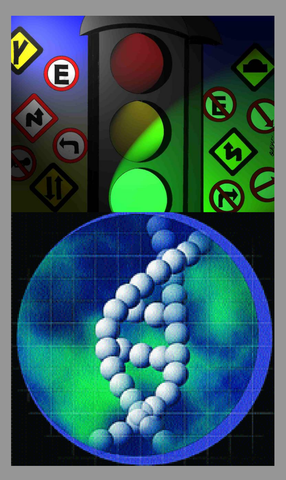
IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE AMOSTRAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE TAXA DE ALCOOLÉMIA

C Cruz, C Vieira-Silva, T Ribeiro, I Lucas, R Espinheira

Serviço de Genética e Biologia Forense - Delegação de Lisboa - Instituto Nacional de Medicina Legal



INTRODUÇÃO

- A condução sob influência de álcool é responsável por grande parte da sinistralidade rodoviária e a sua fiscalização tem constituído uma das medidas de prevenção dessa sinistralidade.
- A determinação da Taxa de Alcoolémia no Sangue (TAS) é um dos meios utilizados na fiscalização [1].
- No Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação de Lisboa ocorreram solicitações de identificação genética de amostras previamente utilizadas na determinação de TAS.
- A identificação genética consiste no estudo do perfil de ADN obtido a partir das referidas amostras e na posterior comparação com o perfil de ADN obtido a partir de amostras biológicas de referência, colhidas ao indivíduo sujeito a pesquisa de álcool ou, no caso de falecimento deste, com o perfil genético de familiares directos.
- Este trabalho descreve os procedimentos realizados na identificação genética das referidas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 12 casos em que foi solicitada a identificação genética de amostras utilizadas na determinação de TAS.

AMOSTRAS ESTUDADAS

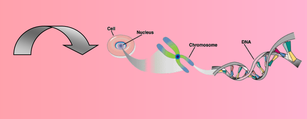
ANO	Nº CASOS
2000	1
2001	1
2002	4
2003	6

Amostra de sangue utilizada na determinação de TAS

Amostra de referência colhida ao indivíduo (9 casos) ou a familiares directos, no caso de falecimento deste (3 casos)

ESTUDO DO PERFIL GENÉTICO DAS AMOSTRAS

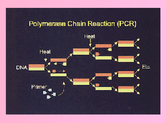
1



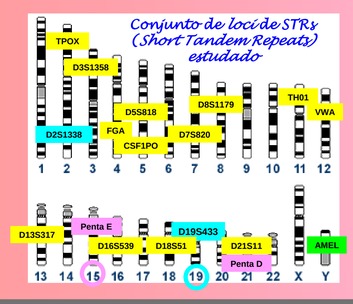
EXTRACÇÃO DE ADN POR UM DOS SEGUINTES MÉTODOS:
1. Chelex [2]
2. Fenol-clorofórmio [3]

2

PCR



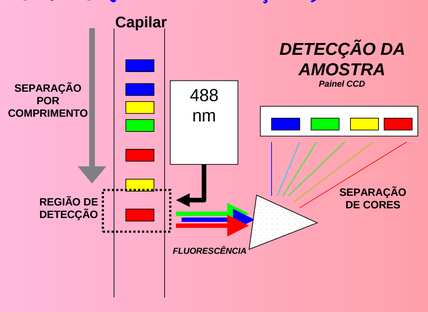
AMPLIFICAÇÃO EM MULTIPLEX DO ADN EXTRAÍDO



Foram usados dois dos seuintes Kits de amplificação em multiplex de loci de STRs:
1. AmpFlSTR® SGM Plus™ (Applied Biosystems)
2. AmpFlSTR® Identifiler™ (Applied Biosystems)
3. Powerplex 1.2™ System (Promega Corporation)
4. Powerplex 16™ System (Promega Corporation)

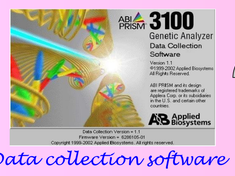
ESTUDO DO PERFIL GENÉTICO DAS AMOSTRAS (CONTINUAÇÃO)

3



ELECTROFORESE CAPILAR

4



Data collection software

Genescan software

Genotyper software

ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE ADN ATRAVÉS DE SOFTWARE ESPECÍFICO

5

ANÁLISE DOS RESULTADOS:
1. Comparação dos perfis genéticos
2. Cálculos de paternidade e maternidade (no caso de identificação das amostras através do estudo de familiares directos)

RESULTADOS

		MÉTODO DE EXTRACÇÃO DE ADN			Nº DE LOCI DE STRs		
CASO	AMOSTRA DE REFERÊNCIA	SANGUE USADO PARA TAS	AMOSTRA DE REFERÊNCIA	KITS USADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE ADN	ANALISADOS	COM RESULTADOS	COINCIDÊNCIA ENTRE AMOSTRAS SANGUE TAS/REFERÊNCIA
1	Zaragatoa bucal	Chelex	Chelex	SGM + Powerplex 1.2	15	15	NÃO
2	Mancha de sangue	Chelex	Chelex	SGM + Powerplex 1.2	15	15	SIM
3	Mancha de sangue	Fenol-clorofórmio	Chelex	SGM + Powerplex 16	17	15*	SIM
4	Mancha de sangue	Fenol-clorofórmio	Chelex	SGM + Powerplex 16	17	17	NÃO
5	Mancha de sangue	Chelex	Chelex	SGM + Powerplex 16	17	17	SIM
6	Mancha de sangue	Fenol-clorofórmio	Chelex	Identifiler + Powerplex 16	17	17	SIM
7	Mancha de sangue	Chelex	Chelex	SGM + Powerplex 1.2	17	17	SIM
8	Mancha de sangue	Chelex	Chelex	Identifiler + Powerplex 16	17	17	SIM
9	Mancha de sangue	Fenol-clorofórmio	Chelex	Identifiler + Powerplex 16	17	17	SIM

TABELA 1 - Identificação das amostras de sangue utilizadas na determinação de Taxa de Alcoolémia (TAS) por comparação com as amostras de referência do indivíduo sujeito a pesquisa de álcool. * Ausência de resultados nos restantes loci de STRs analisados, podendo dever-se a degradação parcial da amostra.

		MÉTODO DE EXTRACÇÃO DE ADN			Nº DE LOCI DE STRs		
CASO	FAMILIARES DIRECTOS ESTUDADOS	SANGUE USADO PARA TAS	SANGUE DOS FAMILIARES	KITS USADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE ADN	ESTUDADOS	COM RESULTADOS	RESULTADOS DA COMPARAÇÃO
10	Pai e Mãe	Fenol-clorofórmio	Chelex	SGM + Powerplex 16	17	9*	Probabilidade de paternidade 99.98%
11	2 Filhas e Mãe destas	Fenol-clorofórmio	Chelex	SGM + Powerplex 16	17	9*	Probabilidade de paternidade 99.996% e 99.98%, respectivamente
12	Filho	Fenol-clorofórmio	Chelex	SGM + Powerplex 16	17	15*	Probabilidade de maternidade 99.999%

TABELA 2 - Identificação das amostras de sangue utilizadas na determinação de Taxa de Alcoolémia (TAS) por comparação com as amostras de sangue de familiares directos do indivíduo sujeito a pesquisa de álcool. * Ausência de resultados nos restantes loci de STRs analisados, podendo dever-se a degradação parcial da amostra.

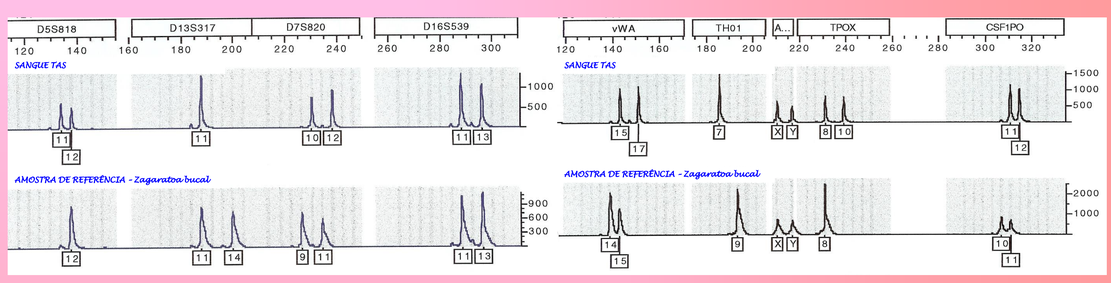


Figura 1 - Perfis genéticos de uma amostra utilizada na determinação de taxa de alcoolémia (SANGUE TAS) e da amostra de referência do indivíduo sujeito a pesquisa de álcool. Verifica-se não coincidência entre os perfis.

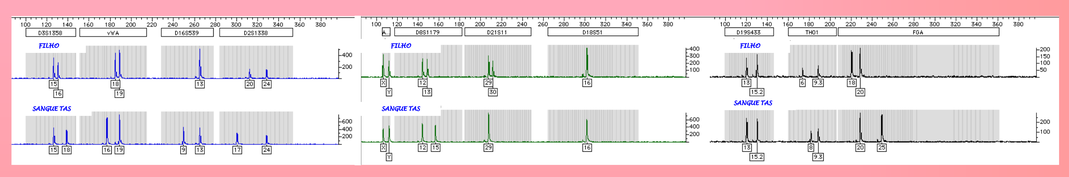


Figura 2 - Perfis genéticos de uma amostra utilizada na determinação de taxa de alcoolémia (SANGUE TAS) e do filho do indivíduo sujeito a pesquisa de álcool. Verifica-se coincidência de um dos alelos de cada loci analisado.

CONCLUSÕES

- A comparação dos perfis genéticos obtidos permitiu detectar coincidência/não coincidência ou presença/ausência de uma relação de parentesco entre os referidos perfis e, consequentemente, determinar a identidade da amostra.
- Este tipo de estudo pode constituir um importante complemento às provas estabelecidas para a detecção do estado de influenciado pelo álcool ou por substâncias estupefacientes ou psicotrópicas.

BIBLIOGRAFIA:
1. Decreto-Lei nº20/2002 de 21 de Agosto de 2002. Diário da República nº 226/02 - I Série A . Assembleia da República. Lisboa.
2. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 1991; 10: 506-516.
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Labotarory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY, 1989, pp.E3-E4.