na figura 5.2. Este ciclo é repetido geralmente mais de 25 vezes num termociclador, resultando na amplificação exponencial da região alvo, podendo gerar aproximadamente um bilhão de cópias da região alvo após cerca de 30 ciclos (Butler, 2001; Canene-Adams, 2013).

Os limites do produto amplificado são definidos por primers de oligonucleótidos que são complementares às extremidades 3' da sequência de interesse. Os 30 ciclos podem gerar cerca de um bilhão de cópias da região alvo no molde de ADN. Assim, este produto da PCR, estando agora em quantidade suficiente, pode ser facilmente medido por uma variedade de técnicas (Butler, 2001). A PCR é notável não apenas pela sua capacidade de amplificar seções específicas do ADN, mas também pela sua versatilidade em diversas áreas da ciência e medicina. Graças a esta técnica, é possível identificar relações genéticas, diagnosticar condições hereditárias e resolver crimes com uma precisão notável e eficiência (Canene-Adams, 2013).

5.5. Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar, uma técnica evoluída da eletroforese convencional, é um método eficaz para a separação de biomoléculas e iões, baseando-se nas velocidades distintas com que estes componentes migram sob a influência de um campo elétrico. Esta foi significativamente aprimorada pela introdução de capilares (Doroteo, 2012; Spudeit et al., 2012) e popularizou-se ao eliminar a necessidade de preparação de géis de poliacrilamida, permitindo a automação nas fases de injeção e deteção, além de utilizar uma quantidade reduzida de amostra, que pode ser retestada se necessário.

As amostras são preparadas diluindo uma pequena parte do produto PCR com formamida desionizada, que reduz a força iónica da amostra em comparação com o tampão. Apesar da formamida ser um forte desnaturante, é também comum submeter a amostra a um aquecimento rápido até 95°C e de seguida esfriá-la bruscamente em gelo para assegurar a desnaturação completa do ADN antes de o colocar no sequenciador.

Os fragmentos de ADN da solução são injetados no capilar por meio de injeção eletrocínica, uma técnica que utiliza alta voltagem para forçar a entrada dos fragmentos negativamente carregados (Butler et al., 2004). Esta técnica baseia-se no movimento induzido por um campo elétrico que desloca os iões positivos em direção ao

cátodo, arrastando consigo as moléculas de água e provocando um fluxo eletrosmótico. Este fluxo é crucial para transportar e separar as moléculas na mistura analisada, com a eficiência do processo sendo determinada por vários parâmetros como o tipo e a concentração do tampão, o pH, a temperatura da corrida, a voltagem aplicada e o tipo de polímero usado, além das propriedades físico-químicas das moléculas que influenciam a sua separação durante esta etapa (Spudeit et al., 2012).

Os capilares de sílica fundida apresentam múltiplas vantagens decorrentes das suas propriedades, como a eficaz dissipação do calor gerado pela corrente elétrica e a alta resistência a temperaturas, que permitem o uso de campos elétricos intensos. Adicionalmente, o reduzido volume de amostra necessário e a rapidez das análises contribuem para a viabilidade económica deste método. A presença de grupos silanóis na superfície interna da sílica, que se ioniza em meio aquoso perdendo um ião de hidrogénio e conferindo uma carga negativa à superfície, facilita a criação de um fluxo eletrosmótico através da interação com a solução que preenche o capilar (Spudeit et al., 2012).

O número de repetições STR e a posição dos primers definem o tamanho dos produtos de PCR, que irão ser separados por tamanho e cor do corante.

Pouco antes de atingir o eléctrodo positivo, os fragmentos de ADN separados cruzam um feixe de laser que induz a fluorescência dos corantes, captada por uma câmara CCD após separação por um sistema de difração. A capacidade de cada corante emitir luz a diferentes comprimentos de onda não apenas permite a deteção, mas também a distinção de todos os *loci* numa única injeção capilar.

Um padrão interno, contendo fragmentos de ADN de tamanho conhecido marcados com um corante de cor diferente, é usado para calibrar o tamanho das amostras entre análises, enquanto os tamanhos dos alelos de cada amostra são comparados com os tamanhos dos alelos presentes num *ladder* que contém alelos comuns previamente sequenciados. Este procedimento fornece resultados em menos de um dia útil, demonstrando a eficiência e a viabilidade da deteção por eletroforese capilar de marcadores STR através da PCR (Butler et al., 2004).

No âmbito do estágio no SGBF-S, a eletroforese capilar foi realizada utilizando o Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer e o SeqStudio Genetic Analyzer.

O Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer é um instrumento de análise genética avançado projetado para ambientes validados e regulamentados. Este sistema de 8

capilares utiliza polímeros POP-7, POP-6 e POP-4 e *arrays* de capilares de 36 cm e 50 cm, emprega um laser de estado sólido de 505 nm e um sistema térmico otimizado para controlo preciso da temperatura. A uniformidade de sinal entre corridas e capilares assegura análises precisas de fragmentos de ADN, enquanto a tecnologia RFID monitoriza o uso de consumíveis e avisa sobre a necessidade de substituições, melhorando a eficiência do laboratório. O software integrado permite a avaliação em tempo real da qualidade dos dados, facilitando a recolha e análise primária das amostras (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015).

O SeqStudio Genetic Analyzer, também um instrumento de análise genética avançado, possui 4 capilares e utiliza um cartucho integrado que minimiza o tempo de manipulação, reduzindo a margem de erro humano. Permite a realização simultânea de sequenciação Sanger e análise de fragmentos numa única corrida. A interface é interativa, com um ecrã tátil de fácil utilização, e o sistema inclui calibração automática, conectividade via Wi-Fi ou LAN e tecnologia RFID. O SeqStudio é compatível com placas-padrão de 96 poços e tiras de tubos de 8, permitindo aplicações como sequenciação Sanger, análise de *indels*, deteção de heterozigotos, identificação microbiana, verificação de edição genómica e análise de microssatélites. Com software de análise integrado e armazenamento interno de 128 GB, o sistema oferece alta eficiência e segurança de dados (Thermo Fisher Scientific Inc., 2020).

Os dados recolhidos são posteriormente analisados. O *software* GeneMapper desempenha também um papel crucial, convertendo os dados de fluorescência num eletroferograma. Este *software* avalia o tamanho relativo de cada fragmento de ADN, baseando-se numa curva padrão, e realiza a identificação de alelos através de *loci* específicos definidos pelo usuário (Applied Biosystems by Life Technologies, 2014).

Os utilizadores devem avaliar cuidadosamente a matriz de forma a prevenir o *cross-talk* entre os diferentes canais espectrais. Este problema manifesta-se pela produção de pequenos picos de cor diferente que ocorrem exatamente no mesmo tamanho que um pico maior de outra cor. Adicionalmente, podem ocorrer outros artefactos nos eletroferogramas, como *blobs* de corante residual e *spikes* a que o utilizador deve ter em atenção (Butler et al., 2004).

5.6. Kit PowerPlex® Fusion 6C System

O Kit PowerPlex® Fusion 6C System da Promega possui um alto poder de discriminação permitindo a amplificação simultânea de 27 *loci*, e é utilizado para a identificação

humana em diversas áreas, como análise forense, testes de parentesco e investigação científica.

O kit é produzido conforme a norma ISO 18385:2016 e fornece todos os materiais necessários para a amplificação de regiões STR do ADN genômico humano. Possui um sistema de seis corantes que possibilitam a amplificação e detecção fluorescente de 18 *loci* autossômicos que fazem parte do núcleo expandido do CODIS, incluindo CSF1PO, FGA, TH01, vWA, D1S1656, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433 e D21S11, além de Amelogenina e DYS391 para determinação de sexo. De forma a aumentar a capacidade de discriminação e facilitar a pesquisa em bases de dados, os *loci* Penta D, Penta E, D22S1045, TPOX e SE33 também são incluídos. Além disso, dois *loci* Y-STR de rápida mutação, DYS570 e DYS576, também fazem parte do kit. Este conjunto abrangente de marcadores STR atende às recomendações do CODIS e do European Standard Set (ESS) (Promega Corporation, 2023).

5.7. Kit Yfiler™ Plus

A aplicação de marcadores do cromossoma Y encontra-se amplamente consolidada na genética forense, sendo utilizada para obter perfis de ADN a partir de manchas resultantes de misturas desequilibradas de ADN masculino e feminino. Devido ao padrão de herança paterna do cromossoma Y, esses marcadores são também usados em análises de parentesco, estudos de genética populacional e investigações sobre a origem ancestral (Andersen et al., 2017).

O kit Yfiler Plus inclui primers capazes de amplificar 27 *loci* utilizando uma configuração de seis corantes. Esta configuração foi conseguida ao combinar alguns primers do Kit Yfiler original com novos primers especificamente desenvolvidos para o Kit Yfiler Plus.

Este kit incorpora os *loci* originalmente presentes no Yfiler (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 (Y GATA C4) e Y GATA H4) e adiciona dez novos *loci*. Entre estes, encontram-se três com alta variabilidade polimórfica (DYS460, DYS481 e DYS533) e sete bem caracterizados que apresentam mutação rápida (DYF387S1a/b, DYS449, DYS518, DYS570, DYS576, DYS627). A presença de Y-STRs de mutação rápida (RM-YSTRs) com taxas de mutação superiores a 1% melhora a capacidade de discriminação entre indivíduos do sexo masculino que possuem parentesco (Thermo Fisher Scientific Inc., 2019).

O kit Yfiler Plus é um kit versátil destinado à amplificação eficaz de amostras de ADN extraídas de investigações forenses, bem como à amplificação direta de amostras de referência de sangue e saliva em diversos substratos, incluindo papel tratado e não tratado, e cotonetes. Este kit é especialmente adaptado para amplificar o ADN masculino mesmo na presença de quantidades significativas de ADN feminino, proporcionando resultados mais rápidos em comparação com o kit Yfiler (Gopinath et al., 2016; Thermo Fisher Scientific Inc., 2019).

5.8. Kit Investigator® Argus Y-28 QS

Os kits comerciais de Y-STR permitiram aos laboratórios analisar *loci* Y-STR adicionais e aumentar o poder discriminatório entre indivíduos estreitamente relacionados do sexo masculino, essencial na investigação forense, determinação de paternidade e genealogia genética (Decker et al., 2007). O Kit Investigator® Argus Y-28 QS, desenvolvido pela QIAGEN e apresentado na figura 5.3, representa um avanço significativo na análise de marcadores Y-STR, particularmente na identificação de perfis genéticos masculinos em amostras que apresentam misturas de ADN masculino e feminino. Este kit é produzido seguindo normas de qualidade rigorosas, conforme estabelecido pela ISO 18385, o que assegura a sua confiabilidade e consistência (QIAGEN, 2022).



Figura 5.3 Kit Investigator® Argus Y-28 QS. Fonte: <https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/investigator-solutions/investigator-argus-y-28-qs-kit?catno=383625>

Para melhorar a precisão e robustez na identificação genética, o kit incorpora primers otimizados que permitem a amplificação de quantidades mínimas de ADN masculino, tolerando até 3 µg de ADN feminino sem amplificação. Além disso, o kit apresenta

elevada resistência a diversos inibidores comuns em amostras forenses, como hematina e ácido húmico, assegurando a obtenção de perfis completos mesmo em condições adversas (Vraneš et al., 2022).

A tecnologia de *Fast Reaction Mix 3.0* permite a amplificação simultânea de 27 loci STR do cromossoma Y, otimizada para alta sensibilidade e especificidade, sendo particularmente útil em contextos forenses, como nos casos de abuso sexual, onde o ADN masculino está frequentemente em proporções inferiores em comparação com o ADN feminino. O estudo de sensibilidade do kit, apresentado na validação de desenvolvimento de Vraneš et al. (2022), revelou que é possível obter perfis genéticos completos a partir de apenas 125 pg de ADN masculino, mesmo na presença de inibidores e grandes quantidades de ADN feminino. A capacidade de gerar perfis de ADN masculino de forma rápida e eficaz, sem necessidade de procedimentos adicionais, representa um avanço significativo na eficiência e velocidade de processamento das amostras. Estes resultados demonstram a robustez do kit em fornecer dados fiáveis e precisos, melhorando a eficiência do processo de amplificação e reduzindo o tempo necessário para obter resultados (QIAGEN, 2022; Vraneš et al., 2022).

Adicionalmente, o kit inclui dois controlos internos de PCR, QS1 e QS2, que monitorizam a eficácia da reação de PCR e a presença de inibidores, contribuindo para a precisão e fiabilidade dos resultados. Para resolver problemas de semelhança sequencial e ligação não específica, o kit inclui um controlo interno de ADN sintético, cuja sequência única minimiza a possibilidade de erros nas reações de PCR. A amplificação bem-sucedida do QS1 indica que a PCR foi executada corretamente, independentemente da presença ou ausência de ADN na amostra, enquanto a não deteção dos indicadores de qualidade sugere potenciais erros na pipetagem ou na reação de PCR, tornando essencial repetir a análise para assegurar resultados fiáveis (QIAGEN, 2022).

A análise conjunta dos indicadores de qualidade e dos produtos de amplificação de STR permite identificar a presença de inibidores ou degradação de ADN na reação de amplificação. Em caso de degradação da amostra, é esperada uma proporção igual de QS1 e QS2, bem como uma proporção favorável de produtos STR de menor tamanho. Se a amostra apresentar inibidores, a amplificação será menos eficiente, resultando numa amplificação reduzida de fragmentos de ADN de maior tamanho comparativamente aos de menor tamanho. Assim, a amplificação bem-sucedida do

QS1, mas não do QS2, sugere contaminação da amostra com inibidores (QIAGEN, 2022).

Os marcadores genéticos utilizados no Kit Investigator® Argus Y-28 QS são identificados através de primers fluorescentes, etiquetados com os seguintes corantes: 6-FAM™ (DYS389-I, DYS391, DYS389-II, DYS533, DYS390, DYS627), BTG (DYS458, DYS393, DYS19, DYS437, DYS449), BTY (DYS460, DYS576, YGATAH4, DYS481, DYS448, DYS518), BTR2 (DYS439, DYS549, DYS438, DYS456, DYS643) e BTP, que amplifica os sensores de qualidade QS1 e QS2, bem como os marcadores DYS570, DYS635, DYS385 e DYS392. O kit inclui também seis marcadores de mutação rápida (DYS449, DYS481, DYS570, DYS576, DYS518 e DYS627), extremamente úteis para discriminar indivíduos do sexo masculino estreitamente relacionados (QIAGEN, 2022).

Com todas essas características, o Kit Investigator® Argus Y-28 QS é uma ferramenta essencial para a análise genética forense, oferecendo resultados precisos e fiáveis em cenários complexos. A sua capacidade de amplificar 27 *loci* STR do cromossoma Y com alta sensibilidade e especificidade é crucial em contextos forenses, como casos de abuso sexual, onde o ADN masculino está em proporções inferiores ao ADN feminino. O kit garante perfis completos mesmo na presença de inibidores como hematina e ácido húmico e pode gerar perfis a partir de apenas 125 pg de ADN masculino (QIAGEN, 2022; Vraneš et al., 2022).

6. Metodologia prática aplicada

As metodologias utilizadas nas ciências forenses e nas tecnologias clínico-laboratoriais são fundamentais para a obtenção de resultados precisos e confiáveis, exigindo uma integração de conhecimentos teóricos avançados e competências práticas especializadas, tendo em conta a complexidade das análises e a sensibilidade das amostras envolvidas. A prática metodológica durante o estágio foi viabilizada apenas após a obtenção da qualificação necessária e a conclusão de uma formação de qualidade, dada a natureza sensível das amostras. Este processo incluiu um treino em protocolos laboratoriais, normas de segurança e técnicas analíticas, como a extração e amplificação de ADN.

A formação prática possibilitou a aplicação direta destas técnicas sob supervisão, garantindo competência técnica e confiança na execução das tarefas. Desta forma, assegurou-se a preparação adequada para o processamento de amostras sensíveis, em conformidade com as exigências científicas e éticas.

6.1. Extração de ADN pelo método de Chelex® 100

A extração foi efetuada pelo método de Chelex® 100 e de acordo com o procedimento operacional do INMLCF “PO-SGBF-S-010 -Extração de ADN a partir de zaragatoas bucais e de manchas de sangue com Chelex® 100”, ilustrado na figura 6.1.

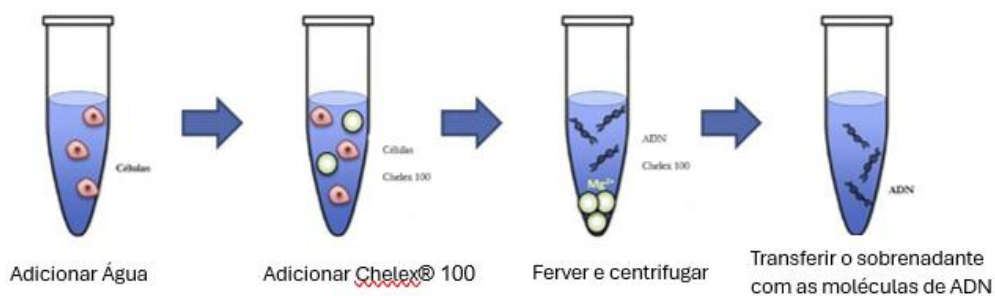


Figura 6.1 Representação do procedimento de chelex-100. Adaptado do livro “Tratado de Medicina Legal – Criminalística Biológica” (2022)

Foram selecionadas 42 amostras, recolhidas em zaragatoa bucal, provenientes de casos estudados no SGBF. O procedimento laboratorial tem início com o corte de uma pequena porção da zaragatoa (aproximadamente um dente da zaragatoa) de cada indivíduo para tubos identificados previamente, adiciona-se 1 mL de água ultrapura a cada um e deixa-se incubar durante cerca de 20 minutos. Posteriormente, agita-se no *vortex* numa rotação baixa e centrifuga-se durante 4 minutos. Em seguida, retira-se com

cuidado cerca de 900 μL de sobrenadante e adiciona-se 170 μL da solução de Chelex a 5% a cada tubo, a qual deve ser homogeneizada de cada vez que for aspirada. Seguidamente, os tubos são colocados num banho de aquecimento a 56°C com agitação durante cerca de 15 minutos, seguindo-se a colocação dos tubos noutra banho de aquecimento a 100°C. Após o banho, os tubos são centrifugados durante 5 minutos. De seguida, as amostras poderão ser armazenadas no congelador até serem utilizadas na próxima etapa de análise.

Durante o período de estágio foram extraídas com este método 42 amostras, que foram posteriormente utilizadas para amplificação e eletroforese.

6.2. Extração de ADN pelo método de PrepFiler™ Express

O procedimento utilizado para a extração de ADN pelo método de PrepFiler™ Express, ilustrado na figura 6.2, seguiu as diretrizes estabelecidas pela Applied Biosystems by Life Technologies (2010).

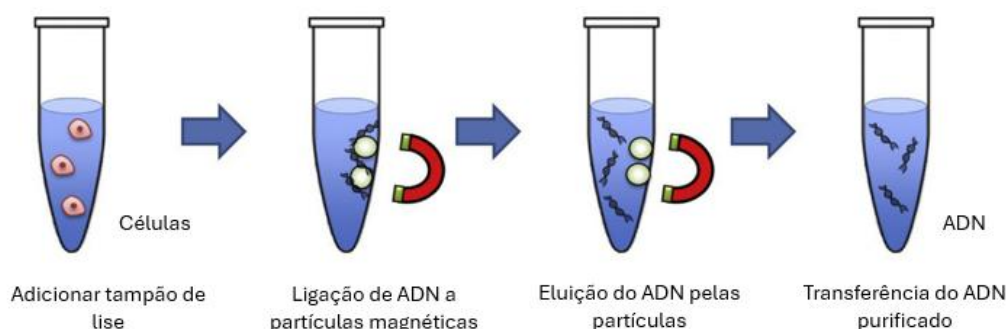


Figura 6.2 Representação do método de extração. Adaptado do livro "Tratado de Medicina Legal – Criminalística Biológica" (2022)

Para iniciar a extração de ADN, prepara-se uma solução de 1,0 M de Ditiotretol (DTT), dissolvendo-se 1,54 g de DTT em 10 mL de água livre de nucleases. Em seguida, prepara-se uma solução de lise fresca, misturando 500 μL de Tampão de Lise com 5 μL de DTT a 1 M recém-preparado. Uma coluna LySep é inserida num tubo de amostra PrepFiler™ sem dobradiça, formando o conjunto 'coluna/tubo', no qual a amostra é cuidadosamente transferida para a coluna LySep. Adicionam-se 500 μL da solução de lise recém-preparada ao conjunto coluna/tubo, assegurando que toda a amostra fique submersa, a fim de garantir uma recuperação eficaz do ADN. O conjunto coluna/tubo é, então, colocado num agitador térmico, onde é incubado a 70°C e 750 rpm durante 40 minutos, seguido de centrifugação durante 2 minutos a 10.000 $\times g$ para transferir o lisado para o tubo de amostra (Applied Biosystems by Life Technologies, 2010).

Caso o volume do lisado seja inferior a 300 µl, realiza-se uma nova centrifugação por mais 5 minutos. Se o volume ainda for inferior a 300 µl, deve-se adicionar Tampão de Lise até alcançar o volume necessário de 300 µl, garantindo assim a ligação eficaz do ADN às partículas magnéticas e evitando a formação de bolhas de ar na ponta durante a extração automatizada. A coluna LySep é, então, removida cuidadosamente do tubo de amostra e qualquer lisado claro restante na coluna deve ser transferido para o tubo de amostra. O procedimento prossegue diretamente para a extração automatizada no Instrumento AutoMate Express™, que consiste na purificação do produto lisado descrito. Esta purificação consiste numa série de lavagens com vários reagentes químicos, disponibilizados em cartuchos fornecidos em conjunto com o kit Thermo Fisher Scientific PrepFiler Express™, sendo usado um cartucho para cada amostra. A sua utilização consiste numa ligeira agitação para ressuspensão das partículas magnéticas e garantia que quaisquer partículas ou gotas de líquido se depositem sob o selo de alumínio nos compartimentos (Applied Biosystems by Life Technologies, 2010).

Os cartuchos de reagentes são colocados no suporte de cartuchos, deslizando cada cartucho ao longo da ranhura na direção da seta até encaixar no lugar, garantindo o alinhamento correto dos entalhes. Os suportes de cartuchos e de pontas e tubos são inseridos no instrumento. Na fila S, quarta fila, são colocados os tubos de amostra PrepFiler™ contendo o lisado, enquanto na fila T2, terceira fila, são colocadas as pontas AutoMate Express™. A fila T1 permanece vazia. Na fila E, primeira fila, são colocados os tubos de eluição PrepFiler™ com as tampas abertas e fixas. Após verificar que todos os suportes estão corretamente inseridos, a porta do instrumento é fechada.

No final do processo, ao ouvir o sinal sonoro e com a indicação de conclusão no visor, os suportes de cartuchos e de pontas e tubos são removidos, e os tubos de eluição contendo o ADN purificado são tapados (Applied Biosystems by Life Technologies, 2010).

Dada a complexidade destas amostras biológicas, especialmente devido à sua natureza única, a minha experiência com esta metodologia consistiu em acompanhar e participar em algumas fases do processo, nomeadamente nas ações de centrifugação e preparação dos reagentes para introdução no equipamento automático.

6.3. Amostras quantificadas através do Quantifiler® Trio (Applied Biosystems)

O Quantifiler® Trio é um kit que facilita a estimativa precisa das concentrações de ADN humano e masculino, mesmo que estas tenham o mínimo de 5 pg/µl. Este kit não se

limita apenas à determinação das concentrações de ADN humano existentes nas amostras em estudo, mas também oferece uma avaliação sobre a sua qualidade. Esta informação revela-se fundamental para a tomada de decisões quanto aos procedimentos de análise de ADN que se seguirão, com o objetivo de determinar um perfil genético tão completo quanto possível (Knight et al., 2023).

O procedimento do kit Quantifiler® Trio da Thermo Fisher Scientific (2018) começa pela criação de um novo projeto utilizando o software HID Real Time PCR Analysis. Após a descontaminação da sala e o descongelamento das amostras extraídas, inicia-se a preparação de cinco amostras padrão que serão utilizadas para a realização da curva de regressão da quantificação. Estas amostras são preparadas através de diluições sucessivas da solução stock de THP, que contém uma concentração inicial de 100 ng/μL. Devem também ser utilizados de um a três controlos positivos, nomeadamente a solução THP não diluída, o controlo 007, ADN masculino a 0,1 ng/μL, o controlo 9947A, ADN feminino a 0,1 ng/μL, e um controlo negativo (NTC) (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Prepara-se uma solução de reação para N+3 amostras, incluindo os controlos e as amostras padrão. Deve-se calcular 10 μL de Reaction Mix por amostra e 8 μL de Primer Mix por amostra. De seguida, homogeneiza-se esta mistura, centrifuga-se brevemente e distribui-se pelos poços ou tubos. Adicionam-se, então, 2 μL das amostras em estudo, das amostras padrão e dos controlos. Após a centrifugação das amostras, estas são colocadas no equipamento de PCR em tempo real ABI Prism 7500 e inicia-se a reação.

Após a conclusão da reação, os resultados podem ser exportados juntamente com o relatório final da quantificação (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Durante o período de estágio foram realizadas a quantificação de 42 amostras, cujos resultados obtidos, no anexo 1, foram posteriormente utilizados para a fase de amplificação de marcadores autossómicos e do cromossoma Y.

6.4. Procedimento do Kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega)

As 42 amostras extraídas pelo método de Chelex® 100 foram amplificadas com o kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega), seguindo o procedimento da Promega Corporation (2023). Este procedimento descreve as diferentes fases a executar na amplificação de marcadores genéticos com este kit comercial com o objetivo de determinar o perfil genético do indivíduo, conforme exemplificado no Anexo 2, que apresenta um perfil genético parcial obtido.

Para preparar as amostras de ADN extraído para amplificação é necessária uma mistura de reação que contém água, a *Master Mix* e a *Primer Pair Mix*, que deve ser levada ao *vortex* e, em seguida, ser distribuída por cada tubo de PCR. Adiciona-se, então, o ADN de cada amostra em cada tubo e acrescenta-se água até perfazer o volume total da reação. O volume de ADN utilizado na amplificação está relacionado com a concentração determinada no método de quantificação. No ensaio é acrescentado um tubo extra que corresponde ao controlo negativo e no qual consta apenas água. Para o controlo positivo deve ser colocado o ADN controlo, previamente diluído entre 1:10 e 1:20.

Após uma breve centrifugação, todos os tubos são colocados no termociclador com o programa representado na tabela 6.1.

| Incubação inicial | 29/30 ciclos | | Extensão final | Último passo |
|-------------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|
| | Desnaturação | <i>Annealing</i> / Extensão | | |
| 96° C | 96° C | 60°C | 60°C | 4°C |
| 1 min. | 5 seg. | 1 min. | 10 min. | ∞ |

Tabela 6.1 Programa do termociclador adequado ao kit PowerPlex® Fusion 6C System (Adaptado de Promega Corporation (2023))

Concluído o programa, os tubos de PCR devem ser armazenados no frigorífico ou deve prosseguir-se para a fase de análise. Na segunda fase, o produto amplificado é sujeito a eletroforese capilar, o que implica a preparação das amostras para a eletroforese no sequenciador automático. O número de amostras a analisar e o sequenciador disponível, determinam o número de eletroforeses a realizar. Em geral, é adicionado um *ladder* por cada eletroforese. Nesta fase, é essencial preparar uma mistura de formamida e *size standard*, agitando-a no *vortex*. Esta mistura é então distribuída pelos poços, onde são colocadas as amostras e os *ladders*, sendo que a formamida é também adicionada aos poços não utilizados na mesma corrida. A placa é tapada com uma septa e levada a centrifugar durante breves segundos. Em seguida, é transferida para o termociclador e submetida ao programa representado na tabela 6.2.

| | | |
|-----------------------------|-------|---------|
| Temperatura (°C) | 95°C | 4°C |
| Tempo (min/seg) | 3 min | 30 seg. |

Tabela 6.2 Programa do termociclador (Adaptado de Promega Corporation (2023))

Quando o programa é concluído, a placa é posicionada numa base apropriada, conforme o sequenciador, e inicia-se a eletroforese previamente programada com os parâmetros adequados.

No final das corridas, os dados gerados devem ser cuidadosamente analisados utilizando o *software* GeneMapper ID-X da Applied Biosystems. Este programa permite a visualização detalhada e a interpretação dos perfis genéticos obtidos. Após a análise, os resultados devem ser exportados e compilados para serem incluídos no relatório final. Este relatório documentará todas as etapas do processo, bem como os perfis genéticos resultantes, assegurando uma apresentação clara e completa das conclusões obtidas (Promega Corporation, 2023; Silva, 2020).

Nesta fase do trabalho, foram estudadas as 42 amostras, com o objetivo de qualificação, de acordo com a metodologia em vigor no Serviço.

6.5. Procedimento do kit Yfiler™ Plus (Applied Biosystems™)

Das 42 amostras iniciais foram utilizadas 24 amostras extraídas pelo método de Chelex® 100, correspondentes aos indivíduos masculinos, e amplificadas com o kit Yfiler™ Plus (Applied Biosystems™), seguindo o procedimento operacional do SGBF, designado por “Amplificação e análise de ADN do cromossoma Y (Y-STRs) com Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit”. Este procedimento descreve a amplificação do haplótipo do cromossoma Y, isto é, do perfil genético resultante dos STRs do cromossoma Y, conforme exemplificado no Anexo 3, que apresenta um perfil genético parcial obtido com este kit.

Inicialmente, as amostras de ADN extraído são descongeladas e os tubos de PCR são numerados conforme o número de amostras a amplificar, incluindo dois tubos adicionais para os controlos positivo e negativo da PCR.

Prepara-se uma mistura de reação contendo Low TE Buffer, Master Mix e Primer Set, calculada para o número de amostras, mais um excedente, evitando que a mistura seja insuficiente. A mistura é homogeneizada no *vortex* e distribuída por cada tubo de PCR; em seguida, adiciona-se cada amostra de ADN, o controlo positivo, que contém o ADN controlo previamente diluído, e o controlo negativo, que contém apenas o *buffer*. Os tubos são então centrifugados e colocados no termociclador, seguindo o programa da tabela 6.3.

| Incubação inicial | 28/30 ciclos | | Extensão final | Último passo |
|-------------------|--------------|----------------------|----------------|--------------|
| | Desnaturação | Annealing / Extensão | | |
| 95° C | 94° C | 61,5°C | 60°C | 4°C |
| 1 min. | 4 seg. | 1 min. | 22 min. | ∞ |

Tabela 6.3 Programa do termociclador adequado ao kit Yfiler™ Plus (Adaptado de Thermo Fisher Scientific Inc. (2019))

Após a conclusão do programa, os tubos são armazenados no frigorífico ou prossegue-se para a fase seguinte. Na fase de aplicação das amostras no sequenciador automático, os reagentes são descongelados e agitados no *vortex*. Prepara-se uma nova mistura contendo formamida e Size Standard, calculada para todas as amostras, *ladders*, geralmente um por corrida, e um excedente. A mistura é novamente agitada no *vortex* e dividida pelos poços da placa a ser analisada. Adicionam-se as amostras de ADN, o *ladder* e a formamida aos poços não utilizados nas corridas a serem analisadas.

A placa é tapada com uma tampa septa e submetida a uma breve centrifugação. As amostras são desnaturadas durante alguns minutos, conforme o programa da Tabela 6.4.

| | | |
|-------------------------|-------|---------|
| Temperatura (°C) | 95°C | 4°C |
| Tempo (min/seg) | 3 min | 30 seg. |

Tabela 6.4 Programa do termociclador (Adaptado de Thermo Fisher Scientific Inc. (2019))

Após a conclusão do programa, a placa é colocada numa base adequada, de acordo com o sequenciador a ser utilizado. Finalmente, configura-se a corrida de acordo com

os parâmetros apropriados e as amostras são colocadas no sequenciador. No final das corridas, as amostras são analisadas através do software GeneMapper ID-X da Applied Biosystems (Dourado et al., n.d.; Thermo Fisher Scientific Inc., 2019).

6.6. Procedimento do kit Investigator® Argus Y-28 QS

Foram utilizadas as 24 amostras extraídas pelo método de Chelex, seguindo o protocolo do kit Investigator® Argus Y-28 QS da QIAGEN (2022) para a amplificação por PCR. Para comparação, o mesmo perfil genético apresentado no Anexo 3 foi analisado utilizando este kit, conforme exemplificado no Anexo 4.

Inicialmente, os componentes da PCR e as amostras são descongelados e centrifugados brevemente. Em seguida, prepara-se a Master Mix, que contém a Fast Reaction Mix 3.0, a Primer Mix e água livre de nucleases. Esta mistura é preparada em quantidade suficiente, agitada no *vortex* e distribuída por todos os poços ou placas de PCR, incluindo os controlos positivo e negativo. Após a distribuição da Master Mix, adicionam-se as amostras. O controlo positivo contém ADN de controlo, e o controlo negativo apenas água. Posteriormente, os tubos são centrifugados e colocados no termociclador, de acordo com o programa da Tabela 6.5.

| | | 30 ciclos | | | | |
|---------|---------|-----------|---------|--------|--------|------|
| 96° C | 96° C | 61,5°C | 72°C | 68°C | 60°C | 10°C |
| 12 min. | 10 seg. | 1.25 min. | 22 min. | 5 min. | 5 min. | ∞ |

Tabela 6.5 Programa do termociclador adequado ao kit Investigator® Argus Y-28 QS. Adaptado de QIAGEN (2022)

Quando o programa estiver concluído, as amostras podem ser colocadas no congelador ou devem prosseguir para a próxima fase. Para preparar as amostras para o sequenciador, é necessário preparar uma mistura de formamida juntamente com o DNA Size Standard BTO, considerando o número de amostras, o número de *ladders* (geralmente um por corrida) e os controlos positivo e negativo da PCR. Esta mistura deve ser agitada no *vortex* e dividida pelos tubos que serão analisados. Todos os tubos da mesma corrida que não contenham amostra devem receber formamida.

Em seguida, distribui-se a amostra em cada poço, o *ladder* nos locais adequados, assim como os controlos positivo e negativo. O termociclador é utilizado durante alguns minutos para desnaturar, conforme descrito na Tabela 6.6.

| | | |
|-------------------------|-------|---------|
| Temperatura (°C) | 95°C | 4°C |
| Tempo (min/seg) | 3 min | 30 seg. |

Tabela 6.6 Programa do termociclador Adaptado de QIAGEN (2022)

Quando o programa estiver concluído, as amostras são colocadas no suporte indicado, de acordo com o sequenciador a ser utilizado (QIAGEN, 2022).

Por fim, configura-se a corrida no sequenciador, ajustando todos os parâmetros necessários para garantir a correta execução do processo. O equipamento é programado conforme as especificações do protocolo do kit Investigator® Argus Y-28 QS, assegurando a precisão e a fiabilidade dos resultados.

No final da corrida, os dados são transferidos para o software GeneMapper ID-X, que permite uma análise detalhada e precisa dos perfis de ADN, facilitando a interpretação e validação dos dados genéticos. Isso garante que todas as informações relevantes sejam corretamente interpretadas e documentadas para fins forenses (QIAGEN, 2022).

6.7. Validação do Kit Investigator® Argus Y-28 QS

Durante o estágio, foi possível participar parcialmente na validação do Kit Investigator® Argus Y-28 QS, utilizado na análise de marcadores genéticos do cromossoma Y. Este processo é crucial para assegurar a eficácia e fiabilidade do kit em contextos forenses.

Para validar o Kit Investigator® Argus Y-28, é essencial adotar um protocolo que abranja várias fases críticas para a sua homologação. Segundo o protocolo de Validação de Ensaio (2020) do INMLCF, a validação inicia-se com a seleção do método a ser validado, seguida pela análise aprofundada do seu fundamento teórico e dos critérios de validação, prosseguindo-se com uma avaliação direta e indireta. Todos os resultados são compilados num relatório exaustivo, complementado pela descrição detalhada do procedimento.

A avaliação direta foi realizada por comparação com um kit previamente validado, neste caso, o Yfiler™ Plus (Applied Biosystems). Por outro lado, a avaliação indireta consistiu na análise da especificidade, assegurando que o kit amplifica exclusivamente ADN humano, sem interferência de outras espécies, e na análise de sensibilidade, contribuindo para estabelecer os valores mínimos de concentração de ADN que permitem a obtenção de um perfil genético com resultados precisos. Outros quesitos necessários para a validação indireta, nomeadamente a presença de inibidores, repetibilidade ou precisão do método, não foram realizados devido a algumas condicionantes laboratoriais. No que diz respeito à análise de potenciais inibidores, a avaliação é complexa, pois as amostras de referência utilizadas não estão, em geral, sujeitas a inibidores comuns em amostras de cenas de crime.

A fase final da validação envolve a realização de testes interlaboratoriais, fundamentais para testar a eficácia e adequação do método em questão.

Na avaliação indireta de um método, é crucial realizar uma análise que abranja especificidade, sensibilidade, precisão, repetibilidade, potenciais contaminações e misturas, além da influência de inibidores, considerando amostras que reflitam a variedade encontrada em ambientes laboratoriais reais.

De acordo com o procedimento interno do SGBF-S, para a análise da especificidade, devem ser utilizadas mais de 10 amostras de diferentes espécies, que devem dar resultado negativo, demonstrando que o kit é específico para o ADN humano.

A análise da sensibilidade visa determinar as concentrações ótimas de ADN em amostras biológicas, assegurando resultados fiáveis. Inicia-se com a seleção de pelo menos cinco amostras representativas, seguida pela estimativa ou conhecimento prévio da concentração de ADN. Realizam-se diluições em série das amostras, avaliando-se a quantidade de ADN em cada diluição. Este processo permite estabelecer a quantidade mínima de ADN suficiente para gerar um perfil genético válido.

A avaliação da precisão é essencial para assegurar a fiabilidade dos resultados obtidos. Mede-se pela capacidade de um método distinguir alelos que diferem entre si por cerca de um ou dois pares de bases. Devem ser selecionadas pelo menos dez amostras de perfis genéticos já conhecidos, especialmente com alelos que apresentem estas diferenças. Um exemplo seria a análise do locus TH01, onde os alelos 9.3 e 10 são de interesse devido à sua proximidade. Através da aplicação de um procedimento de avaliação específico a estas amostras, é possível verificar se o método consegue

identificar claramente os alelos diferenciados, garantindo assim a sua precisão. Para realizar este método é necessário ter algumas amostras com características genéticas próprias, cuja seleção não foi possível durante a realização deste estágio.

A repetibilidade implica que, sob as mesmas condições, o método deve sempre produzir o mesmo resultado. Para validar a repetibilidade, é aconselhável selecionar um conjunto de pelo menos cinco amostras com perfis genéticos previamente conhecidos. Ao aplicar o procedimento de ensaio repetidamente, por exemplo, em triplicado, a cada uma destas amostras, pode avaliar-se se o método é capaz de reproduzir os mesmos resultados consistentemente, sem variação. Esta etapa é fundamental para assegurar que o método seja fiável e que os resultados sejam consistentes ao longo do tempo e entre diferentes execuções.

Na avaliação da contaminação e misturas, é crucial analisar controlos negativos juntamente com amostras reais, eliminando a possibilidade de contaminação nas fases de extração e amplificação do ADN. Preparam-se pelo menos cinco amostras reais, às quais se adiciona material genético humano não relacionado em proporções variadas (1:50, 1:10, 1:1), criando condições controladas de contaminação. Ao inserir estas amostras intencionalmente contaminadas aleatoriamente num lote de amostras não contaminadas e prosseguir com o ensaio, é possível avaliar a eficácia do método em diferenciar amostras contaminadas das não contaminadas. Importa também verificar a capacidade do método de identificar múltiplos perfis genéticos numa única amostra, aspeto essencial para detetar misturas de material genético de diversos indivíduos. Este procedimento é vital para garantir a fiabilidade dos perfis genéticos obtidos, sobretudo em ambientes forenses, onde contaminações ou misturas podem afetar gravemente a validade dos resultados.

A presença de inibidores no processo de análise de ADN pode comprometer significativamente a precisão e a fiabilidade dos resultados. Inibidores são substâncias ou condições que afetam negativamente a reação de amplificação do ADN, podendo ser de natureza química, como terra, detergentes, óleo, ou outros fluidos biológicos como fezes e urina. Além disso, fatores físicos, tais como a antiguidade da amostra, exposição ao calor ou à humidade, também podem atuar como inibidores, afetando a integridade do material genético.

Para avaliar a robustez de um método quanto à presença de inibidores, é aconselhável preparar um mínimo de cinco amostras, incorporando diversos tipos de inibidores comuns encontrados em situações reais, em diferentes proporções (*por exemplo*, 1:10,

1:1, 10:1), criando misturas controladas. Estas amostras devem ser introduzidas aleatoriamente num conjunto de amostras não contaminadas, para posterior análise.

De forma semelhante, para avaliar o impacto de inibidores físicos, prepara-se um número igual ou superior a cinco amostras reais, submetendo-as a condições controladas que simulam fatores como exposição prolongada ao calor, humidade ou degradação pelo tempo. Estas amostras são, então, aleatoriamente incorporadas num lote que não foi exposto a esses agentes.

Estas estratégias permitem determinar a capacidade do método de análise de ADN para manter a precisão e a fiabilidade dos resultados, mesmo sob a influência de inibidores. Garantir resultados fiáveis, independentemente da presença de potenciais inibidores, é crucial em qualquer procedimento de análise genética, especialmente em contextos forenses, onde a qualidade das amostras pode variar consideravelmente.

Para a avaliação direta de um método analítico, especialmente em contextos forenses, é essencial compará-lo com procedimentos previamente homologados e realizar testes interlaboratoriais. Esta fase crucial envolve a análise de pelo menos 24 amostras representativas das atividades habituais do laboratório, cada uma analisada em duplicado. Essa abordagem permite uma comparação rigorosa entre o método em validação e um já estabelecido, assegurando a consistência dos resultados e confirmando a fiabilidade e exatidão do método testado, o que sustenta a sua validade no contexto laboratorial.

Adicionalmente, a realização de comparações interlaboratoriais, realizadas através da calibração com padrões conhecidos ou materiais de referência (MRC), são fundamentais nesta avaliação. Os MRC, classificados como primários quando emitidos por organismos internacionais com certificado de qualidade, ou secundários quando derivados dos primeiros e certificados por outras entidades, são indispensáveis para garantir a precisão das análises. A utilização desses materiais permite uma comparação objetiva e padronizada entre diferentes laboratórios, reforçando a confiança nos métodos analíticos utilizados. Esta abordagem metódica assegura que os métodos sejam rigorosamente testados e validados, garantindo a fiabilidade dos resultados analíticos obtidos (Cerqueira, 2020).

6.7.1. Análise da Sensibilidade (Avaliação indireta)

O processo de análise da sensibilidade iniciou-se com a seleção de cinco amostras de ADN, escolhidas para representar várias concentrações: duas com alta concentração

de ADN, duas com baixa concentração e uma com concentração média. Esta seleção permitiu avaliar a capacidade do kit de análise genética em amplificar ADN em condições variadas, o que é essencial para a sua aplicação em contextos forenses, onde as amostras podem apresentar grande variabilidade.

Para garantir a validade e a eficiência do kit em diferentes equipamentos, essas amostras foram analisadas utilizando dois sequenciadores, o 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e o SeqStudio (Applied Biosystems). Em cada equipamento, realizaram-se testes com volumes de reação de 25 µL e 12,5 µL. O objetivo destes testes era demonstrar que o kit pode ser utilizado eficazmente com volumes de reação reduzidos, promovendo a economia de reagentes sem comprometer a qualidade dos resultados.

Os resultados obtidos, no anexo 3, mostram que não existem diferenças significativas entre os perfis genéticos gerados nos diferentes volumes de reação, validando a possibilidade de usar metade do volume habitual. Este dado é particularmente relevante, pois indica que o kit pode ser utilizado de forma mais eficiente, maximizando o número de análises possíveis com a mesma quantidade de reagentes.

6.7.2. Especificidade (Avaliação indireta)

O objetivo deste ensaio é provar que este kit só deteta informação genética da espécie humana. Procedemos ao estudo da especificidade através da análise de amostras animais de 11 espécies diferentes. nomeadamente, o cavalo, o burro, o suíno, a vaca, o cão, o gibão, o rinoceronte, o gato pescador, o macaco uivador, o lémure e o gorila.

Após a análise dos resultados, verificou-se que nenhuma das amostras, exceto a do gorila, apresentou amplificação significativa. A amostra do gorila, devido à proximidade genética com o ser humano, mostrou amplificação em alguns marcadores. No entanto, esses resultados são considerados desprezíveis pela similaridade genética com o ADN humano. Os eletroferogramas das amostras do gato-pescador e do gorila encontram-se nos anexos 1 e 2, respetivamente. Assim, podemos concluir que o kit passou na análise da especificidade, sendo, portanto, adequado para aplicação forense.

6.7.3. Comparação com o kit Yfiler™ Plus – Applied Biosystems (Avaliação direta)

Uma vez estabelecido que não existem diferenças na robustez dos resultados ao amplificar num volume total de 25 µL ou 12,5 µL, procedeu-se à amplificação de todas as amostras com um volume final de 12,5 µL. Os resultados obtidos foram comparados

com os do kit Yfiler™ Plus (Applied Biosystems), previamente validado no laboratório. Nas amostras analisadas, não se observaram diferenças nas características genéticas dos marcadores coincidentes. O objetivo de confirmar que os perfis genéticos eram consistentes entre ambos os kits de amplificação foi alcançado, comprovando a compatibilidade e eficácia do novo kit em relação ao já estabelecido no laboratório.

7. Considerações finais

O estágio realizado no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Sul, no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais, representou uma etapa crucial na minha formação acadêmica e profissional. A integração no Serviço de Biologia e Genética Forenses ofereceu-me uma oportunidade única para aplicar e expandir os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado e da licenciatura em Ciências Forenses e Criminais, proporcionando uma compreensão aprofundada dos processos e metodologias que sustentam a prática forense moderna. A utilização de metodologias avançadas durante o estágio, como a extração de ADN através de Chelex® 100 e PrepFiler™ Express (Applied Biosystems), a quantificação com Quantifiler® Trio (Applied Biosystems), e a amplificação de ADN utilizando kits especializados como PowerPlex® Fusion 6C System (Promega), Yfiler™ Plus (Applied Biosystems), e Investigator® Argus Y-28 QS (Qiagen), foi fundamental para o meu desenvolvimento técnico. Estas técnicas proporcionaram uma visão prática e detalhada dos desafios inerentes ao trabalho em Genética Forense. Cada etapa laboratorial reforçou a importância de procedimentos rigorosos e da manutenção de padrões elevados de qualidade, elementos essenciais para garantir a validade e fiabilidade dos resultados obtidos.

A participação na validação do Kit Investigator® Argus Y-28 QS, embora parcial, destacou a relevância dos processos de validação na implementação de novas ferramentas forenses e constituiu um dos momentos mais significativos do estágio. Esta experiência permitiu-me compreender a necessidade de assegurar que os métodos e técnicas utilizados nos laboratórios forenses sejam fiáveis e eficazes.

O estágio no INMLCF aprimorou as minhas competências técnicas, reforçou as habilidades interpessoais e permitiu a integração num ambiente multidisciplinar. A colaboração com profissionais experientes foi crucial para o meu crescimento pessoal e profissional, aprofundando a compreensão das dinâmicas laboratoriais e a tomada de decisões éticas. Esta experiência prática consolidou uma base sólida para enfrentar os desafios nas áreas de Tecnologias Clínico-Laboratoriais e Ciências Forenses.

Por fim, é essencial destacar o papel determinante que o apoio, a orientação e o conhecimento partilhados pelo INMLCF, assim como pelos profissionais que me acompanharam ao longo deste estágio, desempenharam no sucesso desta experiência. O impacto destas contribuições foi significativo, tanto no meu percurso académico quanto no meu crescimento profissional e pessoal, refletindo-se de forma marcante no desenvolvimento das competências adquiridas durante o estágio.

8. Referências bibliográficas

- AAFS Standards Board. (2020). *Standard for Internal Validation of Forensic DNA Analysis Methods*. <https://www.aafs.org/asb-standard/standard-internal-validation-forensic-dna-analysis-methods>
- Ali Almahasneh, I., Abumsimir, B., & Mustapha Ennaji, M. (2018). DNA sequencing and genotyping profile of the microsatellites of Y-STRs of the Beer-Alsabaa bedouins of Jordan as part of the Arabian genome project since 1995. *International Journal of Molecular Biology*, 3(3). <https://doi.org/10.15406/ijmboa.2018.03.00067>
- Amorim, A. (2015). *Genética Forense* (pp. 1–19). Academia das Ciências de Lisboa.
- Andersen, M. M., Mogensen, H. S., Eriksen, P. S., & Morling, N. (2017). Yfiler® Plus population samples and dilution series: stutters, analytic thresholds, and drop-out probabilities. *International Journal of Legal Medicine*, 131(6), 1503–1511. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1568-8>
- Applied Biosystems by Life Technologies. (2010). *PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits - User Guide*.
- Applied Biosystems by Life Technologies. (2014). *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis*.
- Ba, H.-J., Liu, B., Ma, J., Zhu, A., & Lin, Z. (2007). [Comparative research of the influence factors of DNA extraction of bloodstain on the filter paper with Chelex-100 method]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 23(5), 347–348.
- Balsa, F., Bogas, V., Cunha, P., Brito, P., Serra, A., Lopes, V., Carvalho, M., Andrade, L., Bento, A. M., São Bento, M., Corte-Real, F., & Anjos, M. J. (2011). Preliminary validation of PrepFiler Express™ Extraction kit in AutoMate Express DNA Extraction System. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), e377–e378. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.09.050>
- Barbaro, A., Cormaci, P., & Agostino, A. (2009). Validation of PrepFiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 176–177. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2009.08.036>
- Basset, P., Blandin, P., Grini, A., Delemont, S., Samie, L., & Castella, V. (2022). A simplified protocol for the detection of blood, saliva, and semen from a single

- biological trace using immunochromatographic tests. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 18(2). <https://doi.org/10.1007/s12024-021-00453-2>
- Bio-Rad. (n.d.). *Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual*.
- Bogas, V., Bento, A. M., Serra, A., Brito, P., Lopes, V., Sampaio, L., Gouveia, N., Cunha, P., Balsa, F., São-Bento, M., & Porto, M. J. (2017). Validation of sampletype I-sep DL for differential extraction and purification with prefiler express in the automate express DNA extraction system. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e353–e354. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.113>
- Butler, J. M. (2001). The Polymerase Chain Reaction : DNA Amplification. In *Forensic DNA typing : biology & technology behind STR markers* (pp. 39–52). Academic Press.
- Butler, J. M. (2012). Quality Assurance and Validation. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing* (pp. 167–211). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00007-5>
- Butler, J. M., Buel, E., Crivellente, F., & McCord, B. R. (2004). Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. In *Electrophoresis* (Vol. 25, Issues 10–11, pp. 1397–1412). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elps.200305822>
- Canene-Adams, K. (2013). General PCR. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 291–298). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0>
- Cerqueira, J. (2020). *Validação de Ensaio* (PG-SGBF-001). INMLCF.
- Cerqueira, J. (2023). *Gestão de Pessoal* (PG-SGBF-004). INMLCF.
- Court, D. S. (2021). The y chromosome and its use in forensic dna analysis. In *Emerging Topics in Life Sciences* (Vol. 5, Issue 3, pp. 427–441). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200339>
- D’Anna, T., Puntarello, M., Cannella, G., Scalzo, G., Buscemi, R., Zerbo, S., & Argo, A. (2023). The Chain of Custody in the Era of Modern Forensics: From the Classic Procedures for Gathering Evidence to the New Challenges Related to Digital Data. *Healthcare*, 11(5), 634. <https://doi.org/10.3390/healthcare11050634>

- Dario, P., & Silva, C. V. (2019). *Manual da Qualidade - Serviço de Genética e Biologia Forenses*. INMLCF.
- Decker, A. E., Kline, M. C., Vallone, P. M., & Butler, J. M. (2007). The impact of additional Y-STR loci on resolving common haplotypes and closely related individuals. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.012>
- Decorte, R. (2013). Accreditation in Forensic DNA Analysis. In *Encyclopedia of Forensic Sciences* (pp. 227–232). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00041-6>
- Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de Março, Pub. L. No. Decreto-Lei n.º 96/2001, Diário da República n.º 72/2001, Série I-A de 2001-03-26, páginas 1673 - 1684 (2001).
- Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de Julho, Pub. L. No. Decreto-Lei n.º 166/2012, Diário da República n.º 147/2012, Série I de 2012-07-31 (2012).
- Doroteo, M. C. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación En Discapacidad*, 1(2).
- Dourado, C., Lucas, I., & Silva, C. V. (n.d.). *Amplificação e Análise de ADN do Cromossoma Y (Y-STRs) com Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit*.
- Elkins, K. (2013). *Forensic DNA Biology: A laboratory manual*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-06748-0>
- Foley, M. M. (2023). *Applied Biosystems™ PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (Manual and Semi-automated via AutoMate Express™)* (pp. 53–81). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3295-6_4
- Genetic Alliance. (2008). Understanding Genetics: A New York, Mid- Atlantic Guide for Patients and Health Professionals. *Genetic Alliance, The New York - Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services, Appendix E Inheritance Patterns*.
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011a). *An Introduction to Forensic Genetics* (2nd ed.). Wiley-Blackwell .
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011b). DNA extraction and quantification. In John Wiley & Sons Ltd (Ed.), *An Introduction to Forensic Genetics* (2nd ed., pp. 37–52).

- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011c). DNA structure and the genome. In *An Introduction to Forensic Genetics* (2nd ed., pp. 11–19).
- Gopinath, S., Zhong, C., Nguyen, V., Ge, J., Lagacé, R. E., Short, M. L., & Mulero, J. J. (2016). Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Science International: Genetics*, 24, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.006>
- Gunn, P., Walsh, S., & Roux, C. (2014). The nucleic acid revolution continues - will forensic biology become forensic molecular biology? *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00044>
- Harbison, S., & Fleming, R. (2016). Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*. <https://doi.org/10.2147/rrfms.s57994>
- Health Support Queensland Forensic and Scientific Services. (2017). *Quantification of Extracted DNA using the Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit*. https://www.dnainquiry.qld.gov.au/public-hearings/assets/exhibits/module-2/EXH%2089.25%20-%20FSS.0001.0019.8074_R.pdf
- Holtkötter, H., Dias Filho, C. R., Schwender, K., Stadler, C., Vennemann, M., Pacheco, A. C., & Roca, G. (2018). Forensic differentiation between peripheral and menstrual blood in cases of alleged sexual assault—validating an immunochromatographic multiplex assay for simultaneous detection of human hemoglobin and D-dimer. *International Journal of Legal Medicine*, 132(3), 683–690. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1719-y>
- International Organization for Standardization. (2017). *ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. <https://www.iso.org/standard/66912.html>
- ISO 18385:2016 - Minimizing the Risk of Human DNA Contamination in Products Used to Collect, Store and Analyze Biological Material for Forensic Purposes — Requirements, Pub. L. No. ISO 18385:2016 (2016).
- Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. In *Human Genetics* (Vol. 136, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1776-9>

- Knight, K. L., Mauriello, A., & Williams, G. (2023). Quantitation of DNA Using the Applied Biosystems Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2685). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3295-6_11
- Kowalczyk, M., Zawadzka, E., Szewczuk, D., Gryzińska, M., & Jakubczak, A. (2018). Molecular markers used in forensic genetics. In *Medicine, Science and the Law* (Vol. 58, Issue 4). <https://doi.org/10.1177/0025802418803852>
- Laux, D. L., & Barnhart, J. P. (2011). Validation of the Seratec® SeraQuant™ for the Quantitation of Prostate-Specific Antigen Levels on Immunochromatographic Membranes. *Journal of Forensic Sciences*, 56(6), 1574–1579. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01893.x>
- Lei n.º 5/2008, de 12 de Fevereiro, Pub. L. No. 5/2008, Diário da República n.º 30/2008, Série I de 2008-02-12 962 (2008). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/5-2008-248015>
- Li, R. (2008). Forensic biology: Identification and DNA analysis of biological evidence. In *Forensic Biology: Identification and DNA Analysis of Biological Evidence*. <https://doi.org/10.4324/9781420043440>
- Lunetta, P., & Sippel, H. (2009). Positive prostate-specific antigen (PSA) reaction in post-mortem rectal swabs: A cautionary note. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 16(7), 397–399. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2009.04.002>
- Marques, M. (2022). História da Medicina Legal. In *Tratado de Medicina Legal* (pp. 3–16). Pactor.
- Mitra, R., Mishra, N., & Rath, G. (2014). Blood groups systems. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5), 524. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144645>
- Phillips, K., McCallum, N., & Welch, L. (2012). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.018>
- Pinheiro, M. de F. (2012). Identificação genética no âmbito de crimes sexuais. *Revista de Investigação Criminal*, 2, 57–83.

- Portaria n.º 19/2013, de 21 de Janeiro, Pub. L. No. 19/2013, Diário da República n.º 14/2013, Série I de 2013-01-21 427 (2013).
<https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/19-2013-257062>
- Porto, M. J. A. (2022). Colheita, Acondicionamento e Preservação de Amostras. In *Tratado de Medicina Legal* (pp. 881–894).
- Promega Corporation. (2023). *PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers*.
- QIAGEN. (2022). *Investigator® Argus Y-28 QS Handbook For multiplex amplification of 27 Y-chromosomal STR loci with Quality Sensor*.
- Roewer, L. (2009). Y chromosome STR typing in crime casework. In *Forensic Science, Medicine, and Pathology* (Vol. 5, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12024-009-9089-5>
- Sampaio, L. A. (2022). Presença da Evidência ou Evidência da Presença. In *Tratado de Medicina Legal* (pp. 877–880).
- Schweers, B. A., Old, J., Boonlayangoor, P. W., & Reich, K. A. (2008). Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification™-Blood). *Forensic Science International: Genetics*, 2(3), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.12.006>
- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. (n.d.). *Clarification on Proficiency Testing of qPCR workflows including Y-screening*. Retrieved August 6, 2024, from <https://www.swgdam.org/publications>
- Seratec. (2009). *SERATEC® HemDirect Hemoglobin Assay*.
- Seratec. (2017). *SERATEC® Amylase Test: An Overview for Users*.
- Silva, C. V. (2020). Amplificação e análise de STRs Autossómicos com o Kit Powerplex® Fusion 6C System. In *PO-SGBF-S-016*.
- Silva, C. V. (2022). Criminalística Biológica. In *Tratado de Medicina Legal* (pp. 919–936).
- Smith, M. (2024). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., & Micke, G. A. (2012). Conceitos básicos em eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica*, 4(4).

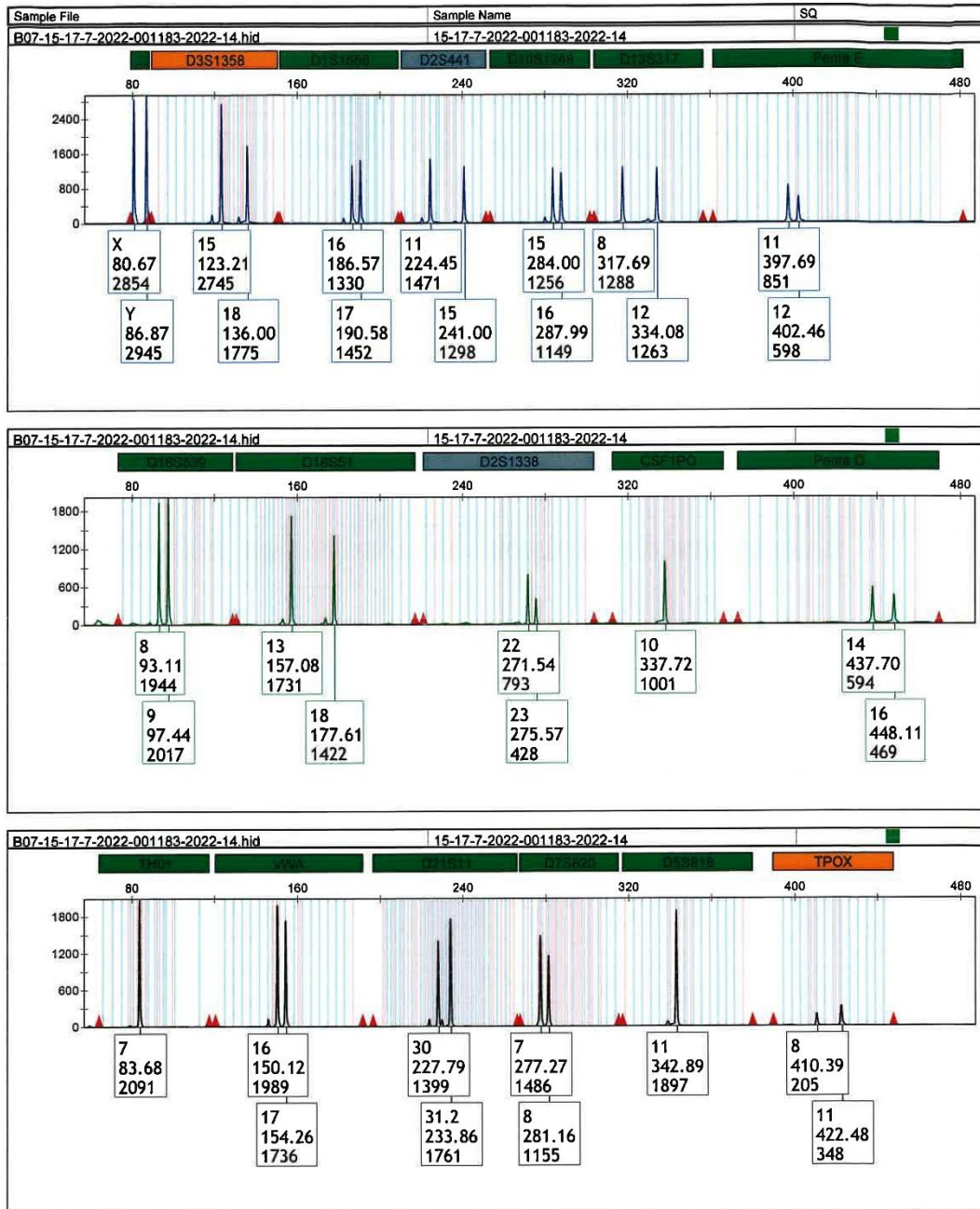
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Quantifiler HP and Trio DNA Quantification Kits User Guide (Pub. No. 4485354)*.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). *3500 Genetic Analyzer Specification Sheet*.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2019). *Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit - USER GUIDE*.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2020). *SeqStudio Specification Sheet*.
- van Oorschot, R. A. H., Ballantyne, K. N., & Mitchell, R. J. (2010). Forensic trace DNA: A review. In *Investigative Genetics* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2041-2223-1-14>
- Vandenberg, N., & Van Oorschot, R. A. H. (2006). The use of Polilight® in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2). <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x>
- Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., & Montagna, P. (2015). Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: A matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.005>
- Vieira, D. N. (2009). Forensic Medicine And Forensic Sciences in Portugal. *The Bulletin of Legal Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.17986/blm.2009141689>
- Vieira, D. N. (2012). O Atual Sistema Médico-legal e Forense Português. In *Profiling, Vitimologia e Ciências Forenses - Perspetivas Atuais* (pp. 1–15). Lisbon, Pactor.
- Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1–3), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
- Vraneš, M., Scherer, M., Cornelius, S., Willuweit, M., Kraemer, M., Terramagra, D., Kohns, A., & Prochnow, A. (2022). Developmental validation of the Investigator Argus Y-28 QS Kit. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 8, 274–275. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2022.10.060>
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4). <https://doi.org/10.2144/000114018>

- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, *171*(4356). <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Weiss, J. (2009). Luminaries in Laboratory Medicine: Kary Mullis. *Laboratory Medicine*, *40*(7), 441–442. <https://doi.org/10.1309/LM5SFGH3Q0NBJGWQ>
- Wyner, N., Barash, M., & McNevin, D. (2020). Forensic Autosomal Short Tandem Repeats and Their Potential Association With Phenotype. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00884>
- Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J., & Hakomori, S. (1990). Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, *345*(6272), 229–233. <https://doi.org/10.1038/345229a0>
- Zaman, G. S. (2018). Introductory Chapter: History and Scope of Quality Control in Laboratories. In *Quality Control in Laboratory*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74593>

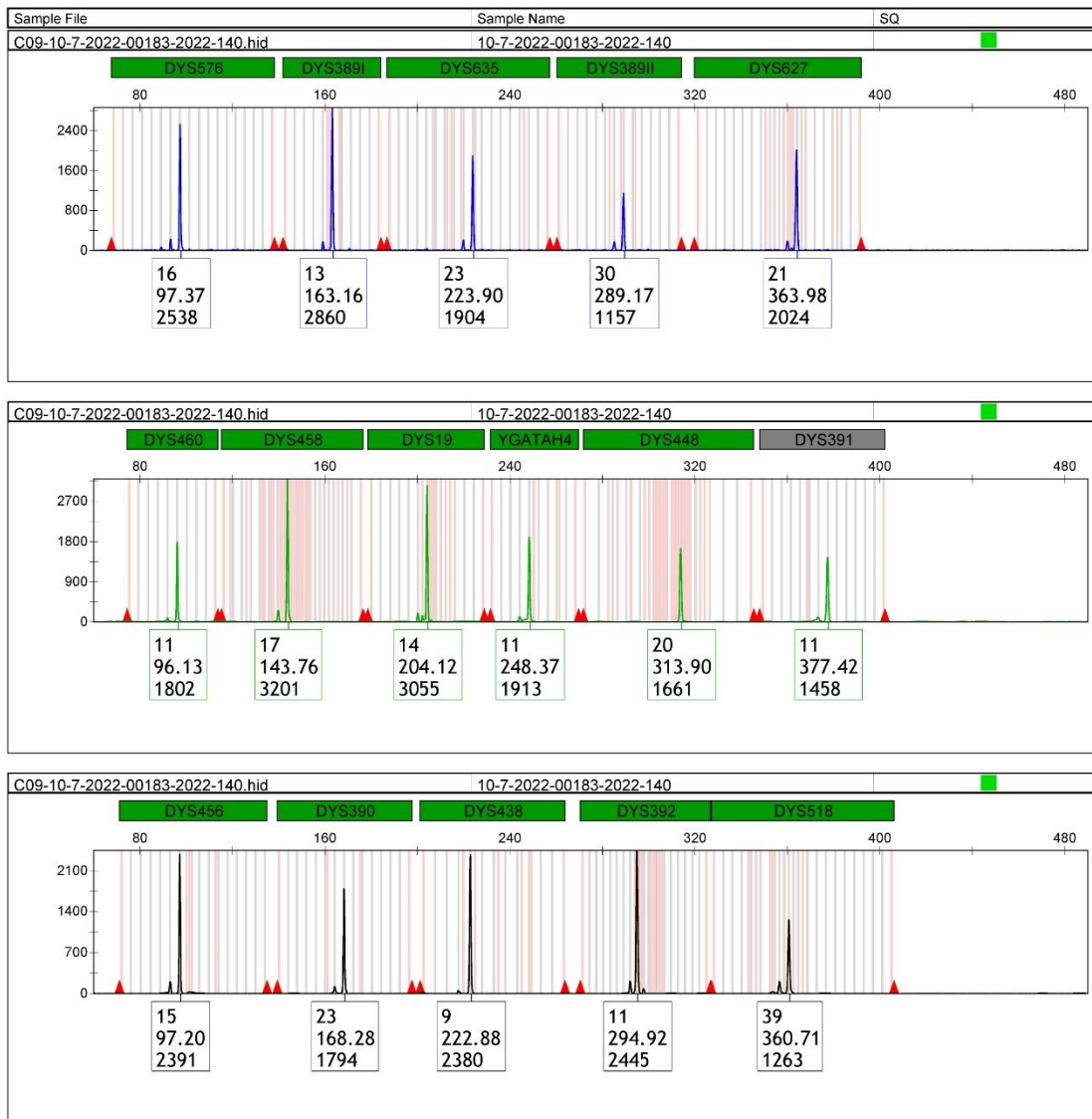
9. Anexos

| | Large DNA | Small DNA | Degradação |
|-------------------------|-------------|-----------|-------------|
| 1-2022-373-2022-451 | 0,615551412 | 0,7107502 | 1,154656053 |
| 2-2022-373-2022-452 | 3,777082443 | 2,7953107 | 0,740071416 |
| 3-2022-373-2022-453 | 5,655446053 | 3,2822194 | 0,580364347 |
| 4-2022-1008-2022-1206 | 0,855365038 | 0,9799193 | 1,14561522 |
| 5-2022-1008-2022-1207 | 0,847283602 | 1,0057125 | 1,186984539 |
| 6-2022-1008-2022-1208 | 0,845166862 | 0,7813625 | 0,924506843 |
| 7-2022-1247-2022-1485 | 2,30561614 | 2,9267256 | 1,269389749 |
| 8-2022-1247-2022-1486 | 0,799040556 | 0,8750311 | 1,095102191 |
| 9-2022-1247-2022-1487 | 0,550830662 | 0,7727218 | 1,402830124 |
| 1-2022-441-2022-555 | 0,641530633 | 0,5650723 | 0,880818903 |
| 2-2022-441-2022-1858 | 1,269461036 | 1,1999559 | 0,945248365 |
| 3-2022-441-2022-1859 | 0,292222917 | 0,3954341 | 1,353193283 |
| 4-2022-665-2022-808 | 0,709050715 | 0,7419121 | 1,046345592 |
| 5-2022-665-2022-809 | 0,392883837 | 0,3489194 | 0,888098001 |
| 6-2022-665-2022-810 | 2,071849108 | 1,585243 | 0,765134394 |
| 7-2022-633-2022-773 | 1,739368439 | 2,7153194 | 1,561094999 |
| 8-2022-633-2022-774 | 0,078494042 | 0,1400592 | 1,784329295 |
| 9-2022-633-2022-775 | 1,334629536 | 1,2263197 | 0,918846488 |
| 1-2022-00156-2022-1488 | 0,510344684 | 0,5831955 | 1,142748237 |
| 2-2022-00156-2022-1358 | 1,338611841 | 1,3376913 | 0,999312341 |
| 3-2022-00156-2022-1359 | 0,595521331 | 0,5687395 | 0,955027878 |
| 4-2022-001183-2022-1463 | 2,19015646 | 1,9849528 | 0,906306386 |
| 5-2022-001183-2022-1399 | 1,206701875 | 0,9038115 | 0,748993158 |
| 6-2022-001183-2022-1400 | 0,173507094 | 0,1286824 | 0,741654932 |
| 7-2022-001183-2022-1401 | 0,552646756 | 0,5321038 | 0,9628281 |
| 8-2022-001214-2022-1445 | 2,489343643 | 3,7385304 | 1,50181365 |
| 9-2022-001214-2022-1498 | 0,742742538 | 1,1137192 | 1,499468803 |
| 10-2022-1400-2022-1664 | 1,141379237 | 1,4000883 | 1,226663589 |
| 11-2022-1400-2022-2005 | 1,583094001 | 1,114554 | 0,704035282 |
| 12-2022-1400-2022-2006 | 1,094150782 | 1,1085761 | 1,013183951 |
| 1-2022-1495-2022-1775 | 0,517375052 | 0,5139931 | 0,993463218 |
| 2-2022-1495-2022-1776 | 0,714656711 | 0,8294398 | 1,160612822 |
| 3-2022-1495-2022-1777 | 2,507653713 | 2,1627181 | 0,862446845 |
| 4-2022-1566-2022-1855 | 1,109441161 | 1,2094836 | 1,090173721 |
| 5-2022-1566-2022-1856 | 1,025214434 | 0,8187859 | 0,798648417 |
| 6-2022-1566-2022-1857 | 1,359982133 | 1,3027562 | 0,957921565 |
| 7-2022-1704-2022-2009 | 1,331613541 | 1,5778451 | 1,184912205 |
| 8-2022-1704-2022-2007 | 2,290415525 | 2,2203016 | 0,969388127 |
| 9-2022-1704-2022-2008 | 4,479808807 | 3,4105229 | 0,761309922 |
| 10-2022-1970-2022-2297 | 3,17376852 | 3,7167115 | 1,171072006 |
| 11-2022-1970-2022-2700 | 1,385730028 | 1,2724285 | 0,918236971 |
| 12-2022-1970-2022-2701 | 0,570824206 | 0,393384 | 0,68915087 |

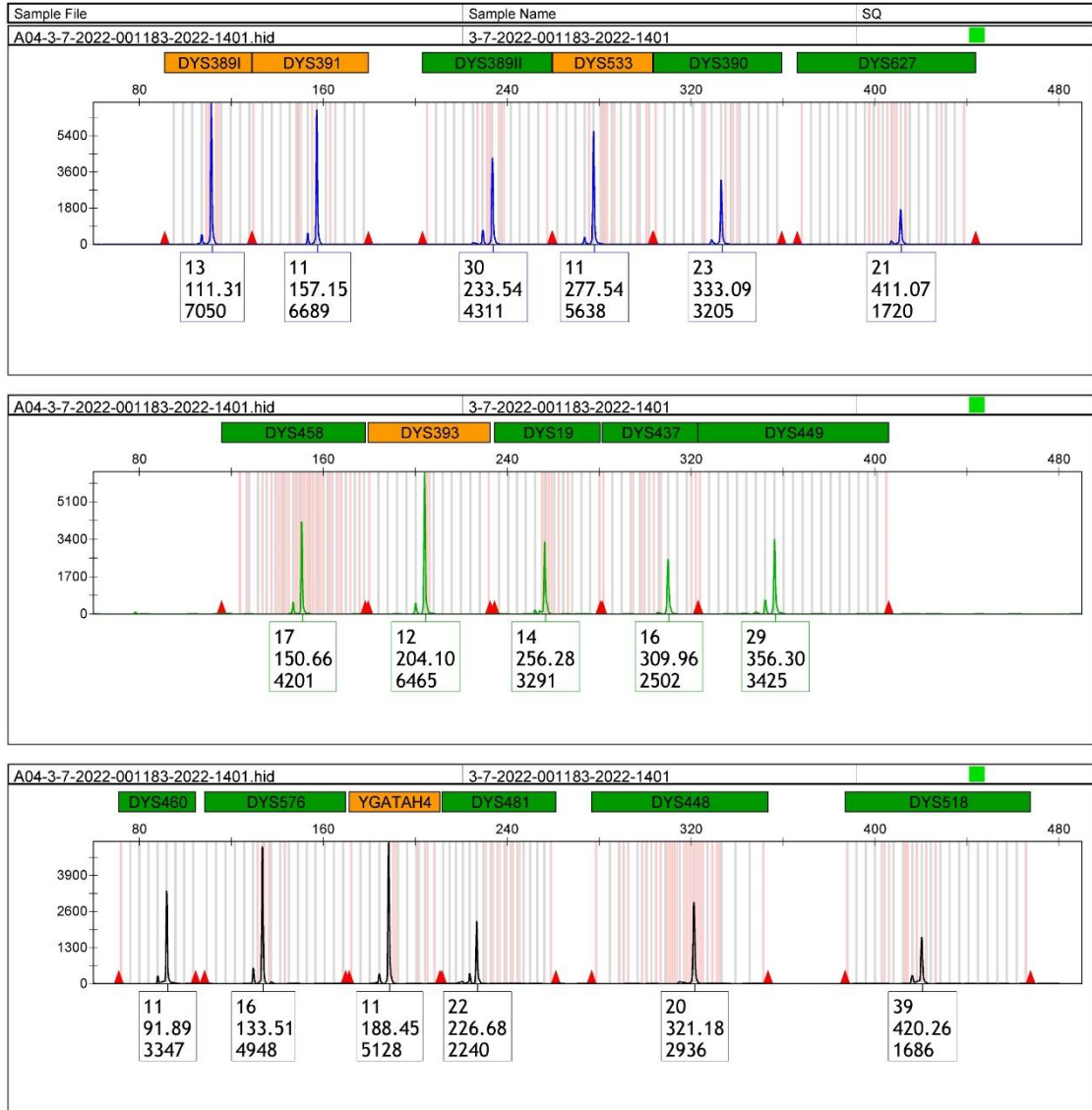
Anexo 1 Resultados obtidos na quantificação com o equipamento de PCR em tempo real ABI Prism 7500



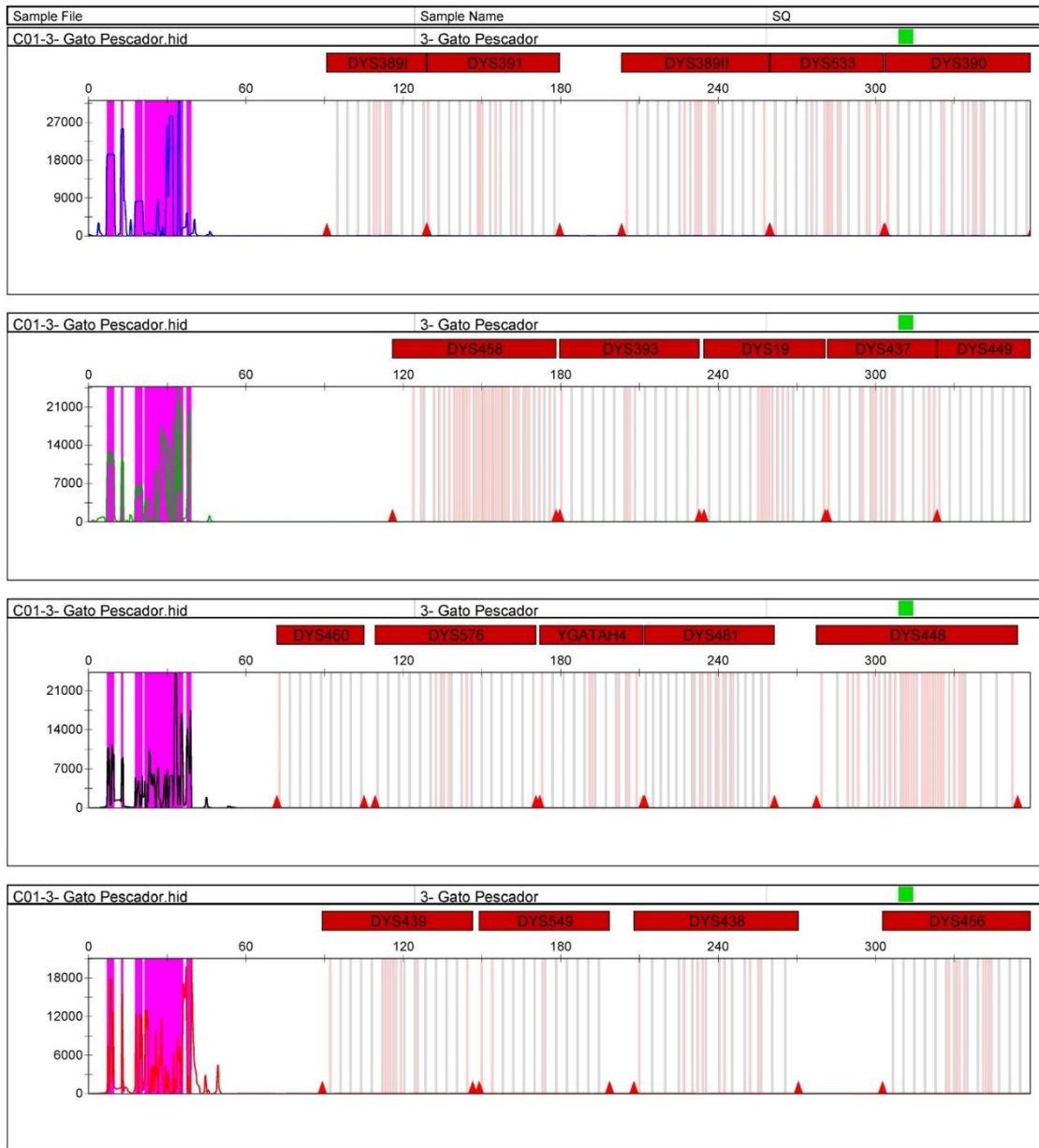
Anexo 2 Exemplo de um perfil genético parcial obtido com o kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega)



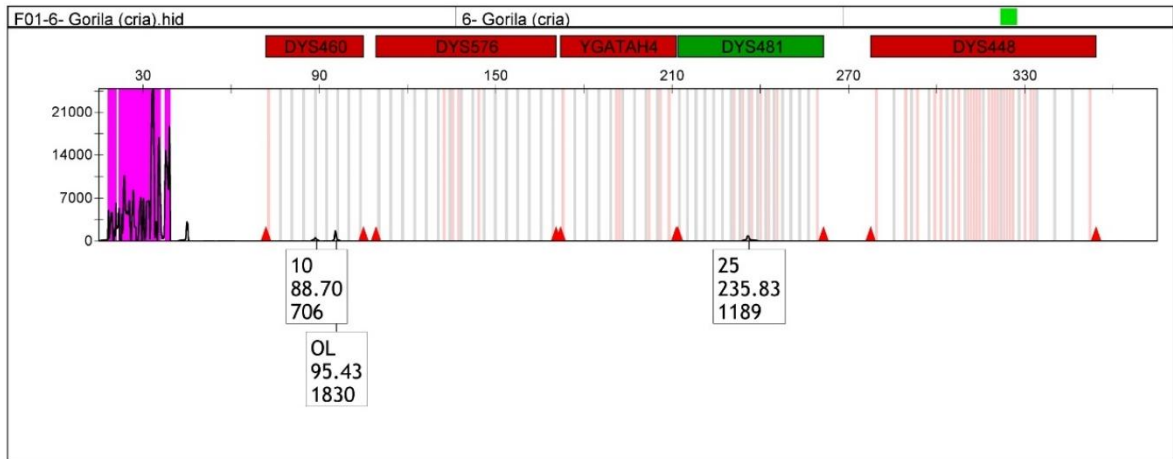
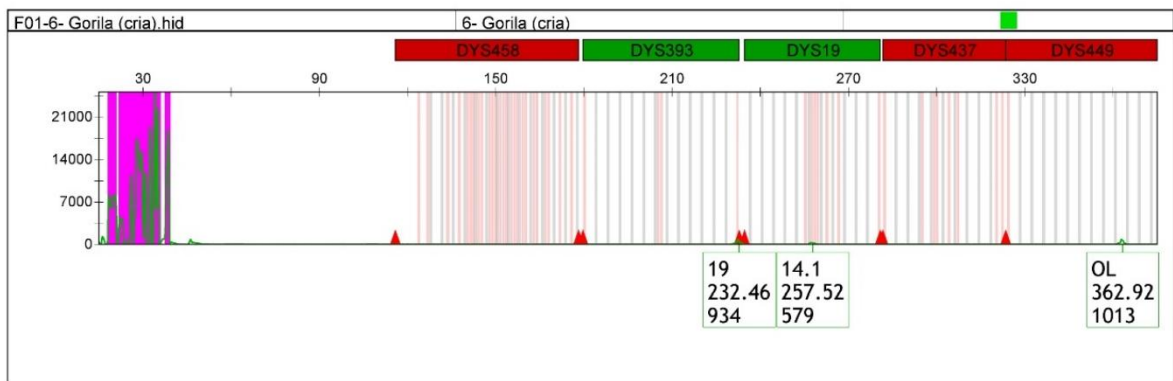
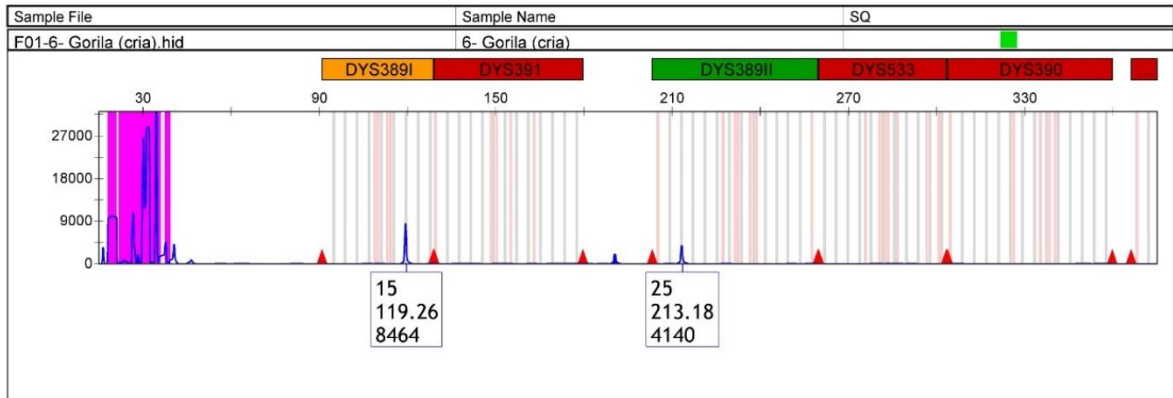
Anexo 3 Exemplo de um perfil genético parcial obtido com o kit Yfiler™ Plus (Applied Biosystems™)



Anexo 4 Exemplo do mesmo perfil genético do Anexo 3, obtido desta vez com o kit Investigator® Argus Y-28 QS



Anexo 5 Perfil genético parcial do gato-pescador com o kit Investigator® Argus Y-28 QS para estudo da especificidade (sem amplificação)



Anexo 6 Perfil genético parcial do gorila com o kit Investigator® Argus Y-28 QS para estudo da especificidade (amplificação limitada)

| Seq Studio | 3-2022-373-2022-453 | | 4-2022-1008-2022-12067 | | 7-2022-1247-2022-1485 | | 1-2022-441-2022-555 | | 3-2022-441-2022-1859 | |
|------------|---------------------|---------|------------------------|---------|-----------------------|---------|---------------------|---------|----------------------|---------|
| | 25 µl | 12,5 µl | 25 µl | 12,5 µl | 25 µl | 12,5 µl | 25 µl | 12,5 µl | 25 µl | 12,5 µl |
| DYS576 | 17 | 17 | 17 | 17 | 18 | 18 | 17 | 17 | 19 | 19 |
| DYS389I | 13 | 13 | 14 | 14 | 14 | 14 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| DYS635 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| DYS389II | 29 | 29 | 32 | 32 | 30 | 30 | 31 | 31 | 30 | 30 |
| DYS627 | 22 | 22 | 23 | 23 | 22 | 22 | 21 | 21 | 20 | 20 |
| DYS460 | 11 | 11 | 9 | 9 | 10 | 10 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| DYS458 | 17 | 17 | 16 | 16 | 18 | 18 | 18 | 18 | 17 | 17 |
| DYS19 | 14 | 14 | 15 | 15 | 14 | 14 | 15 | 15 | 14 | 14 |
| YGATAH4 | 12 | 12 | 11 | 11 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| DYS448 | 19 | 19 | 20 | 20 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| DYS391 | 11 | 11 | 10 | 10 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| DYS456 | 15 | 15 | 19 | 19 | 17 | 17 | 15 | 15 | 16 | 16 |
| DYS390 | 25 | 25 | 23 | 23 | 23 | 23 | 24 | 24 | 24 | 24 |
| DYS438 | 12 | 12 | 9 | 9 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| DYS392 | 13 | 13 | 11 | 11 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| DYS518 | 36 | 36 | 38 | 38 | 42 | 42 | 36 | 36 | 37 | 37 |
| DYS570 | 16 | 16 | 15 | 15 | 16 | 16 | 17 | 17 | 17 | 17 |
| DYS437 | 16 | 16 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| DYS385 | 11,13 | 11,13 | 15 | 15 | 11 | 11 | 11,14 | 11,14 | 11 | 11 |
| DYS449 | 29 | 29 | 30 | 30 | 31 | 31 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| DYS393 | 13 | 13 | 12 | 12 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| DYS439 | 12 | 12 | 10 | 10 | 13 | 13 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| DYS481 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 23 | 23 | 22 | 22 |
| DYS533 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 13 | 13 | 12 | 12 |

Anexo 7 Tabela de valores de diferentes loci STRs, obtidos com o SeqStudio™, comparando volumes de 12,5 µL e 25 µL na análise da sensibilidade do kit Investigator® Argus Y-28 QS