



# Validação da amplificação direta de manchas de sangue com *Yfiler® Plus PCR Amplification Kit* – resultados preliminares

Catarina G. Dourado<sup>1</sup>, Isabel Lucas<sup>1</sup>, Cláudia Vieira da Silva<sup>1</sup>, Mónica Carvalho<sup>1</sup>, António Amorim<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação do Sul, Serviço de Genética e Biologia Forenses

## Introdução

A análise de marcadores genéticos do tipo STR (*short tandem repeat*) é uma das metodologias mais utilizadas em perícias no âmbito da genética forense. Para além do estudo de marcadores autossómicos, também o estudo de marcadores do cromossoma Y é muito frequente, tendo estes especial importância não só em perícias de agressão sexual, como também em perícias de identificação genética individual e no âmbito da investigação biológica de parentesco.

A necessidade de resolver as perícias de forma célere, torna fundamental que os procedimentos laboratoriais sejam otimizados no sentido de se realizarem no menor tempo possível, nunca comprometendo os resultados obtidos. Nesse sentido, os *kits* comerciais de amplificação de STRs têm sido aperfeiçoados de forma a poderem ser utilizados sem necessidade prévia de uma extração de ADN. Atualmente, o kit *Yfiler® Plus* (Applied Biosystems) é o mais utilizado na obtenção de haplótipos do cromossoma Y no SGBF-S (Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses), permitindo a amplificação simultânea de 27 Y-STRs (*short tandem repeats* do cromossoma Y).

Para que uma nova metodologia possa ser aplicada na rotina laboratorial do SGBF-S, é imperativo proceder à sua validação interna para determinar a sua eficácia e reprodutibilidade, de modo a que possa ser aplicada na casuística forense. Assim, o presente trabalho revela os primeiros resultados obtidos no SGBF-S relativamente à amplificação direta de manchas de sangue com *Yfiler® Plus PCR Amplification Kit*.

## Metodologia

Foram seleccionadas 22 amostras (manchas de sangue) de indivíduos do sexo masculino não relacionados entre si. As amostras foram extraídas com *Prep-n-Go™ Buffer* (Applied Biosystems), amplificadas com o kit *Yfiler® Plus* no termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler e posteriormente sujeitas a eletroforese capilar no sequenciador automático Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser. As mesmas amostras foram amplificadas de forma direta, fazendo um punch de 0.5mm, e sujeitas à mesma metodologia de análise. A análise dos fragmentos amplificados foi realizada com o software *GeneMapper ID-X v1.4 e v1.6* (Applied Biosystems). A comparação de perfis genéticos, no que diz respeito às características alélicas obtidas e à qualidade/quantidade de produto amplificado através da análise da altura dos picos em RFUs foi analisado com o software Microsoft Office Excel.

## Resultados e Discussão

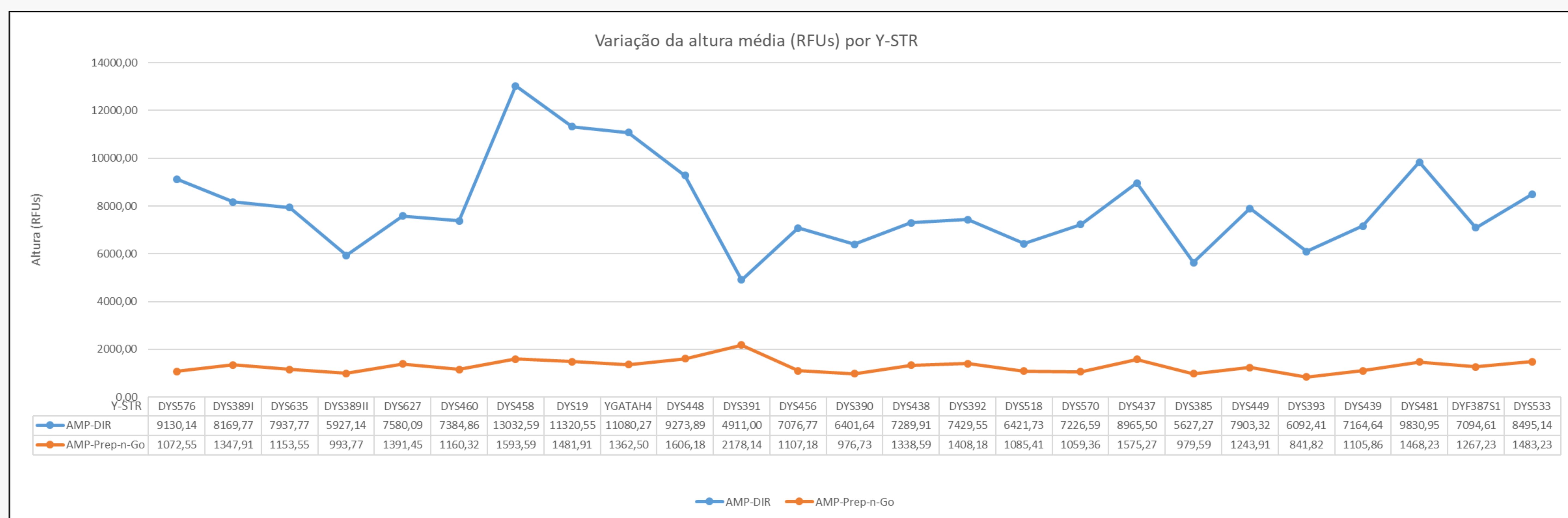


Figura 1 – O gráfico representa a altura média (RFUs) dos picos em cada marcador, com amplificação direta (AMP-DIR) e com extração com Prep-n-go (AMP-PREP-N-GO); a tabela do gráfico representa os valores da média da altura dos picos em cada um dos marcadores genéticos, consoante a metodologia utilizada.

A análise dos resultados obtidos com o software *GeneMapper ID-X v1.4 e v1.6* (Applied Biosystems), revela a existência de perfis de qualidade e concordantes entre si, independentemente da metodologia utilizada. Assim, as alterações à metodologia do fabricante que foram adotadas (redução do volume final de amplificação de 25µL para 12,5µL e diminuição do tamanho do punch de 1,2mm para 0,5mm), não comprometem a obtenção de resultados válidos, demonstrando a robustez do *kit Yfiler® Plus*. Na generalidade das amostras, foram obtidos perfis de melhor qualidade na amplificação direta, talvez devido à quantidade de amostra extraída não ter sido a ideal em algumas situações (p. ex. manchas de sangue pouco impregnadas). No entanto, os perfis tendem a ser mais equilibrados nas amostras extraídas com *Prep-n-Go* do que nas amostras amplificadas de forma direta. Analisando o gráfico e respetiva tabela (Figura 1), observa-se claramente que foram obtidos perfis com altura média dos picos (RFUs) mais elevada no caso das amostras amplificadas de forma direta. Por se tratar de um estudo preliminar e com uma amostragem reduzida, não foram efetuados testes estatísticos.

## Conclusões

Os resultados preliminares apresentados são muito satisfatórios, confirmando-se a robustez do *Yfiler® Plus*. Por conseguinte, deverá prosseguir-se de forma a concluir a validação desta metodologia e implementá-la no SGBF-S.