

I. Catré^{1,2}, A. Shastakova¹, A. Serra¹, V. Bogas¹, F. Balsa¹, V. Lopes¹, P. Cunha¹, M. São Bento¹, A. M. Bento¹, L. Sampaio¹, M. J. Porto¹, A. Amorim^{3,4}, F. Corte Real^{2,5}, P. Brito¹

⁵ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Metodologia

Iniciando a parte prática foi realizada a seleção das amostras adequadas ao estudo a realizar. No caso das paternidades foram selecionadas amostras de processos que apresentassem uma exclusão isolada num dos marcadores comuns ao painel para NGS e ao kit para EC. No caso das investigações criminais foram selecionadas amostras de processos em que a amostra de mistura continha vestígios da vítima e do suspeito. No total foram selecionadas e analisadas 41 amostras, sendo que 15 correspondiam a 5 casos de parentesco e 26 correspondiam a 6 processos criminais.

Na realização do pool de bibliotecas ocorrem dois PCRs: um PCR e um PCR de emulsão. No PCR ocorre amplificação dos fragmentos de interesse e a ligação dos adaptadores de sequenciação e dos códigos de barras a cada um dos fragmentos amplificados. No PCR de emulsão ocorre a ligação de cada um dos fragmentos amplificados a uma ISP (Ion Sphere Particle) e, novamente, amplificação dos fragmentos ligados às ISPs.

No passo seguinte ocorre o carregamento do chip que consiste na fixação das ISPs à superfície do chip de forma a ficarem imobilizados para a sequenciação. Na fase final do processo de carregamento do chip, deve ser realizada a inicialização do sequenciador de forma a ficar apto a realizar a sequenciação das amostras carregadas no chip. Os resultados preliminares são analisados no Torrent Suite™ Software e a análise dos resultados finais é realizada no Converge™ Software.



Fig. 1. Representação da ligação de uma ISP ao poço de um chip durante o seu carregamento.

Após a sequenciação das amostras foi possível observar os resultados preliminares no *software* Torrent (tabela 1). Neste projeto houve alguns parâmetros fora dos valores esperados (assinalados a vermelho na tabela 1) mas, segundo as indicações da casa comercial, não comprometem a análise das amostras.

Nos processos de parentesco, nos resultados obtidos por NGS, foi possível verificar a existência de SNPs nos 5 casos estudados. A análise da sequência dos STRs permite, para além da confirmação dos resultados obtidos, analisar de forma mais aprofundada as exclusões isoladas. Foram detetados três casos em que ocorria deleção de uma das repetições de um dos alelos e em dois casos tratava-se de uma duplicação. Foram também detetados alelos isométricos em dois dos cinco casos estudados.

Foram selecionados um processo criminal (tabela 2) e um processo de investigação de parentesco (tabela 3) para apresentar como exemplo dos resultados obtidos.

Na tabela 2 é possível analisar um dos processos criminais estudados, onde a vítima (do sexo feminino) alega ter sido vítima de uma violação por parte do suspeito (do sexo masculino), sendo que as amostras C1 e C2 correspondem a vestígios recolhidos das cuecas que a vítima estaria a utilizar aquando do crime. Nos resultados apresentados é possível observar que, na amostra C1, foi obtido um perfil idêntico ao perfil apresentado nos resultados por EC. Foi também possível identificar alelos isométricos no marcador D2S1338 para o alelo 18. Esta distinção, permite confirmar com um maior grau de certeza que os alelos do suspeito e da vítima se encontram na mistura para este marcador. Já na amostra C2, foi necessário baixar o limiar do software para serem detetados mais alelos do contribuinte minoritário (neste caso, do suspeito). Mesmo assim, foi possível ver que nem todos os alelos foram detetados, mesmo quando o limiar foi definido para 10 leituras, e o número de alelos correspondentes a artefactos aumentaram bastante, diminuindo a fiabilidade dos resultados apresentados com este limiar.

Na tabela 3 estão apresentados os resultados de um dos casos de parentesco estudados, sendo possível verificar a existência de alelos isométricos no marcador D21S11. Para além disso, a exclusão isolada identificada por EC no marcador D3S1358, foi também detetada em NGS, permitindo saber que se tratava de uma deleção de uma das repetições herdadas de origem paterna.

[illegible]

Tabela 2. Resultados relativos a um dos processos criminais estudados.

Locus	Filha	Mile	Pretenso pai	Locus	Filha	Mile	Pretenso pai
AMEL	X	X	X, Y	D5S1358	15, 16	15	14, 17
CFP50	11	10, 11	10, 11		—	—	(FCTA1) (FCTG3) (FCTA11) —
D15S1248	15	15, 16	15, 11		(FCTA1) (FCTG3) (FCTA13) (FCTA1) (FCTG3) (FCTA11) —		
D15S2463	13, 15	13, 17	13, 23		(FCTA1) (FCTG3) (FCTA14) —		(FCTA1) (FCTG3) (FCTA11) —
D15S291	18, 21	20, 23	18, 23	D5S280	14	14, 18	14, 14
D15S317	11	11, 12	11	D5S818	11	14, 13	11, 13
D16S1434	10, 13	10, 13	—	D5S1043	17, 18	12, 17	17, 18
D16S539	11, 12	11	11, 12	D6S474	15, 18	15	14, 18
D16S651	13, 18	13, 17	13, 17	D7S820	9, 11	8, 11	9, 11
D18S493	12, 13	12, 2, 13	12, 13	D8S1179	12, 13	9, 13	11, 12
D18S1656	15, 17	14, 17	15, 16	DY8391	—	—	11
D151677	14	12, 14	13, 14	FGA	20, 22	20, 26	20, 22
D21S11	30, 30	30, 32, 2	30, 32	Penta D	10, 15	10, 12	12, 15
	(FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) TCA (FCTA2) TCGAAT (FCTA11) —	—	(FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) TCA (FCTA2) TCGAAT (FCTA11) —	Penta E	5, 17	13, 17	5
	(FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) (FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) TCA (FCTA2) TCGAAT (FCTA11) TCA	—	(FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) TCA (FCTA2) TCGAAT (FCTA11) TCA	SRY	—	—	1
	—	—	—	TH01	6, 7	7	6
	—	(FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) TCA (FCTA2) TCGAAT (FCTA1) (FCTA1) (FCTG3) (FCTA1) (FCTA1) TCA (FCTA2) TCGAAT (FCTA11) TCA	—	TPOX	8, 11	11	8, 11
D24S11	11, 14	11, 15	10, 14	Yindel	—	—	—
D4S2408	8	8, 12	8, 9	vWA	17	17	16, 17

Tabela 3. Resultados relativos a um dos processos de parentesco estudados.

Em conclusão, para além da análise das sequências dos alelos (que permite a deteção dos alelos isométricos) e deteção de SNPs presentes em alguns deles, o painel GlobalFiler para NGS apresenta 11 marcadores a mais que o kit GlobalFiler para EC, o que permite um estudo mais pormenorizado de cada amostra, aumentando o poder de discriminação em relação à técnica de EC. O facto de ainda não haver estudos populacionais em Portugal (já foram realizados alguns estudos em outros países [6]) que permitam utilizar apenas os dados por NGS para a realização das perícias impede a utilização única desta técnica, não sendo possível, para já, descartar a utilização da técnica de EC para estes estudos. Também o custo mais elevado na aquisição de reagentes e consumíveis necessários à metodologia de NGS, em relação à metodologia de EC, e a necessidade de investir em novos aparelhos leva ao adiamento da implementação desta técnica. Para além disso, a nomenclatura para os alelos isométricos ainda não é consensual, dificultando a apresentação destes resultados de forma correta.

Com os resultados obtidos, ficou claro que é ainda necessário realizar alguns estudos antes de implementar o painel GlobalFiler para NGS na rotina do laboratório, nomeadamente para a análise de amostras de mistura para definir um limiar analítico e para definir ainda os valores de concentração do contribuinte minoritário presente na amostra e degradação da mesma, a partir dos quais será possível utilizar o painel GlobalFiler para NGS com o nível de confiança necessário que este tipo de perícia exige.

[6] L. Devesse, et al., Concordance of the ForenSeq™ system and characterization of sequence specific autosomal STR alleles across two major population groups. *Forensic Science International: Genetics* 34 (2018) 57–61.