



Mestrado Biologia Molecular em Saúde

Identificação genética humana:

Estudo de novos marcadores genéticos do tipo STR e InDel

Candidatura ao grau de Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Orientador: Mestre António Amorim

Co-orientador: Mestre Cláudia Silva

Aluna: Sara Mulas Sá de Matos

Setembro de 2013

Agradecimentos

Ao finalizar este trabalho quero deixar um agradecimento muito especial aos meus familiares, amigos, colegas, professores e orientadores, que muito contribuíram para que este, fosse possível.

Pelo incentivo, apoio ajuda e paciência, saliento os meus pais José Sá Matos e Nídia Múlenas, a minha avó Lourdes Estevens, as minhas primas Joana Lopes e Vera Aires, ao meu amigo e namorado Bruno Pacheco e os amigos especiais, Ana Baptista, Ana Lopes, Catarina Amaro, Cláudia Martins, Daniela Hassan, Joana Pires e Joana Teixeira.

Agradeço igualmente aos colegas Andreia Simões, Melissa Rocha, Paulo Morais e Sandra Carvalho. Aos colegas de trabalho do laboratório de Professora Leonor Saúde, especialmente à Aida Barros e Sara Fernandes. E por fim, mas não menos importante aos meus orientadores António Amorim e Cláudia Silva, ao diretor do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses- Delegação Sul, Dr. Jorge Costa Santos, a todo o serviço de Biologia e Genética Forense do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses- Delegação Sul, e à Professora Alexandra Maia e Silva, por toda a paciência e ajuda prestada.

Resumo

Os marcadores genéticos do tipo Short Tandem Repeats (STR), são os atualmente recomendados para a obtenção de perfis genéticos, sendo que, muito recentemente foi apresentado como obrigatório para uso forense, um novo conjunto destes marcadores.

Não obstante, existem também outros tipos de marcadores genéticos passíveis de utilização para definir perfis genéticos, designadamente marcadores do tipo Inserção/Deleção, ou InDel.

Os novos marcadores STR e a grande maioria dos marcadores InDel ainda não estão suficientemente estudados e implementados nos laboratórios forenses, pelo que é necessário validar a reação, calcular frequências alélicas, parâmetros estatísticos populacionais e forenses.

Estudámos os novos marcadores STR e um conjunto de marcadores do tipo InDel numa amostra com cerca de 120 indivíduos do sul de Portugal, intervenientes em perícias médico-legais a decorrer no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

No que concerne aos marcadores STR incluídos no kit PowerPlex®ESI17 (promega), os ensaios de validação demonstraram a sua elevada sensibilidade, precisão e capacidade de detetar misturas de DNA. No entanto, relativamente aos limiares analíticos não está de acordo com o descrito anteriormente. Os parâmetros estatísticos populacionais e forenses estão de acordo com o esperado e o cálculo das distâncias genéticas demonstrou existir diferenças genéticas entre as populações em estudo.

Relativamente aos marcadores do tipo InDel incluídos no kit Investigator DIPlex® (Qiagen), os ensaios de validação demonstraram que o kit tem uma elevada sensibilidade, limiares analíticos relativamente baixos, boa capacidade de detetar misturas e boa precisão. As frequências alélicas estão em equilíbrio Hardy-Weinberg, no entanto os valores de heterozigotia não são os esperados. Os parâmetros estatísticos forenses estão de acordo com o esperado e o cálculo das

distâncias genéticas demonstrou que existem diferenças genéticas significativas relativamente a outras populações.

Concluimos que ambos os kits poderão ser utilizados para a prática forense apesar de, aparentemente, não preencherem todos os requisitos habitualmente avançados para os marcadores genéticos a utilizar na rotina forense. Deverão ser realizados mais estudos com maior número de indivíduos e de diferentes populações.

Palavras-chave: Marcadores genéticos, Short Tandem Repeats; InDel; Investigator DIPplex kit; PowerPlex®ESI17 kit.

Abstract

Short Tandem Repeats (STR) are the genetic markers currently recommended for the determination of genetic profiles. Recently a new set of these markers was presented as mandatory for forensic use.

Nevertheless there are other types of genetic markers which can be used to define genetic profiles, namely insertion/deletion (InDel) markers.

The new STR markers and most of the InDel markers have not been thoroughly studied nor implemented in forensic laboratories. It is therefore necessary to validate the reaction and to calculate allelic frequencies, as well as populational and forensic statistical parameters.

We studied the new set of STR markers and a set of InDel markers in a population of approximately 120 individuals from the south of Portugal involved in medical/legal examinations ongoing in the Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

Concerning the STR markers included in the Powerplex®ESI17 (promega) kit, the validation assays demonstrated its' high sensitivity, precision and capability to detect DNA mixtures. However, regarding the lower detection limit, our findings are not in accordance with previous reports. The populational and forensic statistical parameters are consistent with the expected values and our calculation of the pairwise genetic distance analysis revealed genetic differences between the southern Portugal population and other populations.

Regarding the InDel markers included in the Investigator DIPlex® (Qiagen) kit, the validation assays demonstrated that the kit has an elevated sensitivity, relatively low detection limits, a good capability to detect DNA mixtures and good precision. The allelic frequencies followed Hardy-Weinberg expectations, however the heterozygosity values are not consistent with the expected. The populational and forensic statistical parameters are consistent with the expected values and our calculation of the pairwise genetic distance analysis revealed genetic differences between the southern Portugal population and other populations.

We concluded that both kits are suitable for forensic use even though neither meets all the standard criteria required for genetic markers used in forensic studies. Additional studies need to be carried out, with larger and different populations.

Keywords: Genetic markers, Short Tandem Repeats; InDel; Investigator DIPplex kit; PowerPlex®ESI17 kit.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract.....	5
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas	12
Lista de siglas.....	14
1.Introdução	17
1.1. Identificação Médico-Legal	17
1.2. Short Tandem Repeat (STR)	19
1.3. European Standart Set (ESS) e Combined DNA Index System (CODIS)	22
1.4. Sistema PowerPlex® ESI17	24
1.4.1. Validação do Powerplex® ESI17 (Promega)	27
1.5. Polimorfismos de Inserção/Deleção (InDel).....	28
1.5.1. Sistema Investigator DIPplex®	31
1.5.2. Validação do Investigator DIPplex® (Qiagen).....	33
1.6. Procedimentos laboratoriais/experimentais	34
1.6.1. Extração de DNA pelo método de Chelex® 100	34
1.6.2. Quantificação de DNA por Quantifiler® Duo (Applied Biosystems).....	35
1.6.3. PCR Multiplex	37
1.6.4. Eletroforese capilar	38
1.7. Análise Estatística	42
1.7.1. Parâmetros estatísticos populacionais.....	42
1.7.2. Parâmetros estatísticos Forenses.....	44
2. Objetivos	46
2.1. Objetivo genérico	46
2.2. Objetivos específicos.....	46
3. Marcadores STR do Painel Europeu presentes no kit PowerPlex® ESI17 (Promega).....	49
3.1. Amostra em estudo e formas de armazenamento.....	49
3.2. Materiais e métodos para análise dos marcadores do tipo STR do kit PowerPlex® ESI17 (Promega).....	50
3.2.1 Extração de DNA pelo método de Chelex® 100	50
3.2.2. Quantificação de DNA por Quantifiler® Duo	50
3.2.3 Reação de amplificação em cadeia (PCR) dos marcadores do tipo STR	52

3.2.4. Detecção dos fragmentos de amplificação do tipo STR em ABI PRISM [®] 3130xl	53
3.2.5. Análise dos parâmetros estatísticos populacionais	54
3.2.6. Análise dos parâmetros estatísticos forenses	55
3.3. Resultados	57
3.3.1. Validação do kit Powerplex [®] ESI17 (Promega)	57
3.3.2. Análise dos parâmetros estatísticos para os marcadores STR do kit PowerPlex [®] ESI17 (promega)	64
3.4. Discussão dos resultados	73
3.5. Conclusão	77
4. Marcadores do tipo Inserção/Deleção (InDel)	80
4.1. Amostra em estudo e formas de armazenamento	80
4.2. Materiais e métodos dos marcadores InDel do kit Investigator DIPplex [®] (Qiagen) ...	80
4.2.1 Extração de DNA pelo método de Chelex [®] 100	80
4.2.2. Quantificação de DNA por Quantifiler [®] Duo	80
4.2.3. Reação de amplificação em cadeia (PCR) dos marcadores do tipo InDel do kit Investigator DIPplex [®]	81
4.2.4. Detecção dos fragmentos de amplificação do tipo InDel em ABI PRISM [®] 3130xl	82
4.3. Resultados	84
4.3.1. Validação do kit Investigator DIPplex [®] (Qiagen)	84
4.3.2. Análise dos parâmetros estatísticos para os marcadores InDel do kit Investigator DIPplex [®] (Qiagen)	92
4.5. Discussão dos resultados relativos ao kit Investigator DIPplex [®] (Qiagen)	102
4.6. Conclusão	106
5. Conclusão geral	109
6. Referências bibliográficas	112
Anexo 1. Resultados do teste de validação do método PowerPlex [®] ESI 17 no que diz respeito à comparação com o método desenvolvido.	120
Anexo 1 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex [®] ESI 17 no que diz respeito à comparação com o método desenvolvido	121
Anexo 2. Resultados do teste de validação do método PowerPlex [®] ESI 17 no que diz respeito aos seus limiares analíticos.	122
Anexo 2 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex [®] ESI 17 no que diz respeito aos seus limiares analíticos	123

Anexo 3. Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à contaminação do método.....	124
Anexo 3 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à contaminação do método.	125
Anexo 3 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à contaminação do método.	126
Anexo 4. Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito aos seus limiares analíticos.	127
Anexo 4 (Cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito aos seus limiares analíticos.....	128
Anexo 5. Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito à contaminação do método.	129
Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito à contaminação do método.	130
Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito à contaminação do método.	131
Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito à contaminação do método.	132
Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPlex® no que diz respeito à contaminação do método.	133
Anexo 6. Representação gráfica das frequências relativas observadas nos marcadores kit PowerPlex® ESI17 (Promega).	134
Anexo 6 (Cont.). Representação gráfica das frequências relativas observadas nos marcadores kit PowerPlex® ESI17 (Promega).	135
Anexo 6 (Cont.). Representação gráfica das frequências relativas observadas nos marcadores kit PowerPlex® ESI17 (Promega).	136
Anexo 7. Frequências alélicas obtidas aquando da análise com o software Arlequin v3.5 dos marcadores do tipo STR do kit PowerPlex® ESI17 (Promega).	137
Anexo 8. Frequências alélicas obtidas aquando da análise com o software Arlequin v3.5 dos marcadores do tipo InDel do kit Investigator DIPlex® (Quiagen).	139

Índice de Figuras

Figura 1. Imagem ilustrativa dos dois tipos de DNA satélite: minissatélite e microssatélite.....	19
Figura 2. Imagem ilustrativa do local de ligação dos primers dos miniSTR comparativamente aos primers convencionais de STR.	20
Figura 3. Imagem ilustrativa de um polimorfismo de Inserção ou deleção, evidenciando a região que se encontra inserida ou deletada.	28
Figura 4. Esquema representativo do ensaio de Quantifiler [®] DUO pela metodologia Taq Man [®] MGB.....	36
Figura 5. Imagem ilustrativa do processo pelo qual um determinado alelo adquire o número de repetições que tem na sua constituição.	39
Figura 6. Imagem que mostra as partes constituintes do sequenciador automático ABI Prism 3130xl.....	39
Figura 7. Figura ilustrativa das possíveis variantes existentes aquando da eletroforese capilar.	41
Figura 8. Imagem ilustrativa de uma adenilação incompleta.	41
Figura 9. Imagem ilustrativa de um evento de drop-out.	41
Figura 10. Fluoxograma representativo das diversas fases do processo laboratorial.	49
Figura 11. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 3.	58
Figura 12. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 712.2.....	59
Figura 13. Imagem ilustrativa dos eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondente à mistura da amostra 4 com o contaminante 2.	61
Figura 14. Imagem ilustrativa do eletroforegrama obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondente à análise de precisão do método,.	63
Figura 15. Gráfico do número de alelos presentes em cada marcador genético estudado pelo Kit PowerPlex [®] ESI17 da Promega.	68
Figura 16. Imagem ilustrativa do eletroforegrama obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 1 com um volume total de reação de 12,5µl.	84
Figura 17. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 712.2.....	86
Figura 18. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondente à mistura da amostra 2.	88

Figura 19. Imagem ilustrativa dos eletroforegramas obtidos pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondentes à amostra de DNA controlo (9947A).....	90
Figura 20. Gráfico evidenciando o Pretenso Pai com presença de um alelo nulo-D97 ⁺	100

Índice de Tabelas

Tabela I. Tabela ilustrativa das características dos 13 STR do sistema CODIS.	22
Adaptado de 11.	22
Tabela II. Características dos 17 loci STR presentes no kit PowerPlex [®] ESI17.....	25
Adaptado de 7.	25
Tabela III. Características dos 30 loci INDEL e da Amelogenina que fazem parte do kit Investigator DIPplex [®] . Adaptado de 44.	31
Tabela IV. Informação acerca dos segmentos de DNA analisados pelo kit Quantifiler [®] DUO DNA. Adaptado de 6.	35
Tabela V. Tabela ilustrativa do modo de preparação do DNA padrão, importante para a realização da curva padrão que irá capacitar a detecção da concentração das amostras de DNA [6].	51
Tabela VI. Tabela ilustrativa do modo de preparação das misturas de DNA executadas para o ensaio de contaminação do método.	60
Tabela VII. Tabela com os resultados obtidos do software Arlequim v3.5 sobre os parâmetros estatísticos populacionais (Heterozigotia Observada, Heterozigotia Esperada e Equilíbrio de Hardy- Weinberg) estudados para os marcadores do tipo STR do kit PowerPlex [®] ESI17.	64
Tabela VIII. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequim v3.5 acerca das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população de Espanha (Esp.), Estados Unidos América (USA), Reino Unido (RU) e Suécia (Su).	66
Tabela XIX. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequim v3.5 acerca dos P-values das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população de Espanha (Esp.), Estados Unidos América (USA), Reino Unido (RU) e Suécia (Su).	66
Tabela IX. Tabela com os resultados obtidos do software PowerStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (Informação Relativa ao Polimorfismo), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.....	69
Tabela IX (Continuação). Tabela com os resultados obtidos do software PoweStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (Informação Relativa ao Polimorfismo), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.	70
Tabela X. Tabela ilustrativa do modo de preparação das misturas de DNA executadas para o ensaio de contaminação do método.....	87

Tabela XI. Tabela com os resultados obtidos do teste t student para as 3 amostras analisadas.....	91
Tabela XII. Tabela com os resultados obtidos do software Arlequim v3.5 sobre os parâmetros estatísticos populacionais (Heterozigotia Observada, Heterozigotia Esperada e Equilíbrio de Hardy- Weinberg) estudados para os marcadores do tipo InDel do kit Investigator DIPlex®	92
Tabela XIII. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequim v3.5 acerca das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população norte de Portugal (Port. Norte), centro Espanha (Centro Esp.), País Basco, Africana (África) e Europeia (Eur.).....	93
Tabela XIV. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequim v3.5 acerca dos P-values das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população norte de Portugal (Port. Norte), centro Espanha (Centro Esp.), País Basco, Africana (África) e Europeia (Eur.). A população Africana e Europeia não apresentam valores nalguns dos marcadores genéticos devido ao fato de não estarem publicadas frequências alélicas desses marcadores.	94
Tabela XV. Tabela com os resultados obtidos do software PowerStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (Polymorphism Information Content), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.....	97
Tabela XV (Cont.). Tabela com os resultados obtidos do software PowerStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade Coincidência, Poder de discriminação, PIC (Polymorphism Information Content), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.	98

Lista de siglas

A – Adenina

BSA – Albumina de soro bovino

C - Citocina

CE – Eletroforese capilar

CFTR – Regulador transmembranar da Fibrose Quística

Codis – Sistema de índice de DNA combinado (*Combined DNA Index Sistem*)

CSF1PO – Intrão do proto-oncogéne c-fins

DNA –Ácido Desoxirribonucleíco

dNTPS – Deoxinucleótidos fosfatados

EDNAP – Grupo Europeu de Perfis de DNA (*European DNA Profiling Group*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESS – Painele Europeu de marcadores genéticos (*European Standart Set*)

FGA– Intrão do α – fibrinogénio

Fst- Correlação entre alelos dentro de uma subpopulação

G – Guanina

HE – Heterozigotia esperada

HLD – Human locus DIP

HO – Heterozigotia observada

INMLCF – Instituto Nacional Medicina Legal e Ciências Forenses

ISFG – Sociedade Internacional de Genética Forense (*International Society for Forensic Genetics*)

MP – Probabilidade de Coincidência (*Matching Probability*)

Pb – Pares de bases (unidade de comprimento da cadeia de DNA)

PCR Multiplex – Reação de polimerização em cadeia que permite amplificar simultaneamente vários locais do genoma

PD – Poder de discriminação

PE – Poder de exclusão

PIC – Informação relativa a polimorfismo

POP-4 – Polímero otimizado (*Performance optimized Polymer*)

RFU – Unidades relativas de fluorescência (*Relative Fluorescence Units*)

SGBF-S – Serviço de Genética e Biologia Forense- Sul

SNP – Polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

STR – Unidades de repetição em sequência (*Short Tandem Repeat*)

T – Timina

TAPS – Ácido sulfônico N tris-(hidroximetil-metil-3 aminopropano

TBE – Trisborato –EDTA

TH01 – Intrão da tirosina hidroxilase

TPI – Índice de paternidade associado

TPOX – Intrão da peroxidase da tiróide

VNTR – Repetições em sequência com número variado (*Variable Number Tandem Repeat*)

VWA – Intrão do fator de Von Willibrand

Capítulo 1 (Introdução)

1.Introdução

1.1.Identificação Médico-Legal

O método de referência em identificação médico-legal é a identificação visual, que se baseia num reconhecimento, recorrendo à comparação com documentos de identificação, bases de dados com fotografias, ou a familiares. Esta análise é frequentemente feita pelo patologista, no caso de cadáveres, ou pela polícia, no caso de indivíduos vivos, reconhecendo características como o sexo, idade, peso, altura, cor dos cabelos, cor da íris, existência de tatuagens e outros sinais particulares. No caso particular de cadáveres esta forma de identificação é dificultada quando o cadáver se encontra em elevado grau de decomposição e/ou com mutilações (particularmente mutilações faciais) [2,61].

Desta forma é necessário recorrer a outros métodos como a lofoscopia ou a outras especialidades como a medicina dentária. A lofoscopia estuda os desenhos formados pelas cristas dermopapilares dos dedos, palmas das mãos e plantas dos pés, sendo que é uma técnica de baixo custo [31].

Às cristas dermopapilares estão associadas características importantes. Uma delas é a perenidade, ou seja, a sua permanência ao longo de toda a vida, desde o 6º mês de vida intra-uterina, até à destruição da pele por putrefação cadavérica. Outra é a imutabilidade que se descreve como a capacidade de manutenção do número, forma e direção das cristas ao longo de toda a vida, e finalmente outra característica importante é a diversidade/variabilidade que se caracteriza pela variabilidade entre os diferentes dedos, entre as palmas das mãos e as plantas dos pés, no mesmo indivíduo e entre indivíduos diferentes [31].

A lofoscopia só em 1823 passou a ser utilizada como método de identificação humana. Em Portugal surgiu em 1902, mas só em 1906 começou a ser utilizada na identificação, tendo como vantagem a disponibilidade de dados para comparação em registos oficiais [2,31].

A medicina dentária tem como objetivo principal a observação e avaliação da cavidade oral e dentes. Contudo, e contrariamente à lofoscopia, a médico-dentária tem menor número de registos passíveis de comparação [2].

Finalmente, e quando os métodos anteriores não são aplicáveis, segue-se a Antropologia Forense, que tem como objetivo a identificação de restos humanos esqueletizados, quando o cadáver se encontra em avançado estado de degradação, podendo estimar a idade, estatura, sexo, tempo decorrido desde a morte e lesões traumáticas que possam ajudar a determinar a sua causa [2].

Quando nenhum dos métodos atrás referidos é conclusivo, recorre-se à Genética Forense. A identificação genética é realizada através do estudo de marcadores genéticos. Os métodos utilizados são, no entanto, mais laboriosos e dispendiosos que os anteriormente referidos, tendo em comum com os mesmos o facto de não dispensarem amostras de referência para comparação. Amostras essas do próprio indivíduo ou de ascendentes, descendentes ou outros com parentesco biológico.

De acordo com o Grupo Europeu de Perfis de DNA (EDNAP), os marcadores recomendados para a obtenção de perfis genéticos são *loci* de regiões microssatélite do DNA, também designados de Short Tandem Repeats (STR). Mais recentemente foi descrito um novo tipo de marcadores genéticos passíveis de definir um perfil genético, em amostras com elevado grau de degradação, os marcadores do tipo Inserção/Deleção, ou InDel [57].

Existem ainda outros tipos de marcadores genéticos utilizados nos laboratórios de Genética Forense, como os marcadores autossómicos de cromossoma X e Y e os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) [2,57], no entanto neste trabalho iremos apenas debruçar-nos sobre os marcadores do tipo STR e do tipo InDel, que serão abordados adiante.

1.2.Short Tandem Repeat (STR)

As regiões repetitivas do DNA, com tamanho variado entre 5-500pb, com padrão de repetição em tandem, e que compreendem aproximadamente de 3% do genoma, são designadas de DNA satélite [11,18,25,56].

As regiões de DNA satélite incluem as regiões denominadas de *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) ou minissatélites, que são regiões com sequências de 8-100pb, e regiões denominadas de *Short Tandem Repeat* (STR) ou microssatélites, contendo estas, sequências com 2-7pb [11,18,25,57,58]. A figura 1 ilustra as duas formas de DNA satélite.

O número de repetições dos marcadores STR é variável entre os indivíduos, tornando-os, desta forma, ótimos marcadores para identificação humana. As sequências de repetição STR podem ser denominadas de acordo com o número da repetição que apresentam na região amplificada, sendo que um marcador de dinucleotídico tem 2 nucleótidos repetidos e um marcador tri, tetra e pentanucleotídico tem, respectivamente, 3,4 e 5 nucleótidos repetidos. Estes 3 últimos são os mais utilizados em genética forense, sendo que desses, os mais utilizados são os marcadores de tetranucleotídios [25,58].

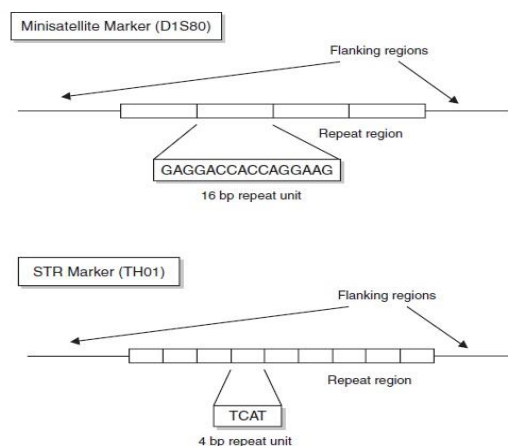


Figura 1. Imagem ilustrativa dos dois tipos de DNA satélite: minissatélite e microssatélite. Adaptado de 18.

O DNA satélite é usado na investigação de casos de interesse histórico, de história de famílias, de origem e dispersão do homem, de localização de genes de suscetibilidade para doenças, de monitorização de transplantes, bem como em perícias forenses, designadamente em investigações de paternidade, criminalista biológica e identificação humana [58].

Uma das características importantes dos STR é o seu elevado polimorfismo. Esses polimorfismos podem residir no número de repetições, no tamanho da unidade de repetição ou ainda na composição da unidade de repetição, sendo que esta última é dividida em repetições simples, compostas, complexas e complexas hipervariáveis. As repetições simples contêm unidades de repetição com tamanho idêntico que se repetem ao longo de toda a sequência, as repetições compostas compreendem 2 ou mais unidades de repetição que se repetem ao longo da sequência, as repetições complexas contêm vários blocos de unidades de repetição variáveis com tamanho variável, e por fim as repetições complexas hipervariáveis contêm vários alelos não consensuais que diferem em tamanho e sequência. Nem todos os alelos contêm unidades de repetição completas, podendo ter somente 1, 2 ou 3 nucleótidos no final da repetição, pelo que adquirem o nome de microvariantes [18,25].

Para o estudo de DNA degradado podem ser utilizados na prática forense, mini-STR, que são STR cujos primers foram desenhados mais próximo da região de repetição, com o objetivo de se obterem produtos de amplificação (amplicon) mais pequenos (50-150pb), como evidenciado na figura 2 [13,25,42,58].

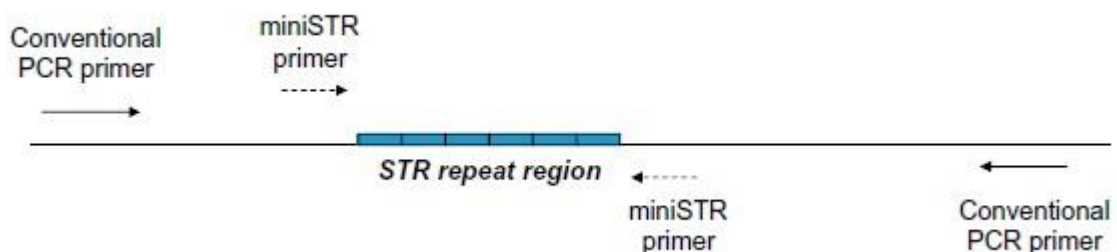


Figura 2. Imagem ilustrativa do local de ligação dos primers dos miniSTR comparativamente aos primers convencionais de STR. Adaptado de 13.

De forma a facilitar a comunicação entre a comunidade Forense por todo o mundo existem regras de nomenclatura dos marcadores genéticos. Essas regras foram recomendadas em 1997 pela Comissão Internacional de DNA da Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) [18].

A primeira regra estabelece que a leitura das sequências de DNA se faz da extremidade 5' para a 3', a segunda, que quando um determinado STR está relacionado com genes codificantes de proteínas, essa será a cadeia utilizada como referência e o marcador terá a abreviatura da proteína que codifica, como é o exemplo do marcador vWA (fator de von Willebrand), enquanto que noutros marcadores o critério é o da sequência descrita primariamente na literatura, em que o número seguinte à letra D é o número do cromossoma em que se localiza o STR e os números seguintes à letra S são números identificadores, como é exemplo o marcador D12S324 que se situa no cromossoma 12 e no 324º locus descrito nesse cromossoma, a terceira regra diz respeito à classificação da sequência de repetição, em que o número de vezes que se repete uma determinada sequência é o número dado ao alelo em questão, por exemplo na sequência: 5' - GG TCA TCA TCA TCA TCA GG-3' o nome do alelo será 5. No entanto, há unidades de repetição que estão incompletas, como é o caso do alelo 9.3 no marcador TH01 (alelo muito frequente na população portuguesa), o que significa que existem 9 cópias da unidade de repetição tetranucleotídica e mais três nucleótidos, estas microvariantes serão então classificadas com o número de repetições completas seguidas de um ponto decimal e do número de nucleótidos existentes de seguida [18].

1.3. European Standart Set (ESS) e Combined DNA Index System (CODIS)

Para além das regras de nomenclatura referidas anteriormente, os marcadores devem, ainda, cumprir determinados requisitos, nomeadamente, elevado poder discriminatório, valores de heterozigotia superiores a 70%, facilidade de reprodutibilidade da técnica, localização em cromossomas distintos ou com localização afastada, baixas taxas de mutações, produtos de PCR com tamanho reduzido e nível de artefactos ou bandas inespecíficas baixo [11].

Em 1999 o Concelho da União Europeia definiu um conjunto de 7 loci, designado por *European Standart Set* (ESS) como sendo o conjunto de loci ideal para identificação humana. Deste conjunto fazem parte os STR autossómicos D3S1358, FIBRA, D8S1179, TH01, vWA, D18S51 e D21S11 [11].

Os Estados Unidos da América utilizam 7 loci do ESS e mais 6 loci, perfazendo um total de 13 loci que são designados como painel de STR do *Combined DNA Index System* (CODIS), e é composto pelos loci autossómicos TPOX, D3S1358, FIBRA ou FGA, D5S818, CSF1PO, D7S820, D8S1179, TH01, vWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11 e o gene homólogo da amelogenina (X e Y). Dos 13 loci presentes no sistema CODIS, os mais polimórficos são o FGA, D18S51 e D21S11, enquanto que aquele que apresenta menor variação é o TPOX [11]. As características dos 13 STR do sistema CODIS encontram-se na tabela I.

Tabela I. Tabela ilustrativa das características dos 13 STR do sistema CODIS.

Adaptado de 11.

Locus	Localização cromossómica	Posição física	Categoria e motivo de repetição	Série de alelos
TPOX	2p25.3- 10º intrão da peroxidase da tiroide	Cromossoma 2, 1.472 Mb	Simple- GAAT	4-16
D3S1358	3p21.31	Cromossoma 3, 45.557 Mb	Composta- TCTG/TCTA	8-21
FGA	4q31.3- 3º intrão do α -fibrinogénio	Cromossoma 4, 155.866 Mb	Composta- CTTT/TTCC	12.2-51.2
D5S818	5q23.2	Cromossoma 5, 123.139 Mb	Simple- AGAT	7-18

CSF1PO	5q33.1- 6º intrão do proto-oncogene c-fms	Cromossoma 5, 149.436 Mb	5,	Simples- TAGA	5-16
D7S820	7q21.11	Cromossoma 83.433 Mb	7,	Simples- GATA	5-16
D8S1179	8q24.13	Cromossoma 125.976 Mb	8,	Composta- TCTA/TCTG	7-20
TH01	11p15.5- 1º intrão da tirosina hidroxilase	Cromossoma 2.149 Mb	11,	Simples- TCAT	3-14
vWA	12p13.31- 40º intrão do fator de von Willebrand	Cromossoma 5.963 Mb	12,	Composto- TCTG/TCTA	10-25
D13S317	13q31.1	Cromossoma 81.620 Mb	13,	Simples- TATC	5-16
D16S539	16q24.1	Cromossoma 84.944 Mb	16,	Simples- GATA	5-16
D18S51	18q21.33	Cromossoma 59.100 Mb	18,	Simples- AGAA	7-40
D21S11	21q21.1	Cromossoma 19.476 Mb	21,	Complexo- TCTA/TCTG	12-41.2

Atualmente, no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses-Delegação do Sul, utilizam-se 13 loci STR do sistema CODIS e mais 4 loci autossômicos, D2S1338, D19S433, Penta D e Penta E.

Em 2009 o Concelho da União Europeia redefiniu o conjunto dos loci que fazem parte do ESS acrescentando 5 miniSTR (D2S441, D10S1248, D22S1045, D12S391, D1S1656) [11,63]. Contudo, ainda não existem frequências alélicas calculadas e publicadas para os novos STR, o que impossibilita a sua utilização na identificação genética humana. As características dos marcadores do ESS serão abordadas mais adiante na secção 1.4.

Recentemente e para incluir os novos marcadores do ESS foi criado pela *Promega Corporation* o kit PowerPlex® ESI17, que inclui 17 marcadores de STR, 5 dos quais os novos marcadores do ESS [63].

A validação do kit PowerPlex® ESI17 será referenciada mais adiante na secção 1.5 [62, 65].

1.4. Sistema PowerPlex® ESI17

Foi desenvolvido para fazer identificação humana, nomeadamente para investigação de parentesco e criminalística biológica. Permite bons resultados em amostras com presença de inibidores e aumenta a sensibilidade em amostras degradadas, por ter na sua constituição mini-STR [63].

Este kit permite, a co-amplificação, em reação de PCR Multiplex, de 17 loci: D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWa, TH01, SE33, FGA, D8S1179 e o gene homólogo da Amelogenina (cromossoma X e Y), marcados com fluorocromos. O marcador fluorosceína sinaliza, com a cor azul, os loci D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358 e a amelogenina, o marcador JOE sinaliza, com a cor verde, os loci D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51 e D16S539. Por sua vez, o marcador TMR-ET sinaliza os loci D12S391, D21S11, vWa e TH01, atribuindo-lhes a cor amarela e por fim o marcador CXR-ET sinaliza os loci SE33, FGA e D8S1179 e lhes atribui a cor vermelha [63].

Estes marcadores apresentam produtos de amplificação com tamanhos situados entre os 72 pb (TH01) e os 345 pb (D22S1045), pelo que obedecem ao requisito do reduzido tamanho dos produtos de amplificação. Apesar dos marcadores D2S1338 e D2S441 se situarem ambos no cromossoma 2, estão em braços diferentes do cromossoma, braço longo (q) e braço pequeno (p), respetivamente. O mesmo acontece com os marcadores D12S391 e vWA que se situam no cromossoma 12, mas em braços diferentes do cromossoma. Desta forma estes marcadores obedecem ao requisito da necessidade dos marcadores se situarem em cromossomas distintos ou afastados [11,63].

As características dos 17 loci STR presentes no kit PowerPlex® ESI17 estão indicadas na tabela II.

Tabela II. Características dos 17 loci STR presentes no kit PowerPlex® ESI17.

Adaptado de 7.

Locus	Localização cromossômica	Posição física	Categoria e motivo de repetição	Série de alelos	Taxa Mutação
D22S1045	22q12.3	Cromossoma 22; 35,779,368 Mb	Simples- [ATT] _n	7-20	-
D2S1338	2q35	Cromossoma 2; 218,705 Mb	Complexa- [TGCC] _n [TTCC] _n	10-28	0,12%
D19S433	19q12	Cromossoma 19; 35,109 Mb	Complexa- [AAGG][AAAG][AAGG][TAGG][AAGG] _n	5.2-18.2	0,11%
D3S1358	3p21.31	Cromossoma 3; 45.557 Mb	Simples- [TCTA] _n	9-20	0,12%
D2S441	2p14	Cromossoma 2; 68,213,613 Mb	Simples- [TCTA] _n	8-17	-
D10S1248	10q26.3	Cromossoma 10; 130,566,908 Mb	Simples- [GGAA] _n	8-19	-
D1S1656	1q42	Cromossoma 1; 228,972 Mb	Complexa- [TAGA] _n [TGA] ₀₋₁ [TAGA] _n [TAGG] ₀₋₁ [TG] ₅	9-20.3	-
D18S51	18q21.33	Cromossoma 18; 59,100 Mb	Simples- [GAAA] _n	7-27	0,22%
D16S539	16q22-24	Cromossoma 16; 84,944 Mb	Simples- [GATA] _n	4-16	0,11%
D12S391	12q	Cromossoma 12; 12,341 Mb	Complexa- [AGAT] ₈₋₁₇ [AGAC] ₆₋₁₀ [AGAT] ₀₋₁	14-27	-
D21S11	21q21.1	Cromossoma 21; 19,476 Mb	Complexa- [TCTA] _n [TCTG] _n	24-38	0,19%
vWa	12p13.31; 40° intrão do fator de von Willebrand	Cromossoma 12; 5,963 Mb	Complexa- [TCTA] _n [TCTG] _n [TCCA]	10-24	0,17%
TH01	11p15.5; 1° intrão do	Cromossoma 11; 2,149 Mb	Simples- [AATG] _n	3-13.3	0,01%

	gene da tirosina hidroxilase humana				
SE33	6q14; Pseudogene relacionado com β -actina	Cromossoma 6; 89,043 Mb	Simple- [AAAG] _n	4.2- 42	0,64%
FGA	4q28; 3° intrão do gene α - fibrinogénio	Cromossoma 4; 155,866 Mb	Complexa- [TTTC] ₃ TTTTTCT[CTTT] _n CT CC[TTCC] ₂	14- 50.2	0,28%
D8S1179	8q24.13	Cromossoma 8; 125,976 Mb	Simple- [TCTA] _n	7-19	0,14%

Em alguns marcadores genéticos as taxas de mutação não estão calculadas, por se tratarem de marcadores recentes, pelo que não existem estudos acerca deles. As frequências alélicas têm vindo a ser publicadas por alguns laboratórios, nos estudos efetuados com as suas próprias populações.

1.4.1. Validação do Powerplex[®] ESI17 (Promega)

A redução dos volumes dos reagentes é frequentemente utilizada nos laboratórios de Genética Forense com o objetivo de reduzir os custos do ensaio, contudo pode afetar a eficácia da análise, sendo por isso necessário validar a sua utilização. Para além disso, procedeu-se também à análise dos limiares analíticos com o objetivo de detetar a concentração mínima necessária à reação para que seja possível obter um perfil genético completo. Para tal analisaram-se amostras com diferentes diluições, 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 [65,66,67].

A análise da contaminação do método tem como objetivo determinar o poder de diferenciação entre dois contribuidores para uma só amostra. Este ensaio é importante uma vez que durante a prática laboratorial, podem ocorrer contaminações das amostras, quer por existência de DNA genómico no ambiente, quer por contaminação entre duas amostras durante a preparação, ou por contaminação com DNA amplificado. Assim é importante o especialista saber identificar uma mistura de DNA e, de igual forma, é importante que o kit seja sensível para detetar alelos em pequenas concentrações numa mistura [65,66,67].

A precisão do método, outro ensaio realizado aquando do processo de validação, tem como finalidade avaliar a precisão do método na deteção de alelos com diferença num único par de bases [65,66,67]. Este ensaio foi desenvolvido segundo regras estabelecidas no serviço de Genética e Biologia Forense.

1.5. Polimorfismos de Inserção/Deleção (InDel)

Um outro tipo de marcadores genéticos utilizados são os polimorfismos de Inserção/Deleção que se situam em promotores, intrões e exões, podendo até, alguns ter impacto na função de genes e conseqüentemente em doenças humanas [51,54].

A fibrose quística é um dos exemplos de doenças causadas pelos polimorfismos de Inserção/Deleção em que existe uma deleção de 3pb num alelo do gene CFTR. Essa deleção leva à eliminação de um aminoácido da proteína codificada por esse gene, levando conseqüentemente à doença. Outros exemplos de doenças causadas por este tipo de polimorfismos são o Síndrome do X-Fragil, em que há uma expansão de seqüências de tri-nucleótidos, Hemofilia, Neurofibromatose, Distrofia Muscular e Cancro [51].

Contudo, e apesar da aparente ligação deste tipo de polimorfismo com algumas doenças, no âmbito da Genética Forense os marcadores de Inserção/Deleção a utilizar não deverão estar associados com quaisquer doenças.

Os polimorfismos de Inserção/Deleção são polimorfismos bi-alélicos, de tamanho, que se caracterizam pela Inserção ou Deleção, de um segmento de DNA específico que varia de 4 a 22 nucleótidos, e que se encontram divididos em inserção e/ou deleção pelo genoma [15,35,44,49,51,54,69,70]. A figura 3 representa um exemplo de polimorfismo de Inserção/ Deleção.

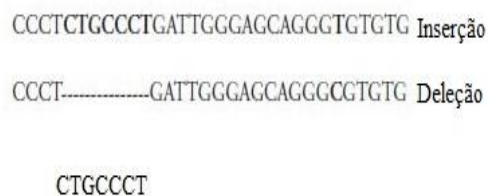


Figura 3. Imagem ilustrativa de um polimorfismo de Inserção ou deleção, evidenciando a região que se encontra inserida ou deletada.

Adaptado de <http://www.scielo.org.ar/img/revistas/invet/v12n2/a05fig1.jpg> (consultado a 9 de Setembro de 2013).

Atualmente são cinco as classes de InDel conhecidos:

- 1) Inserções e Deleções de uma única base;
- 2) Expansão monomérica de bases;
- 3) Expansão de múltiplas bases, com aproximadamente 2-15 pb unidades de repetição;
- 4) Inserção de transposões;
- 5) InDel com sequências aleatórias.

Este trabalho focar-se-á no estudo dos polimorfismos de Inserção/Deleção com sequências aleatórias, que representam cerca de 41% dos InDel e na sua maioria têm tamanho inferior a 100pb [48,51,54].

Como foi referido atrás, os marcadores genéticos atualmente utilizados pela genética forense, os STR, apresentam algumas limitações como o tamanho relativamente elevado do produto de amplificação, que varia entre 100 e 400pb, limitando a correta análise de amostras degradadas, e a presença de artefactos como picos stutter. Um sistema de marcadores alternativos aos STR são os marcadores SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, que têm produtos de amplificação com tamanho reduzido, não produzem picos stutter e as suas taxas de mutação são menores comparativamente com os marcadores STR. Contudo, as técnicas de deteção utilizadas são mais complexas e os marcadores têm menor poder de discriminação [15,35,47].

A combinação das vantagens de ambos os tipos de marcadores genéticos seria, certamente, a situação ideal. Os marcadores do tipo Inserção/Deleção (InDel) possuem muitas dessas vantagens. Os seus produtos de amplificação são de reduzido tamanho, melhorando os resultados em amostras degradadas e análise laboratorial é relativamente simples, automatizada e barata, uma vez que é semelhante à análise feita com marcadores STR [34,36,46,49,51,69,70].

Os marcadores do tipo InDel representam aproximadamente 30% dos polimorfismos de DNA existentes no genoma humano e encontram-se distribuídos por vários cromossomas, com pelo menos 10Mbp de distância, situando-se maioritariamente nos cromossomas 1,2,3,4,6,7,9,10,13 e 20 [46,47,51,72]. Os cromossomas X e Y apresentam uma percentagem de polimorfismos InDel

relativamente baixa, quando comparados com os restantes cromossomas [46,47,51,72].

Devido à elevada percentagem dos polimorfismos de inserção/deleção no genoma humano, bem como às suas características é possível utiliza-los para identificação genética de indivíduos, estudos de ancestralidade, estudos da estrutura da população, em particular em casos forenses ou criminais, em amostras degradadas [36,47,48,54].

1.5.1. Sistema Investigator DIPplex® (Qiagen)

Este sistema foi desenvolvido para a amplificação de 30 marcadores de Inserção/Deleção mais o gene homólogo da Amelogenina. Tem capacidade para tipar amostras degradadas ou com pouco DNA, por ter produtos de amplificação pequenos, como foi referido anteriormente. Os marcadores encontram-se distribuídos por 19 autossomas, com pelo menos 10Mb de distância entre si e dos outros marcadores genéticos como STR e SNP [44,51,68]. As características dos marcadores referidos encontram-se indicadas na tabela III.

Tabela III. Características dos 30 loci INDEL e da Amelogenina que fazem parte do kit Investigator DIPplex®. Adaptado de 44.

Locus	Localização cromossómica	Motivo de Inserção/Deleção
Marcador com fluoroforo com emissão no comprimento de onda correspondente à cor Azul		
Amelogenina X	Xp22.1-22.3	
Amelogenina Y	Yp11.2	
HLD77	7q31.1	TAAG
HLD45	2q31.1	CACG
HLD131	7q36.2	TGGGCTTATT
HLD70	6q16.1	AGCA
HLD6	16q13	GCAGGACTGGGCACC
HLD111	17p11.2	CACA
HLD58	5q14.1	AGGA
HLD56	4q25	TAAGT
Marcador com fluoroforo com emissão no comprimento de onda correspondente à cor Verde		
HLD118	20p11.1	CCCCA
HLD92	11q22.2	GTTT
HLD93	12q22	ACTTT
HLD99	14q23.1	TGAT
HLD88	9q22.32	CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	GTAG
HLD67	5q33.2	CTACTGAC
Marcador com fluoroforo com emissão no comprimento de onda correspondente à cor Amarelo		
HLD83	8p22	AAGG
HLD114	17p13.3	TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD48	2q11.2	GACTT

HLD124	22q12.3	GTGGA
HLD122	21q22.11	GAAGT
HLD125	22q11.23	ATTGCC
HLD64	5q12.3	GACAAA
HLD81	7q21.3	GTAAGCATTGT
Marcador com fluoroforo com emissão no comprimento de onda correspondente à cor Vermelho		
HLD136	22q13.1	TGTTT
HLD133	3p22.1	CAACCTGGATT
HLD97	13q12.3	AGAGAAAGCTGAAG
HLD40	1p32.3	GGGACAGGTGGCCACTAGGAGA
HLD128	1q31.3	ATTAAATA
HLD39	1p22.1	CCTAAACAAAAATGGGAT
HLD84	8q24.12	CTTTC

Os primers são marcados com fluorescência, nomeadamente azul (6-FAM), verde (BTG), amarela (BTY) e vermelha (BTR) [44].

1.5.2. Validação do Investigator DIPplex[®] (Qiagen)

Uma vez que alguns dos marcadores presentes no kit são novos é necessário que o kit sofra um processo de validação para poder ser utilizado na rotina das perícias forenses. Assim procedeu-se à análise da eficácia do mesmo para diferentes características, nomeadamente, na redução dos volumes dos reagentes, nos limiares analíticos, na contaminação e na precisão [47].

A redução dos volumes dos reagentes é frequentemente utilizada nos laboratórios de Genética Forense com o objetivo de reduzir os custos do ensaio, contudo pode afetar a eficácia da análise, sendo por isso necessário validar a sua utilização. Analisou-se também os limiares analíticos com o objetivo de detetar a concentração mínima necessária à reação para que seja possível obter um perfil genético completo. Para tal analisaram-se amostras com diferentes diluições, 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 [47]. A análise da contaminação do método tem como objetivo determinar o poder de diferenciação entre dois contribuidores para uma só amostra. Este ensaio é importante uma vez que durante a prática laboratorial, podem ocorrer contaminações das amostras, quer por existência de DNA genómico no ambiente, quer por contaminação entre duas amostras durante a preparação ou por contaminação com DNA amplificado. Assim torna-se importante para o especialista saber identificar uma mistura de DNA e de igual forma importante ter kit's que sejam sensíveis para detetar alelos em pequenas concentrações numa mistura [47]. A precisão do método, outro ensaio realizado aquando do processo de validação, tem como finalidade a avaliação da capacidade que o método tem de obter a mesma classificação alélica em amplificações e corridas diferentes da mesma amostra mas com tempos de injeção diferentes [47]. Este procedimento difere do utilizado no kit PowerPlex[®] ESI17, uma vez que os marcadores do tipo InDel são marcadores bi-alélicos em que não existe a possibilidade de existência de tantos polimorfismos.

1.6. Procedimentos laboratoriais/experimentais

1.6.1. Extração de DNA pelo método de Chelex[®] 100

O método de Chelex[®] 100 é um método não orgânico de extração de DNA, utilizado pela primeira vez no âmbito forense em 1991 [8,16,23,55,71].

O Chelex é uma resina quelante que se liga a íons metálicos, como o magnésio da molécula de DNA. Essa ligação provoca a inativação de DNA-nucleases, permitindo que a molécula de DNA permaneça intacta. O Chelex é composto por co-polímeros de estireno-divenilbenzeno emparelhados com íons iminodiacetato, que atuam como grupos quelantes [8,16,23,55,71].

Para a extração de DNA foi utilizado um fragmento circular, com cerca de 3mm de diâmetro, do suporte de papel com sangue, seguindo-se o procedimento descrito por Walsh, PS, e colaboradores [8,16,23,55,71].

Como vantagens deste método temos a prévia remoção de inibidores da PCR, simplicidade, baixo custo, rapidez, uso de produtos inócuos para a saúde, utilização de um único tubo durante todo o processo, reduzindo a possibilidade de contaminação, e a capacidade imediata de utilizar o produto da extração para a amplificação. Contudo, poderá ser necessário concentrar o DNA obtido antes de se efetuar a PCR [8,16,23,55,71].

1.6.2. Quantificação de DNA por Quantifiler[®] Duo (Applied Biosystems)

O ensaio de Quantifiler[®] Duo permite quantificar o DNA total, o DNA masculino e detetar a presença de inibidores nas amostras em estudo [4,6,9].

A concentração de DNA total é medida pela análise de emissão de fluorescência da componente H1 da ribonuclease P RNA (RPPH1) que está marcada com o fluorocromo VIC[®]; a concentração de DNA masculino pela análise de emissão de fluorescência da região determinante do sexo do cromossoma Y (SRY), que está marcada com o fluorocromo FAM[™]; e a concentração de DNA do controlo interno IPC, pela análise de uma sonda artificial marcada com o fluorocromo NED[™]. Esta última determinação vai permitir identificar a presença de inibidores na amostra bem como determinar, de forma rápida, a inexistência de DNA humano numa determinada amostra [4,6,9].

A tabela IV fornece informação acerca dos segmentos de DNA que são amplificados pelo kit [6].

Tabela IV. Informação acerca dos segmentos de DNA analisados pelo kit Quantifiler[®] DUO DNA. Adaptado de 6.

Alvo	Marcador	Localização	Tamanho (pb)	Fluorocromo
DNA humano total	RPPH1 (Componente H1 da ribonuclease p RNA)	14q11.2	140	VIC [®]
DNA humano masculino	SRY (Região determinante do sexo do cromossoma Y)	Yp11.3	130	FAM [™]
Controlo interno PCR	Sonda artificial		130	NED [™]

O ensaio é realizado com “Real-Time PCR”, recorrendo à metodologia Taq Man[®]MGB. A sonda Taq Man é marcada com dois marcadores fluorescentes (marcador “repórter” na região 5’ e marcador “quencher” na região 3’), que emitem em diferentes comprimentos de onda. Esta sonda liga-se a uma região específica situada entre o primer *foward* e o *reverse*. Antes da polimerização, a sonda Taq Man

permanece intacta, pelo que a proximidade entre os marcadores leva a uma supressão da fluorescência pelo repórter. Com o início da polimerização, a nova cadeia sintetizada separa o marcador *repórter* do *quencher*, resultando numa emissão de fluorescência. A intensidade da fluorescência emitida permite inferir a concentração de DNA da amostra em ng/ μ l, recorrendo a um software específico [4,6,9]. A figura 4 representa o esquema do ensaio de Quantifiler[®]DUO pela metodologia TaqMan[®]RGB.

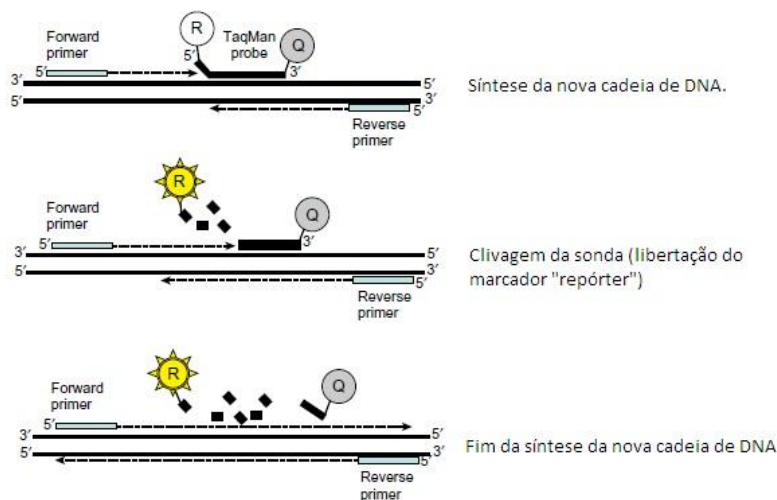


Figura 4. Esquema representativo do ensaio de Quantifiler[®] DUO pela metodologia Taq Man[®]MGB. Adaptado de 9.

A sensibilidade do método é bastante elevada, sendo capaz de quantificar amostras com concentração de DNA a partir de 0,023ng/ μ L e capaz de determinar a concentração de DNA masculino mesmo quando a quantidade de DNA feminino é muito elevada [4,6].

Esta técnica de quantificação apresenta várias vantagens como: a especificidade para um determinado alvo no genoma, a capacidade para detetar poucas cópias de DNA, a possibilidade multiplex, a facilidade de implementação do método, a capacidade de detetar os inibidores de PCR através do controlo interno e o automatismo do processo [4,6].

1.6.3.PCR Multiplex

A reação de polimerização em cadeia ou PCR foi apresentada em 1985 por Kary Mullis e consiste na amplificação repetida de regiões específicas do DNA. A reação de PCR multiplex tem o mesmo princípio que a reação de PCR convencional, contudo promove uma amplificação simultânea de vários loci, aumentando assim a rentabilidade do trabalho laboratorial [10,17,24].

A PCR tem como vantagens a capacidade de amplificar quantidade reduzida de DNA ou DNA degradado, capacidade de amplificar várias sequências numa mesma amostra recorrendo a reação PCR multiplex, e a facilidade de realização dos ensaios devido à elevada e variada disponibilidade no mercado [10,17,24].

Contudo, existem desvantagens como: componentes que a podem inibir, nomeadamente alguns agentes químicos, grupo heme do sangue, sais biliares, polissacáridos das fezes, ácido húmico do solo e a ureia da urina. Altas concentrações de iões como o cálcio e o magnésio podem também inibir a ação da polimerase bem como o EDTA (agente quelante usado na extração de DNA de ossos) e ainda a tinta azul das calças. Quando não é possível a eliminação dos inibidores da PCR adiciona-se BSA (Albumina de Soro Bovino) que funciona como local de ligação dos inibidores, competindo com o DNA e removendo ou reduzindo a concentração dos inibidores.

É ainda importante, separar a zona de preparação pré-PCR e de Pós-PCR, de forma a minimizar a contaminação dos produtos de amplificação com material não amplificado e exógeno à reação [10,17,24].

1.6.4. Eletroforese capilar

Após a reação de PCR Multiplex é necessário separar os componentes amplificados de modo a obter um resultado na forma de eletroforegrama. Para tal procede-se a uma eletroforese capilar (CE) num sequenciador automático do tipo ABI PRISM[®] 3130xl [12,19,20,26].

As amostras, são injetadas pelo capilar recorrendo à aplicação de voltagem. Essa voltagem faz com que as moléculas negativas, nomeadamente o DNA e o marcador interno, migrem pelo capilar, do polo negativo (cátodo) para o polo positivo (ânodo). As moléculas de DNA migram consoante o seu tamanho, sendo que as moléculas maiores migram mais lentamente que as mais pequenas, atingindo assim a câmara de passagem de laser mais tarde que as moléculas pequenas. Ao atingirem a câmara de passagem de laser, as moléculas marcadas com fluorocromos, são excitadas por um laser de argon a 488 nm e emitem fluorescência. Essa fluorescência é então detetada por um aparelho acoplado a uma câmara, sendo esta informação armazenada no software de recolha na unidade RFU (*Relative Fluorescence Units*) [12,19,20,26].

Após a recolha dos dados, o software GeneMapper[™] ID remove a sobreposição dos espetros e calcula o tamanho dos fragmentos amplificados. Esta técnica permite analisar fragmentos de DNA que se sobrepõem em tamanho, desde que estes estejam marcados com fluorocromos diferentes [12,19,20,26].

Para que seja possível detetar o tamanho dos produtos de PCR é corrido em conjunto o marcador interno que contem fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos e marcados com fluorocromos. É então feita uma curva de calibração que compara os picos de amostras desconhecidas com os picos do marcador interno. O último passo deste processo de deteção é a atribuição de designações aos alelos dos produtos amplificados e para tal é necessário a presença, na corrida de eletroforese, do ladder alélico. Assim, o pico desconhecido é comparado com o ladder alélico, processo esse que é feito a todos os picos do eletroforegrama por forma a obter um perfil genético. A forma como a comparação do pico desconhecido, com os picos do ladder alélico é feita, está exemplificado na figura 5 [12,19,20,26,27].

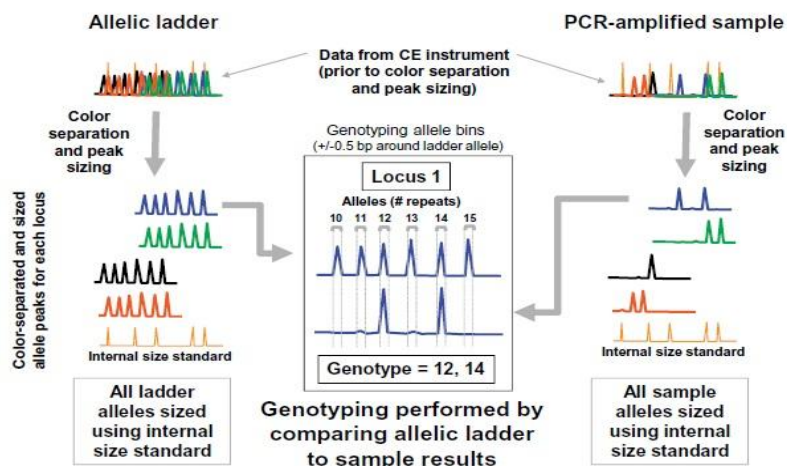


Figura 5. Imagem ilustrativa do processo pelo qual um determinado alelo adquire o número de repetições que tem na sua constituição. Adaptado de 27.

Existem vários aparelhos para eletroforese capilar, nomeadamente o ABI Prism 373, 377, 310, 3100, 3130xl, 3500, 3500xl e o 3700. Os ABI Prism 3100 e o 3130xl foram desenvolvidos em 2000, demoram aproximadamente 35 a 45 minutos a ler as amostras e têm respetivamente 4 e 6 capilares. O 3130xl é o sequenciador automático utilizado no laboratório de Genética Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses de Lisboa. A figura 6 representa o sistema de capilares e leitura das amostras dos ABI Prism 3130xl [12,19,20,26].

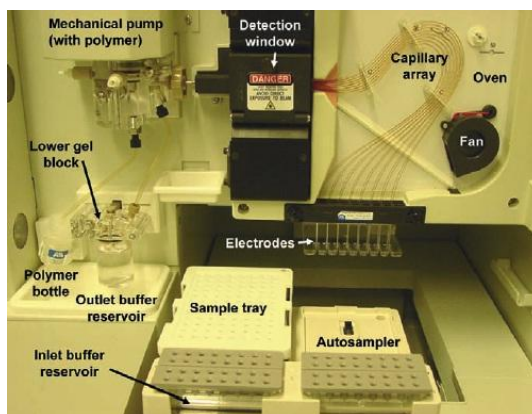


Figura 6. Imagem que mostra as partes constituintes do sequenciador automático ABI Prism 3130xl. Adaptado de 12.

A técnica de eletroforese capilar tem bastantes vantagens, nomeadamente o facto da injeção, separação e deteção serem completamente automatizados, a necessidade de pouca quantidade de amostra, a rapidez de separação das moléculas, possibilidade de armazenamento eletrónico do resultado, o facto da amostra de DNA não ser completamente consumida, o que torna possível repetir o ensaio caso haja algum contratempo, e por fim a possibilidade de análise de várias amostras simultaneamente devido ao elevado número de capilares no aparelho [12,19,20,26].

Existem alguns fatores que influenciam a resolução da eletroforese capilar. Esses fatores são o tamanho do capilar, a voltagem de separação e a concentração do polímero, sendo que maiores capilares com voltagem de separação baixa e concentrações maiores de polímero aumentam a resolução da separação, demorando no entanto mais tempo [10,12,19,20,26].

Para além dos fatores atrás referidos ocorrem por vezes problemas na eletroforese capilar que dificultam a análise dos eletroforegramas, como por exemplo microvariantes, picos stutter, adenilação incompleta, pull-ups e drop-out de alelos. Alguns desses eventos encontram-se exemplificados nas figuras 7 e 8.

As microvariantes são alelos com diferença de 1, 2 ou 3 nucleótidos do alelo “base”. Por exemplo o alelo 9.3 tem mais 3 bases que o alelo 9 e menos 1 que o 10.

Os picos stutter são picos com diferença numa unidade de repetição do alelo real. São formados por deslizamento do primer durante o processo de extensão da cadeia de DNA na PCR.

Na adenilação incompleta, a Taq polimerase adiciona nucleótidos (normalmente adeninas) à cadeia recentemente sintetizada. Neste caso o alelo de interesse vai ser representado por dois picos separados entre si por um par de bases.

Os pull-ups são sombras de outros alelos com elevada expressão no eletroforegrama.

O drop-out de alelos caracteriza-se pela não amplificação ou amplificação incorreta de um ou de ambos os alelos da amostra, como exemplificado na figura 9 [3,10,14,22,26,39].

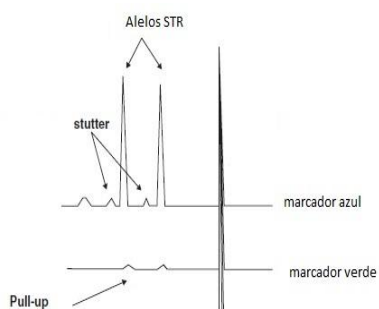


Figura 7. Figura ilustrativa das possíveis variantes existentes aquando da eletroforese capilar. Adaptado de 26.

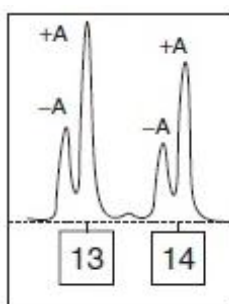


Figura 8. Imagem ilustrativa de uma adenilação incompleta. Adaptado de 26.

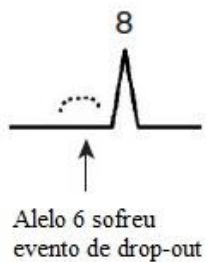


Figura 9. Imagem ilustrativa de um evento de drop-out. Adaptado de 26.

1.7. Análise Estatística

Em genética forense a análise estatística apresenta um papel preponderante para a avaliação dos seus resultados, ou seja, é necessário avaliar de que forma determinado indivíduo pode ou não estar relacionado com determinada evidência genética.

Assim, neste contexto, antes de introduzir determinada metodologia genética na rotina dos casos forenses é necessário proceder ao estudo genético da população de referência, neste caso, a população sul de Portugal, através do estudo de determinados parâmetros estatísticos populacionais e forenses cujo principal objetivo consiste em avaliar se determinado marcador genético reúne as características fundamentais para a sua aplicação na rotina dos casos forenses.

1.7.1. Parâmetros estatísticos populacionais

A primeira fase do estudo genético populacional consiste na definição da população em estudo. Assim, define-se população como um grupo de indivíduos que vive numa determinada área geográfica restrita e que se podem cruzar aleatoriamente com indivíduos do sexo oposto mas do mesmo grupo geográfico [59].

A segunda fase do estudo populacional consiste no estudo das frequências de cada um dos alelos em cada loci de forma a caracterizar a variação genética destes marcadores na população em estudo [59].

Para o estudo genético populacional é essencial verificar se a população está ou não em equilíbrio genético, definido como equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este conceito foi formulado em 1908 pelo matemático inglês G.Hardy e pelo médico alemão W. Weinberg e afirma que uma população, dentro de determinadas condições (população de organismos diploides, com reprodução sexuada, de grande tamanho, com cruzamentos aleatórios entre homens e mulheres, sem efeitos de migração, sem mutações, sem presença de alelos nulos e sem seleção natural), mantém as suas características genéticas constantes ao longo do tempo [28,40,45,59,73,74].

De acordo com este modelo existe uma relação entre frequências genotípicas (quociente entre o número de indivíduos com um determinado genótipo e o número total de indivíduos estudados) e as frequências alélicas (quociente entre o número de cópias de um alelo num determinado grupo de estudo e o número total de alelos observados na amostra de estudo), dada, respetivamente pelas seguintes relações: $AA = p^2$, $Aa = 2pq$, $aa = q^2$, sendo AA e aa genótipos homocigóticos e Aa genótipos heterocigóticos e em que p e q são as frequências dos alelos A e a, respetivamente [28,40,45,59,73,74].

As populações humanas não são fechadas. Existem fluxos populacionais, nomeadamente fenómenos de imigração. Num passado recente o sul de Portugal, em particular a região de Lisboa tem recebido indivíduos provenientes de outras regiões do globo que eventualmente poderão levar à introdução de novas características genéticas e assim alterar as frequências genéticas. Outros fenómenos, menos comuns, que poderão alterar o equilíbrio populacional são as mutações genéticas e a seleção natural [59].

A análise genética populacional para fins forenses deverá ser completada através do estudo de Heterocigotia observada e a estimativa da heterocigotia esperada. A heterocigotia observada, com base nos dados obtidos laboratorialmente, calcula a probabilidade de dois alelos do mesmo locus, tomados ao acaso na população, serem diferentes. Assim, a heterocigotia observada é a percentagem de indivíduos heterocigóticos observados em relação ao número total de indivíduos analisados, enquanto a heterocigotia esperada é obtida através da proporção de heterocigóticos esperados se a população estiver em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A variabilidade genética de uma determinada população é medida pela heterocigotia média por locus [29,40,45,73,74].

O estudo da variabilidade genética de uma população, deve ser complementada com o estudo comparativo de outras populações, de forma a determinar a amplitude da variabilidade genética e das proporções alélicas da população de estudo. Wright (1951) introduziu um coeficiente, designado por F_{st} , na prática forense [29,53,59].

1.7.2. Parâmetros estatísticos Forenses

A estimativa dos parâmetros estatísticos forenses tem como objetivo averiguar se os marcadores genéticos aplicados em genética forense são suficientemente discriminativos e em última instância calcular com grande credibilidade qual a probabilidade de um indivíduo estar relacionado com determinado processo (criminal ou civil) comparativamente a outro indivíduo ao acaso na população.

Os parâmetros forenses necessários para a avaliação de um determinado marcador genético, são:

1. Probabilidade de coincidência, isto é, a probabilidade de dois indivíduos ao acaso na população terem genótipos coincidentes. Sendo este parâmetro uma probabilidade, o seu valor máximo é de 1.
2. Poder de discriminação definido como a probabilidade de dois indivíduos ao acaso na população terem genótipos diferentes, é por isso o oposto do parâmetro anteriormente referido.
3. PIC (*Polymorphism Information Content*), que representa a informatividade que determinado polimorfismo confere ao marcador para que seja possível a dedução do parentesco genético. Valores superiores a 5 indicam que o polimorfismo é muito informativo, enquanto que valores inferiores a 0,25 indicam baixa informatividade do polimorfismo.
4. Poder de exclusão definido como a probabilidade de um sistema genético específico possa contribuir para a exclusão de um determinado indivíduo.
5. Índice de paternidade associado (TPI) indica quantas vezes é mais provável que um indivíduo, que está a ser testado, seja realmente pai biológico do que um indivíduo selecionado aleatoriamente. Quando o seu valor é inferior a 1 indica a inexistência de parentesco entre indivíduos [5,22,33,43,56,59].

Capítulo 2 (Objetivos)

2.Objetivos

2.1. Objetivo genérico

O objetivo do trabalho é caracterização de novos marcadores genéticos do tipo STR e InDel de forma a tornar possível a sua utilização nos casos periciais de genética forense.

2.2. Objetivos específicos

1. Implementação da técnica de PCR multiplex que integre os novos marcadores STR do ESS (*European Standart Set*), D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 e D22S1045, no SGBF-S;
2. Implementação da técnica de PCR multiplex que integre os novos marcadores InDel, no SGBF-S;
3. Validação dos ensaios multiplex para marcadores STR do ESS e InDel, no SGBF-S;
4. Obtenção de frequências alélicas dos marcadores estudados, no SGBF-S;
5. Obtenção de outros parâmetros populacionais e forenses dos dois tipos de marcadores, no SGBF-S.

Capítulo 3 (Desenvolvimento- Kit PowerPlex®ESI17 (promega))

Subcapítulo 3.1 (Amostra de estudo)

Subcapítulo 3.2 (Materiais e métodos)

3. Marcadores STR do Painel Europeu presentes no kit PowerPlex® ESI17 (Promega)

3.1. Amostra em estudo e formas de armazenamento

Estudamos uma amostra com 122 indivíduos (61 do sexo feminino e 61 do sexo masculino) oriundos do sul de Portugal e com ascendência Portuguesa. Os indivíduos foram selecionados ao acaso de entre os indivíduos que compareceram ao serviço de Genética e Biologia Forense no âmbito de perícias médico-legais. A amostra biológica estudada (sangue) foi recolhida para cartões Whatman® Blood Stain Cards, acondicionada em estufa por 24h e armazenada para futura utilização.

A colheita e armazenamento de amostras são passos iniciais que antecedem um complexo conjunto de procedimentos laboratoriais. Na figura 10 encontra-se representado um fluxograma representativo das diferentes fases do procedimento laboratorial executado.

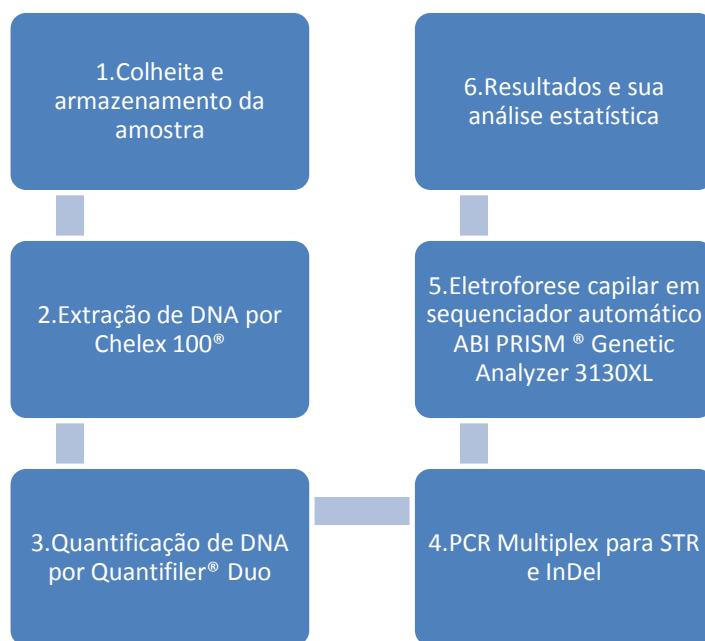


Figura 10. Fluxograma representativo das diversas fases do processo laboratorial.

3.2. Materiais e métodos para análise dos marcadores do tipo STR do kit PowerPlex[®] ESI17 (Promega)

3.2.1 Extração de DNA pelo método de Chelex[®] 100

Para a extração de DNA foi utilizado um fragmento circular, com cerca de 3mm de diâmetro, do suporte de papel com sangue, seguindo-se o procedimento descrito por Walsh, PS, e colaboradores [71]:

1. Pipetou-se 1mL de água Mili Q para um eppendorf.
2. Colocou-se o punch com a mancha de sangue no eppendorf e aguardou-se 30 minutos à temperatura ambiente.
3. Misturou-se e centrifugou-se por 3 minutos a 14000rpm a 24°C.
4. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 170µL da suspensão de chelex a 5% (previamente preparada) e incubou-se 15 minutos num banho a 56°C.
5. Agitou-se e incubou-se num banho a 100°C por 8 minutos.
6. Agitou-se e centrifugou-se durante 5 minutos a 14000rpm.

As amostras, após este processo, estão prontas a ser utilizadas para os procedimentos seguintes, nomeadamente a PCR em Tempo Real [8,55,71].

3.2.2. Quantificação de DNA por Quantifiler[®] Duo

O kit fornece todos os reagentes necessários à amplificação, deteção e quantificação das amostras em estudo em reações de 25µl. Fazem assim parte do kit, a mix de primers com os pares de primers para as 3 regiões a amplificar e com as sondas das mesmas 3 regiões, a mix de reação com DNA polimerase AmpliTaq Gold[®], dNTPs e albumina de soro bovina, o DNA padrão é composto por um conjunto de DNA genómico masculino humano e o tampão de diluição [6].

A reação do PCR é preparada recorrendo a 10,5µL de mix dos primers, 12,5µL da mix de reação e 2µL do DNA a analisar, perfazendo um volume total de reação de 25µL. Relativamente ao DNA padrão este é preparado de acordo com a tabela V [6].

Tabela V. Tabela ilustrativa do modo de preparação do DNA padrão, importante para a realização da curva padrão que irá capacitar a deteção da concentração das amostras de DNA [6].

Padrão	Concentração (ng/µl)	Modo de preparação
Std.1	50.000	10µl de DNA stock + 30µl do tampão de diluição
Std.2	16.700	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição
Std.3	5.560	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição
Std.4	1.850	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição
Std.5	0.620	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição
Std.6	0.210	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição
Std.7	0.068	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição
Std.8	0.023	10µl de DNA da solução anterior + 20µl do tampão de diluição

3.2.3 Reação de amplificação em cadeia (PCR) dos marcadores do tipo STR

No que concerne à quantidade de reagentes necessários à reação de amplificação o fornecedor do kit recomenda o uso de 5µl da mix de reação, 2,5µl da mix dos primers, até 17,5µl da amostra de DNA a amplificar e o necessário para perfazer 25µl de volume total, com água. Contudo, após os ensaios de validação foi possível concluir que mesmo reduzindo para metade o volume total da reação é possível obter os mesmos resultados. Assim, os reagentes foram reduzidos para metade. O controlo positivo e negativo são realizados recorrendo aos mesmos volumes mas, no entanto, em vez do DNA a amplificar, o controlo positivo requer a mesma quantidade do DNA controlo 9947A (1,0ng) e o controlo negativo a mesma quantidade de água [63].

A PCR decorre no amplificador GeneAmp[®] PCR system 9700 e o protocolo utilizado é: 96°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 2 minutos e 72°C por 90 segundos, o passo seguinte demora 45 minutos a 60°C e por fim manter a 4°C [63].

3.2.4. Detecção dos fragmentos de amplificação do tipo STR em ABI PRISM[®] 3130xl

A deteção dos fragmentos de amplificação em sequenciador automático do tipo ABI PRISM[®] 3130xl baseia-se numa eletroforese capilar que consiste em separar os fragmentos amplificados de modo a obter um resultado na forma de eletroforegrama [63].

Antes do início da eletroforese as amostras do PCR são preparadas misturando 10µL de formamida, 2µL do marcador interno CC5 ILS500 e 1µL da amostra de DNA amplificado perfazendo um volume total de 13µL. A mistura para a eletroforese capilar deve ser feita para o número de amostras a analisar, contanto com o controlo negativo (que é preenchido por 1,5µL de água), com o controlo positivo (que é preenchido por 1,5µL do DNA controlo 9947A). A mistura é desnaturada durante 3 minutos a 95°C [63].

Após a desnaturação, o ultimo passo é colocar a placa no sequenciador e indicar o protocolo a utilizar (que está pré-definido para que os capilares injetem a amostra durante 5 segundos a 3kV) [63].

O marcador interno CC5 500 tem os seguintes tamanhos dos fragmentos: 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 e 500pb [63].

A análise dos fragmentos de amplificação é realizada com software específico GeneMapper[®] v 1.2 [63].

A temperatura ambiente pode influenciar a eletroforese no sequenciador automático multi-capilar dando por vezes origem a picos divididos, a baixas temperaturas, os chamados artefactos. Assim, é importante manter a temperatura segundo as recomendações do fabricante [63].

3.2.5. Análise dos parâmetros estatísticos populacionais

Um dos programas informáticos utilizado no serviço de Genética Forense do INMLCF, para estudos populacionais é o Arlequin v3.5, sendo o seu objetivo principal fornecer informação genética de populações em estudo, recorrendo a testes estatísticos [34].

O Arlequin analisa vários formatos de dados, sendo os principais as sequências de DNA, RFLP, microssatélites e frequências alélicas. A sua análise pode ser intra-populacional ou inter-populacional, sendo que no primeiro caso são calculados parâmetros estatísticos populacionais independentemente de cada população e, no segundo, os parâmetros estatísticos são comparados entre populações e os valores das distâncias genéticas calculados para avaliar a presença de diferenças significativas entre populações [34].

Relativamente à análise intra-populacional, são calculados os valores de diversidade genética, como a heterozigotia Esperada e Observada, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequências alélicas e o número de alelos presentes em cada marcador da amostra de estudo. Na análise inter-populacional são calculados valores de distâncias genéticas entre populações [29,40,45,74].

A heterozigotia esperada é a proporção de heterozigóticos esperados se a população estiver em equilíbrio de Hardy-Weinberg e a heterozigotia observada é a percentagem de indivíduos heterozigóticos observadas em relação ao número total de indivíduos analisados [29].

Por sua vez, o equilíbrio de Hardy-Weinberg afirma que uma população, dentro de determinadas condições, mantém constantes as suas características genéticas [40,45,74].

O valor das distâncias genéticas entre populações é calculado com base das frequências dos alelos observados nas populações em estudo, sendo que um valor igual a 1 significa que as populações são semelhantes geneticamente e o valor 0 indica que há diferença entre populações. O valor de significância aplicado a este ensaio é de $p < 0,05$ [40,52].

3.2.6. Análise dos parâmetros estatísticos forenses

O estudo dos parâmetros estatísticos Forenses é realizado com o software PowerStat (promega), que fornece os valores calculados de parâmetros como a Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC, Poder de exclusão e Índice de paternidade associada (TPI) [5,33,43,64].

Subcapítulo 3.3 (Resultados)

3.3. Resultados

3.3.1. Validação do kit Powerplex[®] ESI17 (Promega)

3.3.1.1. Amostra em estudo

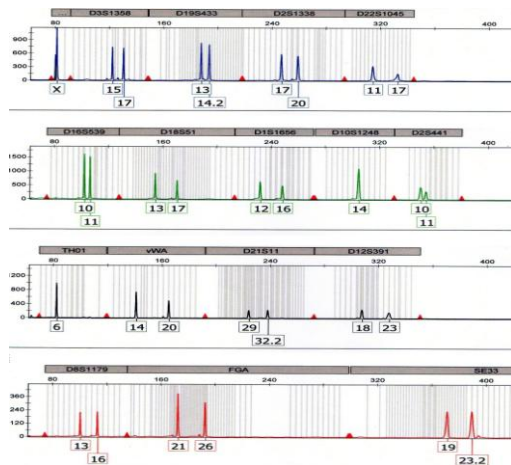
O ensaio de validação foi executado recorrendo a 34 amostras, selecionadas de entre os indivíduos presentes a exame no serviço de Genética e Biologia Forense. As manchas de sangue foram colhidas para cartões WhatMan[®] e extraídas pelo método de Chelex[®] 100.

3.3.1.2. Análise de sensibilidade

O ensaio foi executado diminuindo o volume total da reação de PCR de 25µL, recomendado pelo fabricante, para metade (12,5µL) em 9 amostras. O anexo 1 mostra os resultados da análise das amostras usadas para a validação do método.

A análise dos eletroforegramas dos dois ensaios revelou que, na maioria dos casos, as características genéticas coincidiam em todos os *loci* em ambas as análises, contudo os picos do ensaio com 25µL apresentavam algum desequilíbrio, falhas na leitura dos alelos e escala de RFU baixa comparativamente aos picos do ensaio com 12,5µL, como é possível ver na figura 11.

a)



b)

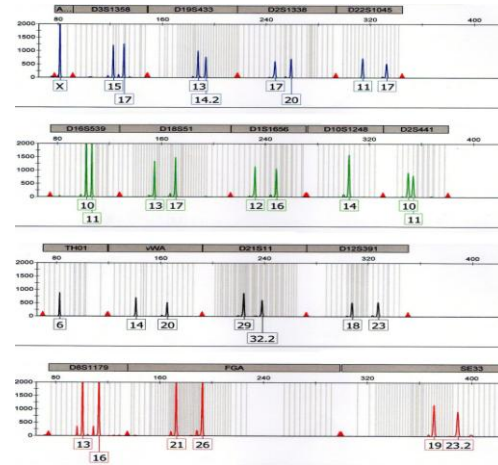


Figura 11. Imagem ilustrativa do eletroforetogramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 3 com um volume total de reação de 25 μ L (a) e com metade desse volume, ou seja, 12,5 μ L (b). No eixo dos y está representada a intensidade da fluorescência em RFU e no eixo dos x, o número em pares de bases (pb).

Apesar das diferenças entre dois ensaios é possível dizer que ambos os volumes permitem a obtenção de perfis genéticos completos e com resultados coincidentes.

É ainda importante referir que o alelo 5 presente no marcador D16S539 da amostra 6 (evidenciado no anexo 1) com o volume total de 25 μ L é resultado de um pull-up, ou seja o alelo X tem uma escala muito alta de RFU pelo que a sua cor passa para outro eletroforetograma, fazendo-o parecer um alelo.

3.3.1.3. Análise dos limiares analíticos

Esta análise tem como objetivo detetar a concentração mínima de DNA necessária à reação para que seja possível obter um perfil genético completo. Para tal analisaram-se 6 amostras, provenientes dos casos de rotina do serviço de Genética e Biologia Forense, com diferentes diluições, 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100, sendo que a concentração média das amostras analisadas é 1,2 ng/ μ L. A figura 12 mostra os

resultados obtidos de uma das 6 amostras estudadas durante este ensaio e em que a concentração inicial é de 0,54 ng/μL.

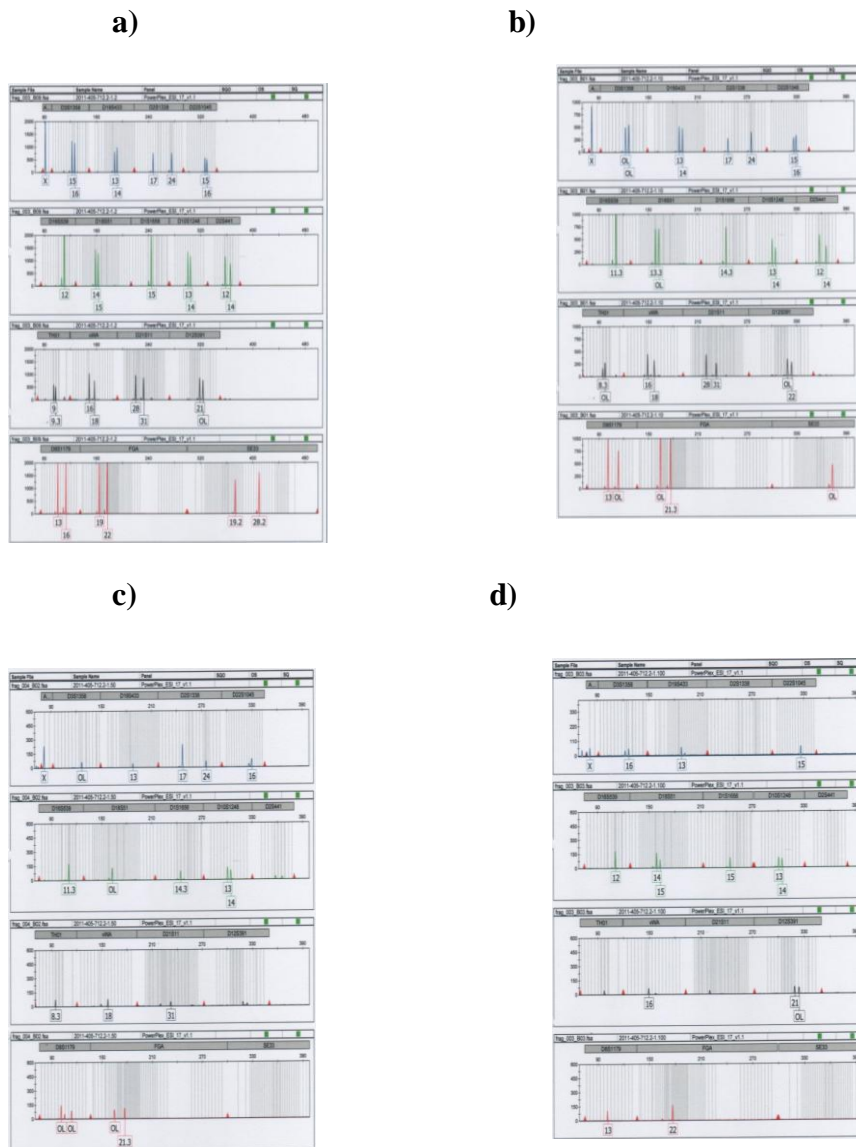


Figura 12. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 712.2 diluída de 1:2 (a), 1:10 (b), 1:50 (c) e 1:100 (d), sendo que a sua concentração inicial é de 0,54 ng/μL.

De maneira geral, as amostras diluídas de 1:2 apresentam uma concentração média de 0,537 ng/μL (537pg), obtendo-se um perfil completo para os 17 marcadores do kit e sempre acima dos 500RFU. As amostras diluídas de 1:10 apresentam uma concentração média de 0,05ng/μL, sendo assim possível obter um perfil genético completo para 16 dos marcadores, sendo isso observado perto dos 400 RFU. No que

diz respeito as amostras diluídas de 1:50 a sua concentração média é de 0,01ng/μL e os resultados apresentam uma falha média de identificação de 10 alelos por eletroforegrama e o limite mínimo de RFU ronda os 200 RFU. Já nas amostras diluídas de 1:100 a concentração média é de 0,005ng/μL e os resultados apresentam uma falha média de identificação de 14 alelos por eletroforegrama e o limite mínimo de RFU é em média 100. Estes e os restantes resultados relativos a este ensaio encontram-se pormenorizados no anexo 2.

De acordo com Tucker e colaboradores [65,66,67] foram necessários apenas 62,5 pg para obter perfis completos, contrariamente aos resultados obtidos no trabalho prático desenvolvido (537pg). Esta discrepância de resultados pode dever-se ao facto da amostra analisada aquando deste trabalho ser relativamente pequena.

3.3.1.4. Análise da contaminação do método

Esta análise tem como objetivo determinar o poder de diferenciação entre dois contribuidores para uma só amostra estudada. Assim, escolheram-se 8 amostras dos casos de rotina do serviço de Genética e Biologia Forense, 3 delas de contribuintes femininas, 3 masculinas e duas amostras que serviram como contaminante (uma do sexo feminino e outra do sexo masculino). O modo de preparação das misturas encontra-se esquematizado na tabela VI.

Tabela VI. Tabela ilustrativa do modo de preparação das misturas de DNA executadas para o ensaio de contaminação do método.

Contaminante 1 (Feminino)	Contaminante 2 (Masculino)
Amostra 1 (Feminino)	Amostra 4 (Masculino)
Amostra 2 (Masculino)	Amostra 5 (Feminino)
Amostra 3 (Feminino)	Amostra 6 (masculino)

Estas misturas foram feitas em três proporções diferentes, 1 μ L de amostra para 9 μ L de contaminante, 1 μ L de amostra para 1 μ L de contaminante e por último, 9 μ L de amostra para 1 μ L de contaminante.

Encontra-se no anexo 3 o perfil genético das amostras e dos contaminantes utilizados aquando deste ensaio e na figura 13 os eletroforegramas obtidos de uma das misturas realizada.

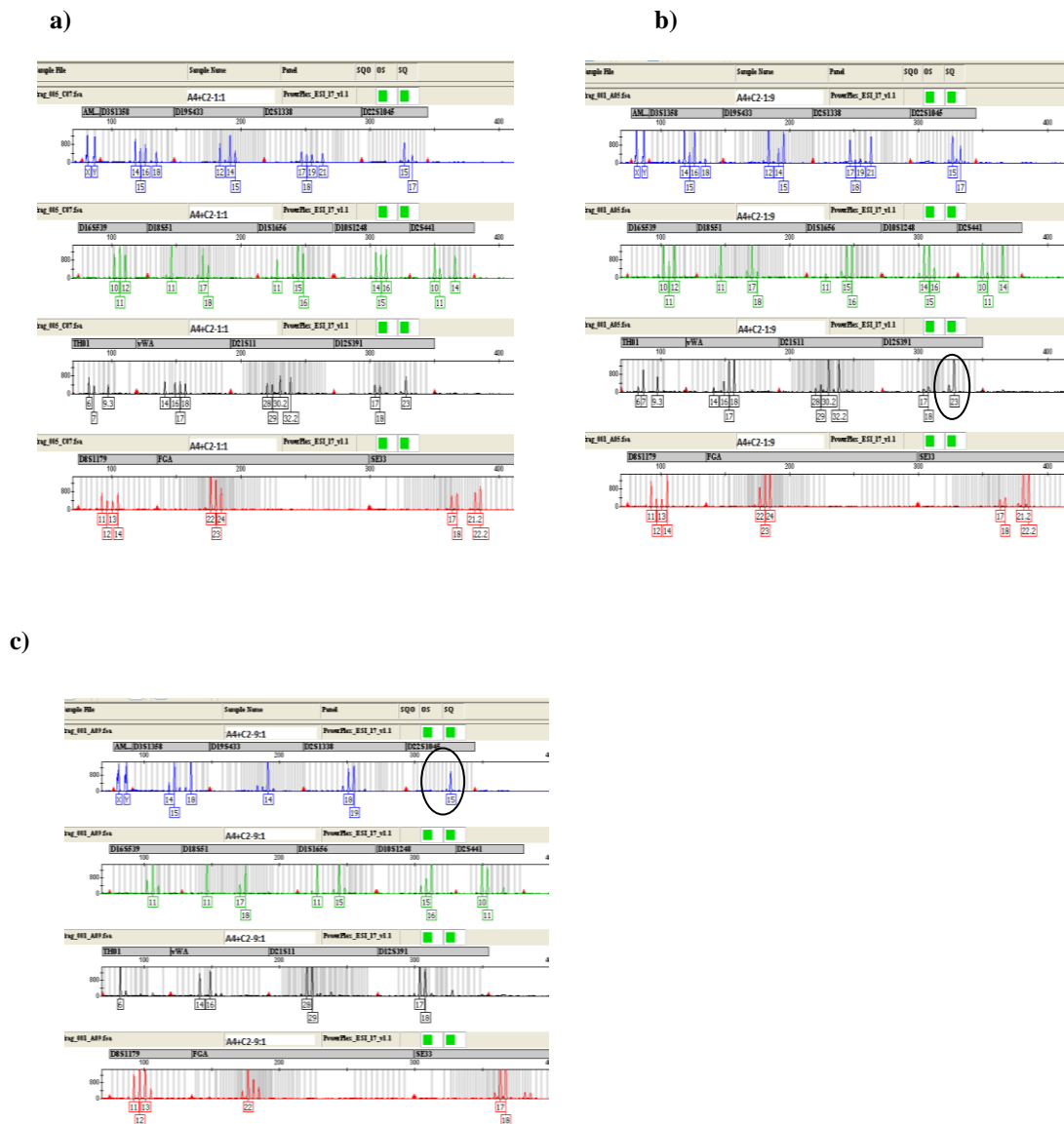


Figura 13. Imagem ilustrativa dos eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondente à mistura da amostra 4 com o contaminante 2 na proporção de 1:1 (a), na proporção de 1:9 (b), onde é possível observar a existência de um pico stutter, com menos um nucleótido que o verdadeiro pico (23), evidenciado pelo círculo, e na proporção de 9:1 (c), onde é possível observar que no marcador D16S51 existe um evento de perda alélica do alelo 17 pertencente ao contaminante 2, evidenciado pelo círculo.

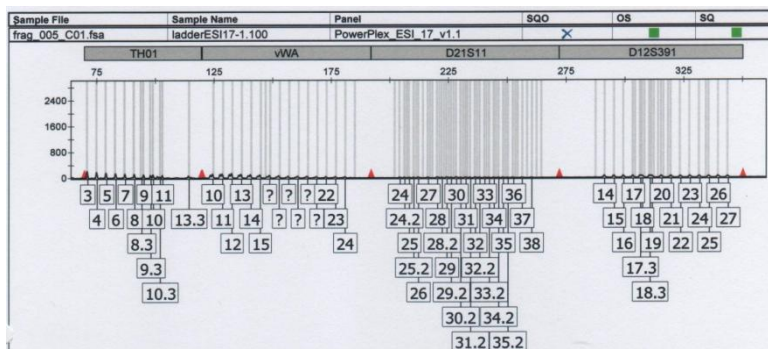
Após a análise dos resultados obtidos é possível afirmar que o kit PowerPlex[®] ESI17 é capaz de detetar a presença de vários contribuidores numa só amostra. Com o exemplo apresentado na figura 13, e comparando com os resultados individuais da amostra 4 e do contaminante 2, no anexo 3, é possível distinguir os alelos pertencentes à amostra 4 dos alelos pertencentes ao contaminante 2. Na proporção 1:1, os picos correspondentes aos alelos correspondentes a ambas as amostras devem ser aproximadamente do mesmo tamanho e equilibrados entre si, uma vez que existe igual quantidade de ambas as amostras. No que concerne às misturas de 9:1 e 1:9 é normal esperar que a amostra em maior quantidade venha a apresentar picos maiores comparativamente à amostra com menor quantidade.

Foi ainda possível observar eventos como perda alélica e picos stutter ao longo deste ensaio, como evidenciado na figura 13b e c por um círculo e ainda no anexo 3. Estes resultados são semelhantes aos observados nos artigos de Tucker e colaboradores [65,66,67], em que existe um evento de perda alélica num único alelo quando a proporção da mistura é de 1:9.

3.3.1.5. Análise da precisão do método

A fim de averiguar a precisão do método na deteção de alelos com apenas um par de bases de diferença, procedeu-se à amplificação de vários ladders alélicos (ladder alélico do kit AmpFlSTR Identifiler[®] Plus, PowerPlex[®] ESI17, AmpFlSTR[®] SEfiler, PowerPlex[®] 16, AmpFlSTR[®] NGM) previamente diluídos de 1:100 e de 1:1000. A figura 14 evidencia a amplificação do ladder alélico do kit PowerPlex[®] ESI17.

a)



b)

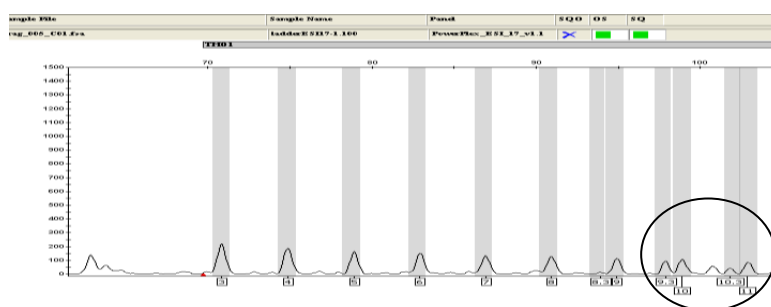


Figura 14. Imagem ilustrativa do eletroforegrama obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondente à análise de precisão do método, evidenciando os marcadores com fluoróforo de emissão no comprimento de onda correspondente à cor preta (a) e ampliação do marcador TH01, evidenciando a capacidade do método de detetar alelos com apenas um nucleótido de diferença (b).

É possível observar que em todas as amostras, ou seja marcadores de pares de bases amplificados, existiam e foram detetados, com sucesso, alelos com diferença num único par de bases, nomeadamente nos marcadores TH01, FGA, D12S391, D16S539, D1S1656 e D2S441. De acordo com Tucker e colaboradores [65,66,67], os marcadores atrás referidos apresentam um valor médio relativamente elevado para a característica de deteção de alelos com diferença num único par de bases.

3.3.2. Análise dos parâmetros estatísticos para os marcadores STR do kit PowerPlex® ESI17 (promega)

3.3.2.1. Análise dos parâmetros estatísticos populacionais

Foram analisados resultados genéticos obtidos em 122 indivíduos com o software Arlequin v3.5 com o intuito de determinar o número de alelos por marcador, a heterozigotia observada, a heterozigotia esperada, a existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas. Os resultados obtidos dessa análise encontram-se na tabela VI e na figura 15 (número de alelos por marcador). Os valores das frequências alélicas encontram-se no anexo 7 e a representação gráfica das frequências alélicas por marcador, no anexo 6.

A heterozigotia observada é a percentagem de indivíduos heterozigóticos observados em relação ao número total de indivíduos analisados, enquanto que a heterozigotia esperada é a proporção de heterozigóticos esperada se a população estiver em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Por sua vez, o equilíbrio de Hardy-Weinberg afirma que alguns parâmetros de uma população, dentro de determinadas condições, se mantem constantes com o passar do tempo.

Tabela VII. Tabela com os resultados obtidos do software Arlequin v3.5 sobre os parâmetros estatísticos populacionais (Heterozigotia Observada, Heterozigotia Esperada e Equilíbrio de Hardy-Weinberg) estudados para os marcadores do tipo STR do kit PowerPlex® ESI17.

Marcador	Nrº Alelos	Heterozigotia Observada	Heterozigotia Esperada	Equilíbrio Hardy-Weinberg (p value)
D3S1358	5	0,8197	0,7637	0,6696
D19S433	12	0,7951	0,7980	0,6569
D2S1338	13	0,8525	0,8666	0,6357
D22S1045	8	0,7459	0,7354	0,1379
D16S539	8	0,8033	0,7786	0,3071
D18S51	15	0,8771	0,8802	0,8651
D1S1656	13	0,8443	0,8950	0,0237

D10S1248	7	0,8361	0,7753	0,2942
D2S441	9	0,8197	0,7616	0,7574
TH01	7	0,7541	0,7983	0,2389
vWA	9	0,8771	0,8247	0,9148
D21S11	13	0,8853	0,8532	0,1628
D12S391	15	0,8934	0,8765	0,0428
D8S1179	9	0,7951	0,8229	0,5138
FGA	12	0,8443	0,8673	0,6106
SE33	27	0,9590	0,9451	0,7737

Todos os marcadores genéticos analisados respeitam as diretrizes do equilíbrio Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), com a exceção do marcador D1S1656. Os valores da heterozigotia observada situam-se entre 0,74590 e 0,95902 (média= 0,83760), enquanto que os valores da heterozigotia esperada situam-se entre 0,76155 e 0,94509 (média= 0,82764).

A tabela VIII tem os resultados obtidos pelo teste das distâncias genéticas entre a população de estudo (sul de Portugal) e outras 4 populações anteriormente estudadas por outros autores [34,39,43,45,63,64]. O objetivo deste teste foi averiguar se as diferenças observadas entre as populações estudadas são ou não significativas. Para tal fez-se um teste de hipóteses com um nível de significância de $p < 0,05$, em que a hipótese nula (H_0) afirma que as diferenças observadas entre as populações não são significativas, e em que a hipótese alternativa (H_1) afirma que as diferenças observadas são significativas. Calculou-se os P values, que medem o menor nível de significância que nos leva a rejeitar a hipótese H_0 , ou seja, que nos leva a aceitar a hipótese de que as diferenças observadas entre as populações sejam significativas [52,68,73].

Tabela VIII. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequin v3.5 acerca das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população de Espanha (Esp.), Estados Unidos América (USA), Reino Unido (RU) e Suécia (Su).

Marcador	Port. vs Esp.	Port. vs USA	Port. Vs RU	Port. Vs Su
D3S1358	0.00966	-0.00012	0.00437	0.00256
D19S433	-0.00176	0.0014	0.00297	0.00697
D2S1338	-0.00269	0.00922	0.00145	0.00276
D22S1045	0.00658	-0.00166	0.00196	0.00237
D16S539	0.14485	0.00256	-0.00392	-0.0014
D18S51	0.00098	-0.00121	-0.00215	-0.00098
D1S1656	0.00321	0.00406	0.00835	0.01666
D10S1248	-0.00284	-0.00063	-0.00182	-0.00055
D2S441	0.00476	0.00071	0.00112	-0.00056
TH01	0.01281	0.0138	0.04805	0.04217
vWA	-0.00215	-0.00341	-0.00083	0.00152
D21S11	0.0029	-0.00253	-0.00208	-0.00166
D12S391	0.00157	0.00199	0.00503	0.00169
D8S1179	0.00982	-0.00167	0.00093	0.01063
FGA	-0.00211	-0.00044	-0.00282	-0.00065
SE33	0.00375	0.00122	-	-

A tabela VIX representa os P-values do teste exato das distâncias genéticas entre a população de estudo e outras populações anteriormente estudadas por outros autores [1,31,38,41,65,66].

Tabela VIX. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequin v3.5 acerca dos P-values das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população de Espanha (Esp.), Estados Unidos América (USA), Reino Unido (RU) e Suécia (Su).

Marcador	Port. vs Esp.	Port. vs USA	Port. Vs RU	Port. Vs Su
D3S1358	0,0000	0,38739	0,06306	0,05405
D19S433	0,71171	0,25225	0,0991	0,01802
D2S1338	0,94595	0,0000	0,27928	0,08108
D22S1045	0,06306	0,65766	0,23423	0,11712
D16S539	0,0000	0,13514	0,99099	0,67568
D18S51	0,27027	0,63964	0,90991	0,67568

D1S1656	0,02703	0,04505	0,0000	0,0000
D10S1248	0,9009	0,4955	0,65766	0,52252
D2S441	0,08108	0,32432	0,30631	0,5045
TH01	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
vWA	0,81081	0,98198	0,48649	0,18919
D21S11	0,07207	0,92793	0,84685	0,83784
D12S391	0,20721	0,18018	0,00901	0,12613
D8S1179	0,00901	0,67568	0,28829	0,0000
FGA	0,87387	0,48649	0,94595	0,55856
SE33	0,04505	0,18919	-	-

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população sul de Portugal e Espanhola nos marcadores genéticos D3S1358, D16S539, D1S1656, TH01 e D8S1179, como é possível verificar na tabela VIX. Na tabela VIII, correspondente às distâncias genéticas dos marcadores genéticos, é possível verificar que o valor da distância genética dos marcadores que apresentam diferenças significativas entre populações é relativamente alto comparativamente aos marcadores que não apresentam diferenças, nomeadamente no marcador D16S539 em que o valor é de 0,14485.

Foram igualmente observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população sul de Portugal e a Americana, nomeadamente nos marcadores genéticos D2S1338, D1S1656 e TH01. Na tabela VIII é possível observar que para estes marcadores os valores das distâncias são maiores comparativamente aos restantes marcadores, nomeadamente no marcador TH01 em que o valor é 0,0138.

Relativamente à população sul de Portugal e a do Reino Unido, observam-se diferenças significativas, nomeadamente nos marcadores D1S1656, TH01 e D12S391, sendo também possível verificar que estes marcadores apresentam valores de distâncias genéticas relativamente elevados, como é o caso do marcador TH01 que tem o valor de 0,04805.

Entre a população do sul de Portugal e a população Sueca, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) nos marcadores D19S433, D1S1656, TH01 e D8S1179. É também possível observar, na tabela relativa às distâncias genéticas (VIII), que o valor relativo às distâncias genéticas é maior nestes marcadores

comparativamente aos restantes, em que não existem diferenças significativas, nomeadamente no TH01 em que o valor é 0,04217.

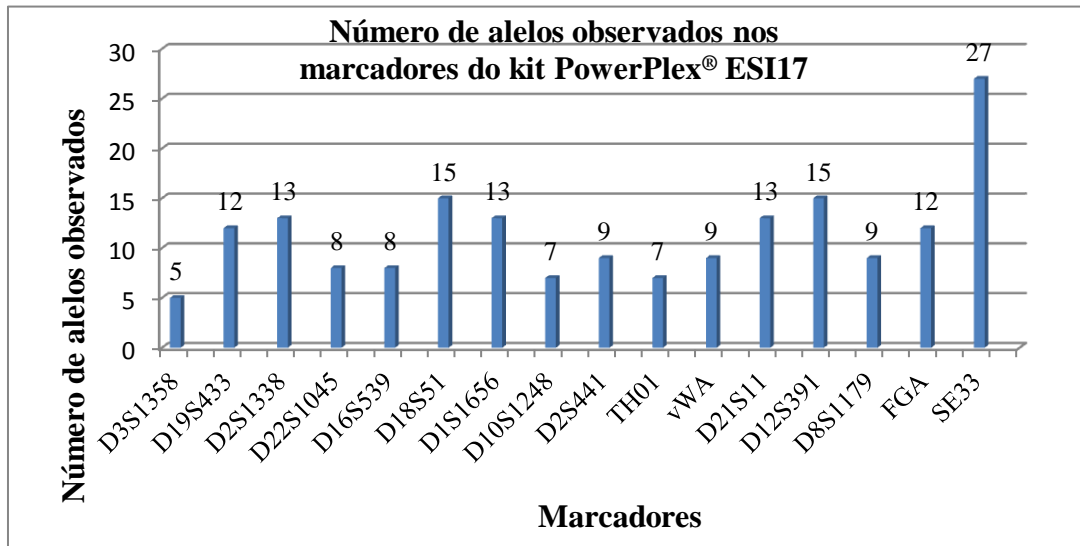


Figura 15. Gráfico do número de alelos presentes em cada marcador genético estudado pelo Kit PowerPlex® ESI17 da Promega.

A análise do número de alelos em cada um dos marcadores permite afirmar que alguns dos marcadores estudados são pouco polimórficos, como é o caso dos marcadores D3S1358, D10S1248 e TH01 enquanto outros são bastante polimórficos, como é o caso do marcador SE33. Relativamente à análise dos parâmetros de Heterozigotia Observada e Esperada, esta permite-nos afirmar que a sua média de valores é relativamente próxima de 1, levando-nos a concluir que a população em estudo é, na sua maioria heterozigótica para os marcadores analisados. No que concerne à análise do parâmetro relativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, este permite verificar que a população se encontra em equilíbrio, considerando um nível de significância $p < 0,05$.

3.3.2.2. Análise dos parâmetros estatísticos Forenses

Para a análise dos parâmetros estatísticos Forenses recorreu-se ao software PowerStat (promega) [64]. Foram analisados parâmetros genéticos obtidos em 122

amostras, tendo-se analisado os parâmetros Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (*Polymorphism Information Content*), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas. Os resultados dessa análise encontram-se apresentados na tabela IX.

Tabela IX. Tabela com os resultados obtidos do software PowerStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (Informação Relativa ao Polimorfismo), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.

	D3S1358	D19S433	D2S1338	D22S1045	D16S539	D18S51	D1S1656	D10S1248
Probabilidade de coincidência	0,100	0,0965	0,0381	0,1158	0,0901	0,0310	0,0417	0,0949
Poder de Discriminação	0,900	0,9035	0,9619	0,8842	0,9099	0,9689	0,9583	0,9051
PIC	0,72	0,7367	0,8457	0,6894	0,7390	0,8672	0,8527	0,7319
Poder de Exclusão	0,583	0,5643	0,6664	0,4623	0,5827	0,7671	0,5928	0,5944
Índice típico de paternidade	2,39	2,2833	3,0385	1,7955	2,3939	4,3889	2,4583	2,4688
Frequências alélicas: Heterozigóticas	0,79	0,7810	0,8354	0,7215	0,7911	0,8861	0,7966	0,7975
Frequências alélicas: Homozigóticas	0,21	0,2189	0,1646	0,2785	0,2089	0,1139	0,2034	0,2025

Tabela IX (Continuação). Tabela com os resultados obtidos do software PoweStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (Informação Relativa ao Polimorfismo), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.

	D2S441	TH01	vWA	D21S11	D12S391	D8S1179	FGA	SE33
Probabilidade de coincidência	0,1173	0,0769	0,0625	0,0551	0,04	0,0613	0,0375	0,0174
Poder de Discriminação	0,8827	0,9230	0,9375	0,9449	0,96	0,9387	0,9625	0,9826
PIC	0,7016	0,7548	0,7959	0,8101	0,8549	0,7897	0,8487	0,9264
Poder de Exclusão	0,5940	0,5166	0,6911	0,6300	0,7326	0,5712	0,6398	0,8916
Índice típico de paternidade	2,4667	2,0323	3,2917	2,725	3,8158	2,3235	2,8036	9,4
Frequências alélicas: Heterozigóticas	0,7973	0,7539	0,8481	0,8165	0,8689	0,7848	0,8217	0,9468
Frequências alélicas: Homozigóticas	0,2027	0,2460	0,1519	0,1835	0,1310	0,2152	0,1783	0,0532

A aplicação dos 17 marcadores analisados foi avaliada recorrendo a parâmetros forenses, nomeadamente a probabilidade de coincidência, que tem os seus valores situados entre 0,0174, correspondente ao marcador SE33, e 0,100, correspondente ao marcador D3S1358 e valor médio de 0,06; o poder de discriminação, cujos valores se situam entre 0,8827, correspondente ao marcador D2S441, e 0,9826, correspondente ao marcador SE33, e o valor médio 0,92; a informação relativa ao polimorfismo (PIC), cujos valores se situam entre 0,6894, corresponde ao marcador D22S1045, e 0,9264, correspondente ao marcador SE33 e seu valor médio é de 0,78; o poder de exclusão (probabilidade de um sistema genético específico possa contribuir para a exclusão de um determinado indivíduo), cujos valores se situam entre 0,4623, correspondente ao valor D22S1045, e 0,8916, correspondente ao marcador SE33 e com valor médio é de 0,62; e o índice típico de paternidade cujos valores se situam

entre 3,0385 e 9,4 com uma média de valores de 3,125, em que o marcador com maior valor é mais uma vez o SE33 e o de menor valor é o D22S1045.

A análise gráfica presente no anexo 6 revela que a distribuição de frequências alélicas de todos os marcadores STR segue uma distribuição Normal com a exceção do marcador D2S441 e SE33.

Subcapítulo 3.4 (Discussão dos resultados)

3.4. Discussão dos resultados

No que respeita ao processo de validação do kit PowerPlex® ESI17 (Promega), foram testados vários parâmetros entre eles a sensibilidade do método, em que podemos afirmar que este é capaz de gerar resultados semelhantes quando o volume de reação é o recomendado pelo fabricante (25 µL) e quando o volume final da reação é reduzido para metade (12,5 µL). A fim de determinar os limites analíticos do kit, recorreu-se à diluição de 6 amostras, com concentração média de 1,2 ng/µL, tendo-se observado que com uma concentração de 0,537 ng, ou seja 537 pg, foi possível obter perfis genéticos completos. No entanto, com 50 pg apenas foi possível obter 16, em 17 marcadores completos. De acordo com Tucker e colaboradores [65,66,67], foram necessários apenas 62,5 pg para obter perfis genéticos completos, contrariamente aos resultados obtidos nos nossos ensaios (537pg). O método parece ter limites analíticos mais altos do que os resultados anteriormente apresentados. Com o objetivo de verificar a capacidade de deteção de misturas, procedeu-se à mistura de amostras em três proporções diferentes, 1 µL de amostra para 9 µL contaminante, 1 µL de amostra para 1 µL de contaminante e por último, 9 µL de amostra para 1 µL de contaminante. Com a análise dos resultados foi possível verificar a capacidade de deteção dos dois contribuidores, contudo na mistura 9:1 verificou-se a existência de um evento de perda alélica no contribuidor minoritário. Estes resultados são semelhantes aos observados no estudo de Tucker e colaboradores [67], em que existe um evento de perda alélica num único alelo quando a proporção da mistura é de 1:9, diminuindo para 94% a eficácia de deteção dos alelos. Para averiguar a precisão do método na deteção de alelos com apenas um par de bases de diferença, procedeu-se à amplificação de vários marcadores de pares de bases previamente diluídos de 1:100 e de 1:1000. Foi possível observar, em todas as amostras, a existência de alelos com diferença num único par de bases como referido em Tucker e colaboradores [67], nomeadamente na amostra correspondente ao ladder alélico do kit PowerPlex® ESI17, nomeadamente nos marcadores TH01, FGA, D12S391, D16S539, D1S1656 e D2S441, verificou-se alelos com diferença de um único par de bases.

Relativamente aos parâmetros estatísticos populacionais, todos os marcadores estão em equilíbrio Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), com exceção do marcador D1S1656. Os

valores da heterozigotia observada situam-se entre 0,74590 e 0,95902 (média= 0,83760) e os valores da heterozigotia esperada situam-se entre 0,76155 e 0,94509 (média= 0,82764). Estes resultados estão de acordo com as características esperadas para um marcador genético, ou seja, valores de heterozigotia superiores a 70%.

No que respeita aos parâmetros estatísticos forenses, a probabilidade de coincidência, apresenta valores que se situam entre 0,0174 (SE33) e 0,100 (D3S1358), com valor médio de 0,06. O elevado valor correspondente ao marcador D3S1358 indica que este marcador apresenta maior probabilidade de que em indivíduos diferentes, o alelo presente seja o mesmo, ou seja, maior coincidência, comparativamente ao marcador SE33. Isto é também explicado pelo baixo número de polimorfismos deste marcador. O poder de discriminação, tem valores que se situam entre 0,8827 (D2S441) e 0,9826 (SE33) e valor médio 0,92. Sendo este parâmetro o oposto do anterior, conclui-se que o marcador SE33 confere maior probabilidade de que dois indivíduos escolhidos ao acaso na população possam ser discriminados entre si, contrariamente ao marcador D2S441. Isto pode ser também explicado pelo elevado número de polimorfismos deste marcador. No que respeita à informação relativa ao polimorfismo (PIC), os seus valores situam-se entre 0,6894 (D22S1045) e 0,9264 (SE33) e valor médio 0,78. Sendo que este parâmetro representa a informatividade de determinado polimorfismo confere a determinado marcador genético, de modo a ser possível deduzir o parentesco genético. É necessário que este valor seja superior a 2,5 para que possa ser considerado como informativo. Assim conclui-se que o marcador SE33 é o marcador mais informativo do kit PowerPlex® ESI17 (Promega). No que diz respeito ao poder de exclusão, este apresenta os valores situados entre 0,4623 (D22S1045) e 0,8916 (SE33) e com valor médio 0,62. Este parâmetro, que é definido como a probabilidade de um sistema genético específico possa contribuir para a exclusão de um determinado indivíduo, pode igualmente ser explicado pelo elevado grau de polimorfismo do marcador SE33, pois esse elevado grau de polimorfismo permite uma maior variabilidade entre indivíduos, e um poder de exclusão consecutivamente maior. O índice típico de paternidade cujos valores se situam entre 3,0385 (D22S1045) e 9,4 (SE33) com uma média de valores de 3,125, indica quantas vezes é mais provável, que um indivíduo seja realmente pai biológico de um outro indivíduo, que um terceiro selecionado aleatoriamente na população, mediante a utilização de cada marcador em particular. Este parâmetro quando igual

ou superior 1, indica que existe parentesco entre os indivíduos em estudo. Assim conclui-se que todos os marcadores, por apresentarem valores superiores a 1, sejam bons marcadores de estudo para o parâmetro em questão, especialmente o marcador SE33, que é o marcador com maior valor de TPI. Relativamente aos novos marcadores do ESS, os miniSTR, é possível verificar que estes apresentam valores de heterozigotia sempre superiores a 73% e valores de poder de discriminação sempre superiores a 88%, pelo que se conclui que estes novos marcadores preenchem os requisitos necessários para que possam ser utilizados em identificação genética.

As frequências alélicas de cada marcador da população Sul de Portugal foram comparadas com as frequências alélicas obtidas por outros autores nas populações Espanhola, Americana, Reino Unido e Sueca. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas frequências alélicas dos marcadores estudados, entre a população Sul de Portugal e todas as outras populações estudadas, nos marcadores D1S1656 e TH01. No que diz respeito à análise das distâncias genéticas entre populações, com nível de significância de $p < 0,05$, observou-se que todas as populações estudadas apresentavam diferenças significativas, ou seja distância genética, da população do Sul de Portugal nalguns marcadores, nomeadamente, a população Espanhola nos marcadores D3S1358, D16S539, D1S1656, TH01, D8S1179 e SE33, a população Americana nos marcadores D2S1338, D1S1656 e TH01, a população do Reino Unido nos marcadores D1S1656, TH01 e D12S391, e por fim, a população Sueca cujas diferenças recaem sobre os marcadores D19S433, D1S1656, TH01 e D8S1179. Garcia e seus colaboradores [38] compararam a população Espanhola com outras populações e obtiveram, comparativamente aos nossos resultados, diferenças significativas com a população Americana. No entanto quando comparadas com a população Sueca, as diferenças observadas não foram significativas, contrariamente aos nossos resultados. É no entanto necessário, ter em atenção o tamanho relativamente pequeno das amostras em estudo, pelo que serão necessários mais estudos para ser possível concluir com certeza acerca das distâncias genéticas entre as populações.

Subcapítulo 3.5 (Conclusão)

3.5. Conclusão

Relativamente à caracterização dos marcadores STR do kit PowerPlex®ESI17 (promega), foram realizados ensaios de validação recorrendo à análise de sensibilidade, dos limiares analíticos, da análise de misturas e da precisão do método.

Foi possível concluir que o kit é sensível, pois consegue obter perfis genéticos completos, com metade do volume recomendado pelo fabricante, no que diz respeito aos limiares analíticos, é possível obter perfis completos com 537pg, contrariamente ao anteriormente descrito. Relativamente à análise de misturas, pode-se afirmar que o método é capaz de detetá-las. O último parâmetro a ser analisado aquando da validação do método foi a precisão do método, em que se pôde verificar que o método é capaz de detetar alelos com diferença de um único par de bases.

Para além dos ensaios de validação do método, calcularam-se Parâmetros Estatísticos Populacionais (Equilíbrio Hardy-Weinberg, Heterozigotia observada e Heterozigotia esperada) e Forenses (Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, Informação relativa ao polimorfismo, Poder de exclusão e Índice típico de paternidade), tendo sido verificado que todos os parâmetros estavam de acordo com o esperado, quer para os marcadores já em utilização na rotina forense, quer os novos miniSTR.

Por fim, calcularam-se as distâncias genéticas entre populações, nomeadamente a População do sul de Portugal, Espanhola, Americana, Inglesa e Sueca, tendo sido verificado que todas as populações estudadas apresentavam distância genética significativa ($p < 0,05$) com a população do sul de Portugal, no entanto será necessário realizar novos ensaios, em que o número amostral seja maior.

Conclui-se assim que o kit PowerPlex® ESI17 (promega) é um bom kit para estudos genéticos e forenses, e que os novos miniSTR são marcadores bastante úteis para os mesmos fins.

Capítulo 4 (Desenvolvimento- Kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen))

Subcapítulo 4.1 (Amostra de estudo)

Subcapítulo 4.2 (Materiais e métodos)

4. Marcadores do tipo Inserção/Deleção (InDel)

4.1. Amostra em estudo e formas de armazenamento

Estudados uma amostra com 120 indivíduos (60 do sexo feminino e 60 do sexo masculino) oriundos do sul de Portugal e com ascendência Portuguesa. Estes foram selecionados ao acaso de entre os indivíduos que compareceram ao serviço de Genética e Biologia Forense no âmbito de perícias médico-legais. A amostra biológica estudada (sangue) foi recolhida para papéis Whatman[®] Blood Stain Cards, acondicionada em estufa por 24h e armazenada para futura utilização.

4.2. Materiais e métodos dos marcadores InDel do kit Investigator DIPplex[®] (Qiagen)

4.2.1 Extração de DNA pelo método de Chelex[®] 100

Para a extração de DNA foi utilizado um fragmento circular, com cerca de 3mm de diâmetro, do suporte de papel com sangue, seguindo-se o procedimento descrito por Walsh, PS e colaboradores [8,55,71].

4.2.2. Quantificação de DNA por Quantifiler[®] Duo

O ensaio de Quantifiler[®] Duo permite quantificar o DNA total, o DNA masculino e detetar a presença de inibidores nas amostras em estudo.

A reação do PCR é preparada recorrendo a 10,5µL de mix dos primers, 12,5µL da mix de reação e 2µL do DNA a analisar, perfazendo um volume total de reação de 25µL. Relativamente ao DNA padrão este é preparado de acordo com o manual do kit [6].

4.2.3. Reação de amplificação em cadeia (PCR) dos marcadores do tipo InDel do kit Investigator DIPplex[®] (Qiagen)

A amplificação dos marcadores do tipo InDel segue os mesmos princípios da amplificação dos marcadores do tipo STR, contudo enquanto a PCR dos marcadores STR se baseia na amplificação de sequências específicas do DNA que se caracterizam pela presença de repetições, na amplificação dos marcadores do tipo InDel a zona a amplificar é caracterizada pela presença ou ausência de uma sequência única com cerca de 10 nucleótidos. Neste kit também a reação de PCR é uma reação Multiplex em que ocorre a amplificação de várias regiões do DNA [44].

Como no kit PowerPlex[®] ESI17, a amplificação do kit Investigator DIPplex[®] deve ser realizada segundo as recomendações do manual do kit. No que concerne ao volume de DNA a amplificar, o kit aconselha à utilização máxima de 5 µL. Ao número de amostras a analisar devem igualmente ser acrescentados o controlo negativo e positivo. No que concerne à quantidade de reagentes necessários à reação de amplificação o kit recomenda o uso de 5µL da mix de reação, 5µL da mix dos primers, 13,4µL da amostra de água, 0,6µL de Taq polimerase de DNA e 1µL de DNA, perfazendo um volume total de 25µL. Contudo, após os ensaios de validação foi possível concluir que mesmo reduzindo para metade o volume total da reação é possível obter resultados fiáveis. Assim, foram reduzidos para metade os volumes dos reagentes. O controlo positivo e negativo são feitos recorrendo aos mesmos volumes no entanto em vez do DNA a amplificar, o controlo positivo requer a mesma quantidade do DNA controlo XY5 (0,2ng) e o controlo negativo a mesma quantidade de água [44].

A PCR ocorre no amplificador GeneAmp[®] PCR system 9600 e o protocolo utilizado é: 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 120 segundos e 72°C por 75 segundos, o passo seguinte demora 60 minutos a 68°C e por fim manter a 10°C [44].

4.2.4. Detecção dos fragmentos de amplificação do tipo InDel em ABI PRISM[®] 3130xl

Antes do início da eletroforese as amostras amplificadas são preparadas misturando 11,5µL de formamida, 0,5µL do marcador interno 550 (BTO) e 1µL da amostra de DNA amplificado perfazendo um volume total de 13,5µL. De seguida a placa deve sofrer uma desnaturação durante 3 minutos a 95°C e por último a placa deve ser colocada no sequenciador e deve ser selecionado o protocolo a utilizar (que está pré-definido para que os capilares injetem a amostra durante 10 segundos a 3kV) [44].

O marcador interno 550 (BTO) tem os seguintes tamanhos dos fragmentos: 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 e 550pb [44].

A análise dos fragmentos de amplificação é realizada com software específico GeneMapper[®] v 1.2 [44].

A temperatura ambiente pode influenciar a eletroforese no sequenciador automático multi-capilar dando por vezes origem a picos divididos, a baixas temperatura, chamados de artefactos. Assim, é importante manter a temperatura segundo as recomendações do fabricante [44].

Subcapítulo 4.3 (Resultados)

4.3. Resultados

4.3.1. Validação do kit Investigator DIPplex® (Qiagen)

4.3.1.1. Amostra em estudo

O ensaio de validação foi executado recorrendo a 27 amostras, selecionadas de entre o conjunto de amostras de rotina dos casos forenses do serviço de Genética e Biologia Forense. Foram usadas manchas de sangue recolhidas em cartões WhatMan®. O DNA foi extraído pelo método de Chelex® 100.

4.3.1.2. Análise de sensibilidade

O ensaio foi executado diminuindo o volume total da reação de PCR de 25µL, para metade.

Este ensaio foi realizado com 9 amostras provenientes de manchas de sangue. A reação de amplificação foi realizada com os dois grupos de amostras nos volumes de 25 µl e 12,5µl.

A figura 16 representa a imagem do eletroforegrama obtido da amostra 1 com o volume total de 12,5 µL.

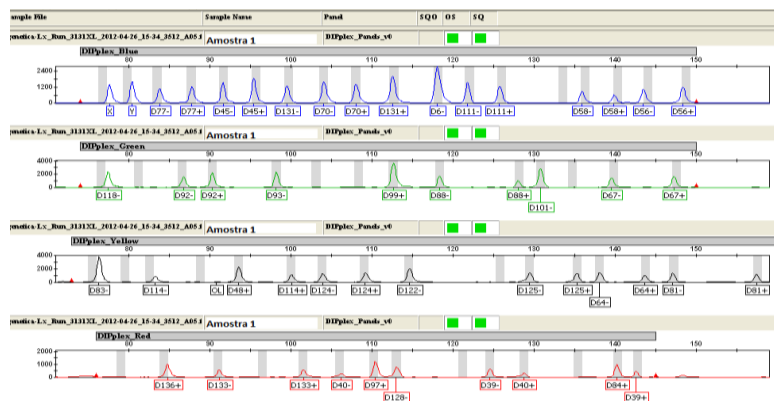


Figura 16. Imagem ilustrativa do eletroforegrama obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 1 com um volume total de reação de 12,5µl.

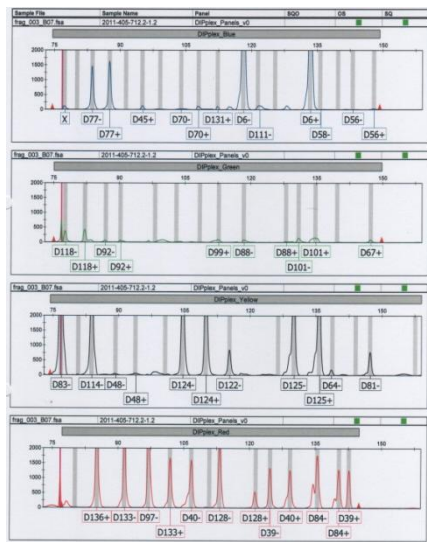
4.3.1.3. Análise dos limiares analíticos

Esta análise tem como objetivo detetar a concentração mínima de DNA necessária à reação para que seja possível obter um perfil genético completo. Para tal analisaram-se 6 amostras, provenientes dos casos de rotina do serviço de Genética e Biologia Forense, com diferentes diluições, 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100.

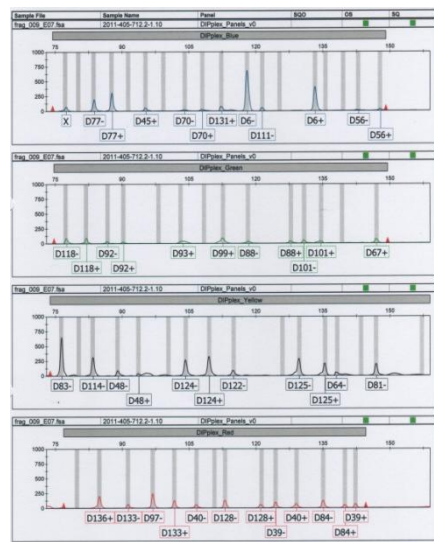
Para melhor compreender os resultados obtidos da amplificação, procedeu-se à quantificação das respetivas diluições através do kit Quantifiler[®] Duo (*Applied Biosystems*), tendo-se verificado que a concentração inicial média é de 1,2 ng/ μ L.

A figura 17 apresenta os eletroforegramas correspondes à análise dos limiares analíticos da amostra 712.2, que tem a concentração inicial de 0,54 ng/ μ L.

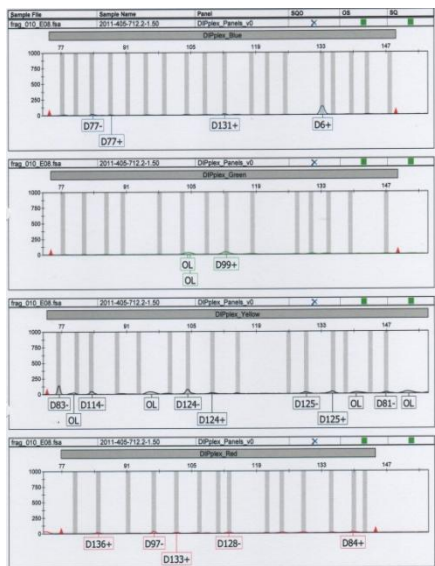
a)



b)



c)



d)



Figura 17. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl da amostra 712.2 diluída de 1:2 (a), diluída de 1:10 (b), diluída de 1:50 (c) e diluída de 1:100 (d), sendo a sua concentração inicial de 0,54 ng/μL. A linha roxa presente o início de cada eletroforegrama representa o excesso de DNA presente.

No geral as amostras diluídas de 1:2 apresentam uma concentração média de 0,629 ng/μL obtendo em média 6 perfis incompletos, num total de 6 perfis, para os 30 marcadores do kit e sempre acima dos 800RFU. As amostras diluídas de 1:10 apresentam uma concentração média de 0,1252 ng/μL e não foram capazes de detectar

1 dos 30 marcadores presentes no kit , nas amostras analisadas, sendo a detecção dos picos perto dos 400 RFU. No que concerne as amostras diluídas de 1:50 a sua concentração média é de 0,0253ng/μL, os resultados apresentam uma falha média de identificação de 15 alelos por eletroforegrama e o limite mínimo de RFU ronda os 200 RFU. Já nas amostras diluídas de 1:100 a concentração média é de 0,01234ng/μL e os resultados apresentam uma falha média de identificação de 22 alelos por eletroforegrama, enquanto que o limite máximo de RFU é em média 100. Os resultados relativos a este ensaio encontram-se pormenorizados no anexo 4.

Estes resultados estão de acordo com os descritos em LaRue e colaboradores [47], em que é referida a robustez de resultados com 125pg. Estes autores afirmam ainda que, a concentração ideal de DNA na reação deve se situar entre os 250-500pg, no entanto os nossos resultados mostram que com concentrações menores os resultados são igualmente fiáveis. Os resultados obtidos para todas as amostras analisadas aquando deste ensaio encontram-se discriminadas no anexo 4.

4.3.1.4. Análise da contaminação do método

Esta análise tem como objetivo determinar o poder de diferenciação entre dois contribuidores para uma só amostra. Assim, escolheram-se 8 amostras dos casos de rotina do serviço de Genética e Biologia Forense, 3 delas de contribuidores femininos, 3 masculinas e duas amostras que serviram como contaminante (uma de origem feminina e outra de origem masculina). O modo de preparação das misturas encontra-se esquematizado na tabela X.

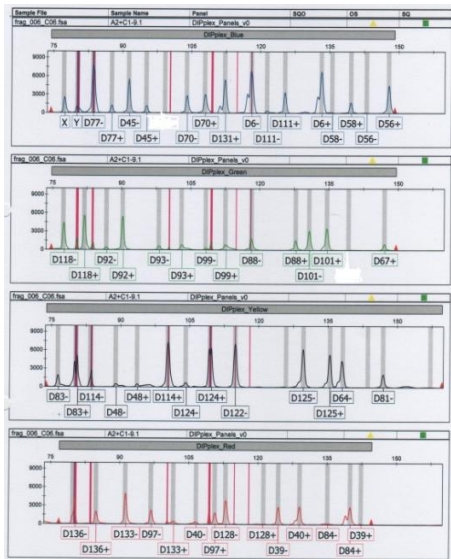
Tabela X. Tabela ilustrativa do modo de preparação das misturas de DNA executadas para o ensaio de contaminação do método.

Contaminante 1 (Feminino)	Contaminante 2 (Masculino)
Amostra 1 (Feminino)	Amostra 4 (Masculino)
Amostra 2 (Masculino)	Amostra 5 (Feminino)
Amostra 3 (Feminino)	Amostra 6 (masculino)

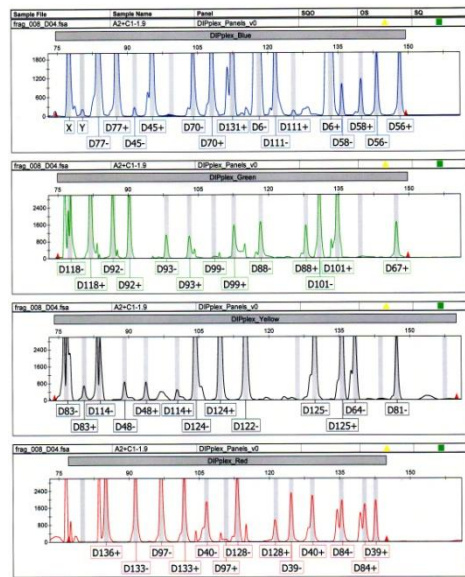
Estas misturas foram feitas em três proporções diferentes, 1 μ l de amostra para 9 μ l de contaminante, 1 μ l de amostra para 1 μ l de contaminante e por último, 9 μ l de amostra para 1 μ l de contaminante.

Encontra-se no anexo 5 o perfil genético das amostras e dos contaminantes utilizados aquando deste ensaio, e a figura 18 mostra os eletroforegramas obtidos do ensaio de contaminação do método referentes à amostra 2.

a)



b)



c)

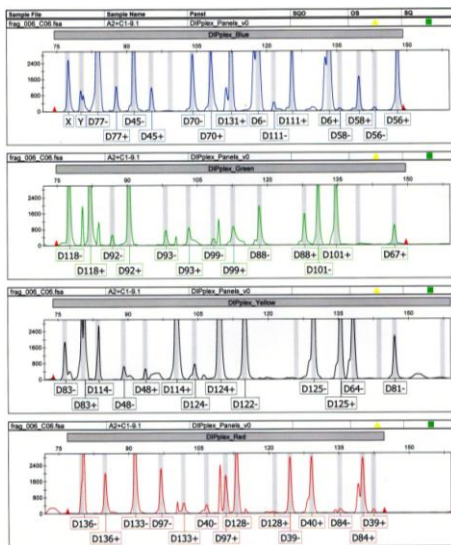


Figura 18. Imagem ilustrativa do eletroforegramas obtido pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondente à mistura da amostra 2 com o contaminante 1 na proporção de 1:1 (a), na proporção de 1:9 (b) e na proporção de 9:1 (c).

Com o objetivo de confirmar a capacidade de detecção de misturas, procedeu-se à mistura de 8 amostras em três proporções, 1:1, 1:9 e 9:1, perfazendo um total de 6 ensaios (A1C1,A2C1,A3C1,A4C2,A5C2 e A6C2). Nos ensaios relativos à proporção de 1:1 verificou-se que em 4 dos ensaios foi possível detetar completamente os alelos correspondentes aos dois contribuidores envolvidos e em 2 dos ensaios detetou-se a totalidade dos alelos com a exceção do alelo D40 do contribuidor C. Nos ensaios da proporção 1:9 verificou-se que em 2 dos ensaios foi possível detetar todos os alelos, no entanto 7 dos alelos encontram-se com baixo valor de RFU. Em outros 2 ensaios detetaram-se todos os alelos com a exceção do D136 correspondente ao contribuidor A (contribuidor com menor representação) e com 4 a 6 alelos com baixos níveis de RFU. Por fim, os 2 últimos ensaios não detetaram 2 dos alelos (D48, D84 ou D56,D48) do contribuidor A, sendo que 8-9 dos alelos foram detetados com valores de RFU baixos. Relativamente à proporção 9:1, 3 dos ensaios foram capazes de detetar todos os alelos envolvidos mas com 3 a 4 alelos com baixos níveis de RFU, os outros 3 ensaios não foram capazes de detetar um dos alelos (D93 ou D40) correspondentes ao contribuidor C (contribuinte com menor representação) sendo que 4-8 dos alelos detetados tinham níveis de RFU bastante baixos. Os resultados observados corroboram a favor dos resultados observados em LaRue e colaboradores [47], em que os contribuidores com menor representação são detetados completamente na maioria das vezes mas com níveis de RFU baixos comparativamente aos contribuidores com maior representação, sendo que isto não se aplica na proporção de 1:1 em que ambos os contribuidores têm a mesma proporção na amostra e são detetados de igual forma entre si.

4.3.1.5. Análise da precisão do método

Como forma de avaliar a precisão do método, ou seja, a capacidade que o método tem de obter a mesma classificação alélica em amplificações e corridas diferentes da mesma amostra, procedeu-se à amplificação de 3 amostras de DNA controlo (XY5, 9947A e K-562) seguida de eletroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM 3130xl com 10 segundos de injeção (tempo de injeção padrão) e com 20 segundos de injeção, comparando posteriormente os resultados dos dois tempos de injeção [47].

A figura 19 apresenta os resultados obtidos do ensaio de precisão do método, correspondentes à amostra DNA controlo (9947A) com os dois tempos de injeção.

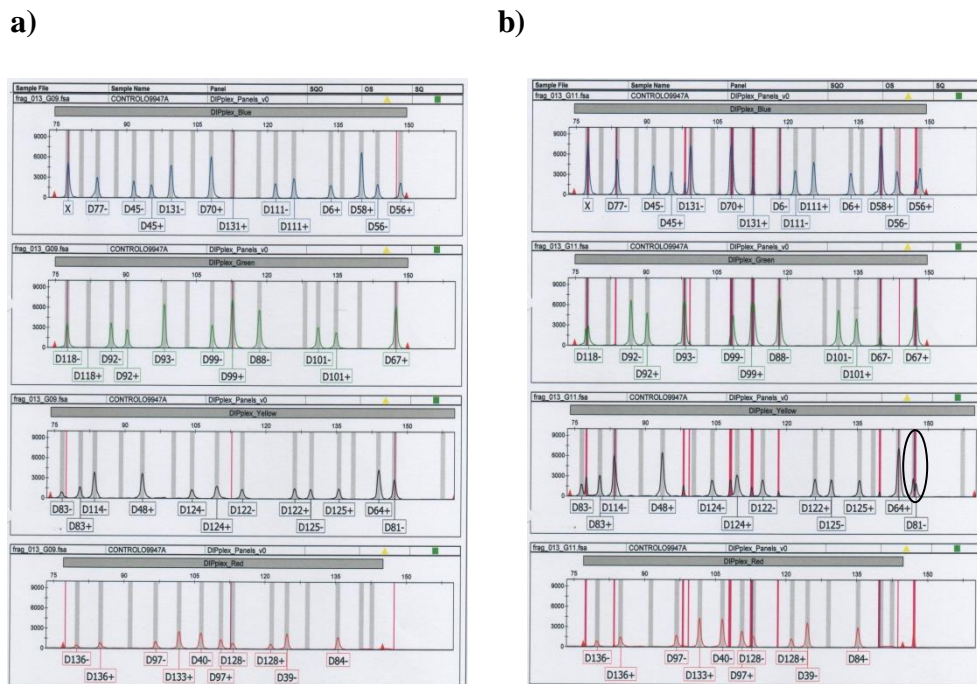


Figura 19. Imagem ilustrativa dos eletroforegramas obtidos pelo sequenciador automático ABI PRISM 3130xl, correspondentes à amostra de DNA controlo (9947A) com o tempo de injeção padrão (10 segundos) (a) e com o tempo de injeção teste (20 segundos) (b). O círculo encontrado na imagem b) mostra um caso de adenilação incompleta.

Foi feito o teste t student de 3 amostras. O teste t student é um teste de hipóteses, em que existe a hipótese nula (H_0) e uma hipótese alternativa (H_1). É usado para testar a hipótese de que não existem diferenças entre dois ensaios, e é frequentemente utilizado quando o grupo amostral é relativamente pequeno ($n \leq 30$). Neste caso, a hipótese H_0 afirma que não existem diferenças entre os dois tempos de injeção estudados, enquanto que a hipótese H_1 afirma que existem diferenças nos dois tempo de injeção.

Este teste foi feito através do cálculo da média do número de par de bases de cada alelo nos dois tempos de injeção, e os resultados estão registados na tabela XI [52, 68].

Tabela XI. Tabela com os resultados obtidos do teste t student para as 3 amostras analisadas.

Amostra	9947A	XY5	K-562
p-value	0,494933058	0,74895273	0,168290451

Após o ensaio foi possível concluir que o método é preciso para o parâmetro em estudo (tempo de injeção), uma vez que é capaz de detetar todos os alelos, quer quando o tempo de injeção no sequenciador automático é o recomendado pelo fabricante quer quando o tempo de injeção é aumentado para 20 segundos. No entanto, a interpretação do eletroforegrama correspondente à injeção durante 20 segundos é dificultada, uma vez que o maior tempo de injeção faz com que o eletroforegrama apresente picos correspondentes ao excesso de DNA e picos correspondentes à adenilação incompleta, como evidenciado no círculo da figura 16b.

É ainda possível concluir que o método é preciso pela realização do teste t student, em que nível de significância é $p < 0,05$ (como evidenciado na tabela XI) e é então possível concluir que se aceita a hipótese nula (H_0), ou seja, que não existe diferença entre os dois tempos de injeção. Estes resultados são semelhantes aos anteriormente obtidos por LaRue e colaboradores [47,73].

4.3.2. Análise dos parâmetros estatísticos para os marcadores InDel do kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen)

4.3.2.1. Análise dos parâmetros estatísticos populacionais

Foram analisados resultados genéticos obtidos em 120 indivíduos com o software Arlequin v3.5 com o intuito de determinar a heterozigotia observada, a heterozigotia esperada, o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas para cada marcador. Os resultados obtidos dessa análise encontram-se na tabela XII, e ainda no anexo 8.

Tabela XII. Tabela com os resultados obtidos do software Arlequin v3.5 sobre os parâmetros estatísticos populacionais (Heterozigotia Observada, Heterozigotia Esperada e Equilíbrio de Hardy-Weinberg) estudados para os marcadores do tipo InDel do kit Investigator DIPlex[®].

Marcador	Heterozigotia Observada	Heterozigotia Esperada	Equilíbrio Hardy-Weinberg
HLD77	0,4750	0,4962	0,7124
HLD45	0,5000	0,4986	1,0000
HLD131	0,5583	0,4943	0,1934
HLD70	0,5250	0,4895	0,4559
HLD6	0,4583	0,4993	0,4615
HLD111	0,4833	0,4999	0,8545
HLD58	0,4833	0,4971	0,8538
HLD56	0,4167	0,4004	0,8186
HLD118	0,5167	0,4785	0,4446
HLD92	0,5333	0,4971	0,4654
HLD93	0,4167	0,5008	0,0695
HLD99	0,5167	0,4908	0,5813
HLD88	0,5250	0,5012	0,7125
HLD101	0,4667	0,5008	0,4686
HLD67	0,4500	0,4707	0,6978
HLD83	0,4833	0,5008	0,7198
HLD114	0,4833	0,4971	0,8549
HLD48	0,5500	0,4785	0,1244

HLD124	0,5333	0,4932	0,4534
HLD122	0,4833	0,4664	0,8443
HLD125	0,4917	0,5018	0,8564
HLD64	0,4333	0,4932	0,1976
HLD81	0,4917	0,4895	1,0000
HLD136	0,5500	0,4971	0,2687
HLD133	0,5250	0,5012	0,7147
HLD97	0,4202	0,5004	0,0991
HLD40	0,4833	0,5019	0,7179
HLD128	0,5083	0,4920	0,8511
HLD39	0,4667	0,4820	0,8486
HLD84	0,5083	0,4435	0,1470

Os valores da Heterozigotia Observada situam-se entre 0,4167 (HLD56 e 93) e 0,5583 (HLD131) e apresentam valor médio de 0,4912, enquanto que os valores de heterozigotia esperada se situam entre os valores 0,4004 (HLD56) e 0,5019 (HLD40) e têm valor médio de 0,4885. No que concerne à análise do parâmetro relativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, este permite verificar que a população se encontra em equilíbrio considerando um nível de significância $p < 0,05$ [49,69,70].

A tabela XIII tem os resultados obtidos pelo teste das distâncias genéticas entre a população de estudo (sul de Portugal) e outras 5 populações anteriormente estudadas por outros autores.

Tabela XIII. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequin v3.5 acerca das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população norte de Portugal (Port. Norte), centro Espanha (Centro Esp.), País Basco, Africana (África) e Europeia (Eur.).

	Port.Sul vs Port. Norte	Port.Sul vs Esp.Centro	Port.Sul vs País Basco	Port.Sul vs África	Port.Sul vs Eur.
HLD77	0.01953	0.03942	0.06892	0.18727	-0.0093
HLD45	-0.00502	0.00156	-0.00878	0.02755	-0.00088
HLD131	-0.00502	0.00156	-0.00878	0.02755	0.00088
HLD70	0.00475	0.04251	0.06206	0.22224	-0.00832
HLD6	0.01035	-0.00868	-0.01311	-0.02167	-0.00088
HLD111	0.03434	-0.00319	0.01329	-0.0254	-0.00565
HLD58	-0.00616	-0.01035	0.01169	0.33928	-0.00909
HLD56	0.30865	0.36379	0.21337	0.26616	0.19400
HLD118	0.04015	0.05141	0.04931	0.28363	0.05497

HLD92	0.00011	-0.00264	0.02034		
HLD93	-0.00313	-0.01125	-0.00991	0.07505	-0.00306
HLD99	0.07234	0.05145	0.07024	0.25222	0.01626
HLD88	-0.00836	0.00031	0.00704		
HLD101	-0.00304	-0.0113	0.00843		
HLD67	0.08465	0.11951	0.00618	0.16669	0.17784
HLD83	-0.00679	-0.00863	-0.00366	0.01538	-0.00972
HLD114	0.01879	0.00646	0.10249	0.10829	0.03135
HLD48	0.03672	0.02832	0.01877	0.01099	0.0076
HLD124	0.07943	0.09074	0.12086	0.28797	0.10364
HLD122	0.07943	0.09074	0.12086	0.28797	0.10364
HLD125	0.01351	-0.01156	-0.01279	0.13228	0.02201
HLD64	0.01894	0.03386	-0.00511	0.31583	0.00883
HLD81	0.03848	0.05797	0.00522		
HLD136	0.13437	0.00652	0.10308	0.13572	0.00197
HLD133	-0.00248	0.03991	0.02834	0.02072	-0.00971
HLD97	-0.00591	-0.01152	0.00354	-0.00856	-0.00781
HLD40	-0.00175	-0.00219	-0.0092	0.0427	-0.00171
HLD128	0.06239	0.02832	0.00434	-0.01431	0.03629
HLD39	0.13569	0.07173	0.17237		
HLD84	0.10453	0.13873	0.11733		

A tabela XIV representa os P-values do teste exato das distâncias genéticas entre a população de estudo e outras 5 populações anteriormente estudadas por outros autores.

Tabela XIV. Tabela com os resultados obtidos pelo software Arlequin v3.5 acerca dos P-values das distâncias genéticas entre a nossa população de estudo (sul de Portugal- Port.) e a população norte de Portugal (Port. Norte), centro Espanha (Centro Esp.), País Basco, Africana (África) e Europeia (Eur.). A população Africana e Europeia não apresentam valores nalguns dos marcadores genéticos devido ao fato de não estarem publicadas frequências alélicas desses marcadores.

	Port.Sul vs Port. Norte	Port.Sul vs Esp.Centro	Port.Sul vs País Basco	Port.Sul vs África	Port.Sul vs Eur.
HLD77	0.12613	0.08108	0.00000	0.00000	0.85586
HLD45	0.62162	0.34234	0.63063	0.18919	0.40541
HLD131	0.60360	0.37838	0.62162	0.13514	0.40541
HLD70	0.27027	0.02703	0.01802	0.00901	0.75676
HLD6	0.16216	0.63964	0.99099	0.81982	0.36937
HLD111	0.03604	0.44144	0.18018	0.99099	0.54955
HLD58	0.54054	0.75676	0.20721	0.00000	0.88288
HLD56	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
HLD118	0.00901	0.01802	0.02703	0.00000	0.00000
HLD92	0.32432	0.41441	0.11712		

HLD93	0.48649	0.84685	0.71171	0.07207	0.53153
HLD99	0.00000	0.04505	0.02703	0.00000	0.11712
HLD88	0.88288	0.26126	0.32432		
HLD101	0.44144	0.91892	0.26126		
HLD67	0.00000	0.00901	0.23423	0.00000	0.00000
HLD83	0.69369	0.65766	0.41441	0.18919	0.99099
HLD114	0.07207	0.20721	0.00000	0.00901	0.02703
HLD48	0.04505	0.04505	0.24324	0.23423	0.21622
HLD124	0.00000	0.00901	0.00000	0.00000	0.00000
HLD122	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
HLD125	0.07207	0.99099	0.99099	0.01802	0.09009
HLD64	0.01802	0.02703	0.49550	0.00000	0.15315
HLD81	0.02703	0.00901	0.20721		
HLD136	0.00000	0.19820	0.00000	0.00000	0.29730
HLD133	0.43243	0.02703	0.06306	0.22523	0.99099
HLD97	0.64865	0.89189	0.33333	0.51351	0.74775
HLD40	0.43243	0.42342	0.59459	0.12613	0.42342
HLD128	0.00000	0.06306	0.26126	0.59459	0.03604
HLD39	0.00000	0.00901	0.00000		
HLD84	0.00000	0.00000	0.00000		

São observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população do sul de Portugal e a população do norte de Portugal nos marcadores genéticos HLD 111, HLD 56, HLD 118, HLD 99, HLD 67, HLD 124, HLD 122, HLD 64, HLD 81, HLD 136, HLD 128, HLD 39 e HLD 84. Como é possível observar na tabela correspondente aos valores das distâncias genéticas (tabela XIV) para estes marcadores, as distâncias são maiores que os valores relativos aos marcadores em que as distâncias não são significativas, nomeadamente para o marcador HLD56, em que o valor da distância genética é 0,30865.

Entre a população sul de Portugal e a população do centro de Espanha existem igualmente diferenças significativas ($p < 0,05$), nomeadamente nos marcadores genéticos HLD 70, HLD 56, HLD 118, HLD 67, HLD 124, HLD 122, HLD 64, HLD 81, HLD 133, HLD 39 e HLD 84. Pode-se observar na tabela XIV, correspondente aos valores das distâncias genéticas, que nestes marcadores as distâncias genéticas são maiores que as distâncias genéticas dos marcadores sem distâncias significativas, nomeadamente o marcador HLD 56, em que o valor da distância genética é 0,36379.

São também observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população sul de Portugal e a população relativa ao País Basco, nomeadamente nos marcadores

genéticos HLD 77, HLD 70, HLD 56, HLD 118, HLD 99, HLD 114, HLD 124, HLD 122, HLD 136, HLD 39 e HLD 84. Na tabela XIV encontram-se os valores das distâncias genéticas, sendo por isso possível verificar que esses valores são relativamente elevados para estes marcadores quando comparados com os marcadores que não apresentam distâncias significativas, nomeadamente para o marcador HLD 56, que apresenta o valor de 0,21337.

Verifica-se também diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população sul de Portugal e a população Africana nos marcadores genéticos HLD 77, HLD 70, HLD 58, HLD 56, HLD 118, HLD 99, HLD 67, HLD 114, HLD 124, HLD 122, HLD 125, HLD 64 e HLD136. Observando a tabela XIV pode-se observar os valores das distâncias genéticas são relativamente mais elevados para os marcadores que apresentam uma distância genética significativa do que os, que pelo contrário não apresentam distância significativa, nomeadamente o marcador HLD 58, que tem o valor de 0,33928.

Observa-se ainda diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a população sul de Portugal e a população Europeia nos marcadores genéticos HLD 56, HLD 118, HLD 67, HLD 114, HLD 124, HLD 122 e HLD 128. Na tabela XIV observam-se os valores das distâncias genéticas, sendo possível verificar que o valor das distâncias genéticas para estes marcadores é igualmente mais elevado que os marcadores sem distância significativa entre populações, nomeadamente no marcador HLD 56 que tem o valor de 0,19400 [29,49,50,60,69,70].

4.3.2.2. Análise dos parâmetros estatísticos Forenses

Para a análise dos parâmetros estatísticos Forenses recorreu-se ao software PowerStat (promega) [64]. Foram analisados resultados genéticos obtidos em 120 indivíduos, tendo-se analisado os parâmetros Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (*Polymorphism Information Content*), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas. Os resultados dessa análise encontram-se representados na tabela XV.

Tabela XV. Tabela com os resultados obtidos do software PowerStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade de coincidência, Poder de discriminação, PIC (Polymorphism Information Content), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.

	HLD77	HLD45	HLD131	HLD70	HLD6	HLD111	HLD58	HLD56	HLD118	HLD92	HLD93	HLD99	HLD88	HLD101	HLD67
Probabilidade de Coincidência	0,3666	0,3726	0,4112	0,4091	0,3677	0,3893	0,3699	0,4418	0,4076	0,4009	0,3435	0,3980	0,3982	0,3632	0,3935
Poder de Discriminação	0,6334	0,6274	0,5888	0,5909	0,6323	0,6107	0,6301	0,5582	0,5924	0,5991	0,6565	0,6019	0,6018	0,6368	0,6065
PIC	0,3719	0,3729	0,3714	0,3724	0,3733	0,3714	0,3742	0,3194	0,3646	0,3737	0,3747	0,3696	0,375	0,3737	0,3579
Poder de Exclusão	0,1609	0,1757	0,2356	0,2356	0,1682	0,1998	0,1757	0,1162	0,2084	0,2263	0,1219	0,2084	0,2263	0,1609	0,1609
Índice típico de paternidade	0,9397	0,9732	1,1122	1,1122	0,9561	1,0283	0,9732	0,8385	1,0481	1,09	0,8516	1,0481	1,09	0,9397	0,9397
Heterozigóticas	0,4679	0,49	0,5506	0,5505	0,4771	0,5138	0,4862	0,4037	0,5229	0,5413	0,4128	0,5229	0,5413	0,4679	0,4679
Homozigóticas	0,5321	0,51	0,4495	0,4495	0,5229	0,4862	0,5138	0,5963	0,4771	0,4587	0,5872	0,4771	0,4587	0,5321	0,5321

Tabela XV (Cont.). Tabela com os resultados obtidos do software PowerStat (Promega) relativos aos parâmetros estatísticos Forenses, nomeadamente, Probabilidade Coincidência, Poder de discriminação, PIC (Polymorphism Information Content), Poder de exclusão, Índice típico de paternidade e frequências alélicas.

	HLD83	HLD114	HLD48	HLD124	HLD122	HLD125	HLD64	HLD81	HLD136	HLD133	HLD97	HLD40	HLD128	HLD39	HLD84
Probabilidade de Coincidência	0,3779	0,3909	0,4399	0,4078	0,4034	0,3800	0,3519	0,4016	0,4144	0,3997	0,3520	0,3699	0,4041	0,3792	0,4304
Poder de Discriminação	0,6220	0,6090	0,5601	0,5922	0,5966	0,6199	0,6481	0,5984	0,5856	0,6003	0,6479	0,6301	0,5959	0,6208	0,5697
PIC	0,3747	0,3681	0,3664	0,3673	0,3592	0,3737	0,3729	0,3626	0,3729	0,3742	0,3749	0,3742	0,3664	0,3636	0,3445
Poder de Exclusão	0,1915	0,1915	0,2653	0,2172	0,1835	0,1916	0,1341	0,1916	0,2452	0,2263	0,1433	0,1757	0,2083	0,1539	0,1835
Índice típico de paternidade	1,0093	1,0093	1,1848	1,0686	0,9909	1,0093	0,8790	1,0093	1,1354	1,09	0,9	0,9732	1,0481	0,9237	0,9909
Heterozigóticas	0,5046	0,5046	0,5779	0,5321	0,4954	0,5046	0,4312	0,5046	0,5596	0,5413	0,4444	0,4862	0,5229	0,4587	0,4954
Homozigóticas	0,4954	0,4954	0,4220	0,4679	0,5046	0,4954	0,5688	0,4954	0,4404	0,4587	0,5556	0,5138	0,4771	0,5413	0,5046

Todos os estudos efetuados nos marcadores do kit referido respeitam as diretrizes do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

A probabilidade de coincidência dos marcadores do kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen) apresentam o valor médio de 0,04 sendo o marcador HLD56 o que apresenta o valor mais alto e o marcador HLD93 o valor mais baixo.

O poder de discriminação, outro parâmetro estatístico forense calculado pelo software acima referido, tem o valor médio de 0,06 sendo neste caso o marcador com valor mais elevado o HLD93 e o de menor valor o HLD56.

No que concerne à PIC, o seu valor médio é de 0,37 sendo o marcador com maior valor o HLD88, enquanto que o marcador com menor valor o HLD56.

Relativamente ao poder de exclusão (probabilidade de um sistema genético específico possa contribuir para a exclusão de um determinado indivíduo), o valor médio é de 0,19, sendo o marcador com maior valor o HLD48 e o de menor o marcador HLD56.

O Índice típico de paternidade tem um valor médio de 1,01 em que o marcador com maior valor é mais uma vez o HLD48 e o de menor valor é o HLD64.

4.3.2.3. Mutações detetadas

A análise genética de trios pretense pai/mãe/filho permitiu verificar a presença numa amostra, de um possível alelo nulo no marcador HLD97, que já se encontra descrito em S,Friis e colaboradores [37], e F,Manta e colaboradores [48]. Segundo essas citações, existe uma substituição de uma guanina por uma adenina, 61pb antes do local do marcador InDel. Essa substituição altera o local de ligação dos primers à cadeia de DNA, impedindo a extensão da cadeia e consequentemente a sua correta leitura pelo sequenciador automático. O eletroforegrama, da amostra que evidencia a presença do suposto alelo nulo, encontra-se evidenciado na figura 20, bem como os outros intervenientes no processo de análise de parentesco e o ladder alélico do kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen) a fim de se perceber qual o local onde deveria estar o pico correspondente ao alelo em falta [37,48].

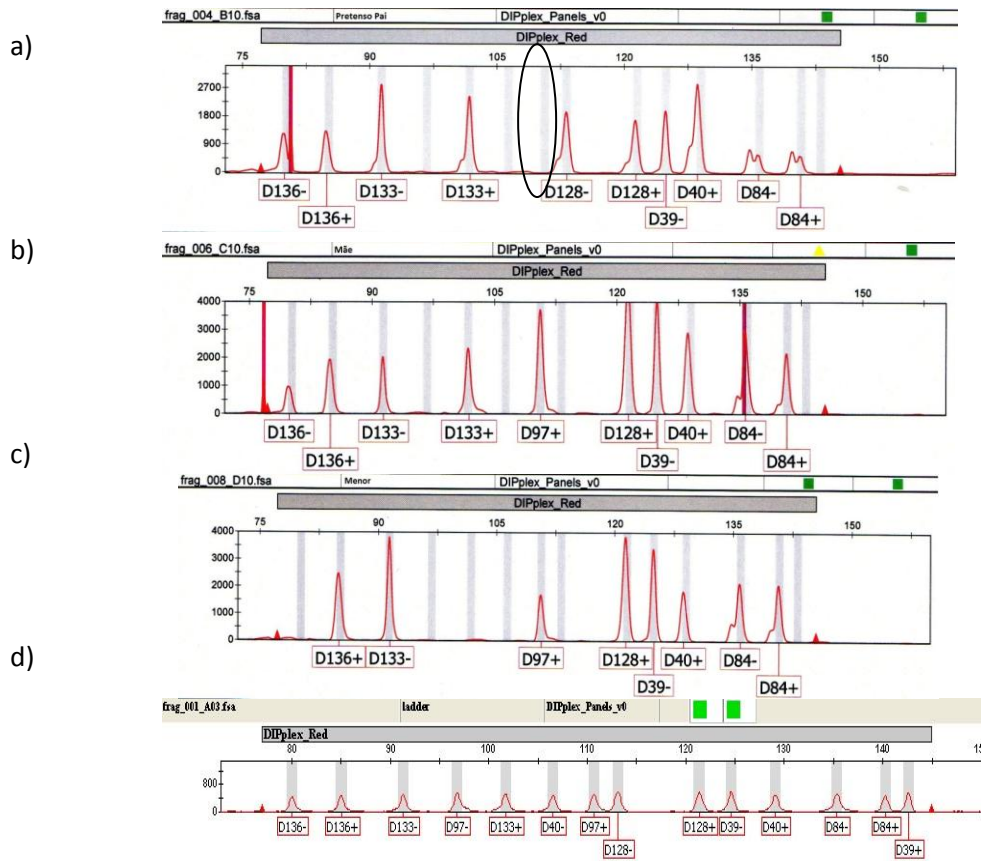


Figura 20. Gráfico evidenciando o Pretenso Pai com presença de um alelo nulo- D97⁺ (marcado com círculo) (a), a mãe envolvida na análise de parentesco (b), o filho (c) e o ladder alélico do kit para comprovar o local referente ao alelo que não se encontra sequenciado (d).

Subcapítulo 4.5 (Discussão dos resultados)

4.5. Discussão dos resultados relativos ao kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen)

Relativamente à validação do kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen) verificou-se que, à semelhança do que verificamos com o kit PowerPlex[®] ES107 (Promega), reduzindo para metade o volume final da reação de PCR (12,5 µL) foi possível obter perfis genéticos completos. Para detetar o limiar analítico do kit procedeu-se à diluição de 6 amostras, tendo-se observado que na diluição de 1:2, em que a concentração média das amostras é 629pg, foram possíveis detetar 14 dos 30 alelos, na íntegra. Já nas amostras diluídas de 1:10, em que a concentração média é de 125pg, detetaram-se 29 dos 30 marcadores. Uma vez que o kit em questão está desenvolvido para amostras de DNA degradado é normal observar maior eficácia na deteção dos vários alelos com quantidade de DNA aproximadamente de 125pg, comparativamente a maiores concentrações de DNA (observadas na diluição de 1:2). Estes resultados estão de acordo com os descritos por LaRue e colaboradores [47], onde é referida a robustez de resultados com 125pg. Estes autores afirmam ainda que, a concentração ideal de DNA na reação deve-se situar entre os 250-500pg, no entanto os nossos resultados mostram que com concentrações menores os resultados são igualmente fiáveis. A fim de confirmar a capacidade de deteção de misturas, procedeu-se à mistura de 8 amostras em três proporções, 1:1, 1:9 e 9:1. Os resultados observados vão de encontro aos resultados observados em LaRue e colaboradores [47], onde os contribuidores minoritários são detetados na maioria das vezes, mas com níveis de RFU baixos comparativamente aos contribuidores majoritários, sendo que não se aplica na proporção de 1:1 em que ambos os contribuidores têm a mesma proporção na amostra e são detetados de igual modo entre si. Conclui-se assim que este kit é capaz de detetar fiavelmente a presença de misturas de DNA numa amostra, sendo esse resultado de elevada importância no âmbito forense. Por último, avaliou-se a precisão do método, ou seja, a sua capacidade para obter a mesma classificação alélica em amplificações e corridas diferentes da mesma amostra, com tempos de injeção diferentes. Foi possível observar que, nos dois tempos de injeção utilizados, a deteção dos alelos foi feita corretamente, não havendo diferenças aparentes. Esses resultados são ainda confirmados pelos resultados do teste t student, em que foi possível concluir que não existem diferenças significativas entre os tempos de injeção testados. No entanto, quando o tempo de injeção é maior, ocorrem eventos de adenilação incompleta e de sombras resultantes do excesso de DNA, o que torna a

análise mais difícil. Estes resultados são semelhantes aos anteriormente obtidos por LaRue e colaboradores [47].

Os valores da Heterozigotia Observada situam-se entre 0,4167 (HLD56 e 93) e 0,5583 (HLD131) e apresentam valor médio de 0,4912, enquanto que os valores de heterozigotia esperada se situam entre os valores 0,4004 (HLD56) e 0,5019 (HLD40) e têm valor médio de 0,4885. Estes resultados não são os esperados, uma vez que para serem considerados bons marcadores para o âmbito forense necessitam de ter valores de heterozigotia superiores a 70%. No que diz respeito à análise do parâmetro relativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, este permite verificar que a população se encontra em equilíbrio considerando um nível de significância $p < 0,05$.

A probabilidade de coincidência dos marcadores do kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen) apresenta o valor médio de 0,04, sendo que o marcador HLD56 adquire o valor mais alto e o marcador HLD93 o valor mais baixo. Pode-se então concluir que o marcador HLD56 é o marcador em que a probabilidade de coincidir no polimorfismo de amostras é maior. O poder de discriminação, outro parâmetro estatístico forense, tem o valor médio de 0,06 sendo neste caso o marcador com valor mais elevado o HLD93, e o valor mais baixo o HLD56. Sendo este parâmetro o oposto do anterior, é de esperar que o marcador com maior valor de poder de discriminação, e por isso o marcador com que foi visível uma maior variância de genótipo ao longo do estudo, seja o HLD93, concluindo assim que este marcador é um bom marcador a ser utilizado para cálculos deste parâmetro. No que respeita à PIC, o seu valor médio é de 0,37 sendo o marcador com maior valor o HLD88, e o de menor valor o HLD56, pelo que não perfaz um dos requisitos para ser considerado um bom marcador genético, ou seja, elevado poder de discriminação. Este parâmetro representa a informatividade do polimorfismo em determinado marcador. Para que um polimorfismo seja considerado informativo o seu valor tem de ser superior a 2,5, o que é possível verificar pelos resultados apresentados. No entanto a avaliação deste parâmetro neste ensaio não apresenta uma relevante importância uma vez que estes marcadores são bi-alélicos. Relativamente ao poder de exclusão (probabilidade de um sistema genético específico poder contribuir para a exclusão de um determinado indivíduo), o valor médio é de 0,19, sendo o marcador com maior valor o HLD48 e o de menor valor o marcador HLD56. Assim o marcador HLD48 é o marcador com maior capacidade de contribuir para a exclusão de parentesco entre indivíduos. O

índice típico de paternidade indica quantas vezes é mais provável, que um indivíduo seja realmente pai biológico de um outro indivíduo, que um terceiro selecionado aleatoriamente na população, mediante a utilização de cada marcador em particular. Este parâmetro quando igual ou superior 1, indica que existe parentesco entre os indivíduos em estudo. Foi possível verificar que o marcador com maior valor é, mais uma vez, o HLD48 (1,1848) e o de menor valor o HLD64 (0,8790). Foi possível verificar que nem todos os marcadores, apresentam valores superiores a 1, pelo que conclui-se que alguns dos marcadores são bons marcadores de estudo para o parâmetro em questão, enquanto que outros não o são.

Foram comparadas as frequências alélicas, para cada marcador, entre a população do Sul de Portugal e as populações Norte de Portugal, Centro de Espanha, Africana e Europeia, tendo sido observadas diferenças entre alguns marcadores. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), entre a população do Sul de Portugal e todas as outras populações analisadas, nos marcadores HLD 56, HLD 118, HLD 124 e HLD 122. Quando comparada a população do Sul de Portugal com a população Norte de Portugal, foram observadas diferenças significativas nos marcadores HLD 111, HLD 56, HLD 118, HLD 99, HLD 67, HLD 124, HLD 122, HLD 64, HLD 81, HLD 136, HLD 128, HLD 39 e HLD 84. Comparando a população do Sul de Portugal com a população Central de Espanha, foi possível observar diferenças significativas nos marcadores HLD 70, HLD 56, HLD 118, HLD 67, HLD 124, HLD 122, HLD 64, HLD 81, HLD 133, HLD 39 e HLD 84. Relativamente à população do Sul de Portugal e o País Basco, foram igualmente encontradas diferenças significativas nos marcadores HLD 77, HLD 70, HLD 56, HLD 118, HLD 99, HLD 114, HLD 124, HLD 122, HLD 136, HLD 39 e HLD 84. Na comparação das populações do Sul de Portugal e Africana, foram encontradas diferenças significativas nos marcadores HLD 77, HLD 70, HLD 58, HLD 56, HLD 118, HLD 99, HLD 67, HLD 114, HLD 124, HLD 122, HLD 125, HLD 64 e HLD 136. Por fim, comparando a população do Sul de Portugal com a População Europeia, foram encontradas diferenças significativas nos marcadores HLD 56, HLD 118, HLD 67, HLD 114, HLD 124, HLD 122 e HLD 128. No entanto, é necessário ter em consideração o tamanho limitado da amostra em estudo, pelo que, mais estudos serão necessários para ser possível concluir acerca das distâncias genéticas entre as populações.

Subcapítulo 4.6 (Conclusão)

4.6. Conclusão

Relativamente à caracterização dos marcadores do tipo InDel, do kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen), estes necessitam de ser validados para a prática forense e para tal realizaram-se ensaios de sensibilidade, estudo de limiares analíticos, análise de misturas e análise de precisão do método. Foram ainda feitos ensaios para o cálculo de parâmetros estatísticos populacionais e forenses bem como calculadas as distâncias genéticas entre populações.

No que diz respeito aos ensaios de validação, o primeiro parâmetro a analisar foi a sensibilidade, em que foi possível concluir que o kit é sensível pois consegue obter perfis completos com metade do volume recomendado pelo fabricante (12,5µL). O segundo parâmetro a analisar foi os limiares analíticos, onde se pôde concluir que o kit é capaz de obter perfis completos com aproximadamente 125pg. Este resultado está de acordo com os obtidos por outros autores. O parâmetro seguinte a ser analisado foi a presença de mistura de DNA numa amostra, mesmo com diferentes proporções, em que foi possível concluir que o kit é capaz de detetar a presença de misturas de DNA. O último parâmetro a ser analisado foi a precisão do método, e aqui foi possível concluir que o método é bastante preciso como já tinha sido provado por outros autores.

Para além dos ensaios de validação do método, procedeu-se também ao cálculo dos parâmetros estatísticos populacionais e forenses, bem como os valores das distâncias genéticas entre a população Portuguesa e as outras populações estudadas.

Relativamente aos parâmetros estatísticos populacionais e forenses é possível afirmar que os marcadores em estudo não preenchem todos os requisitos necessários para que possam ser considerados bons marcadores genéticos, uma vez que os valores relativos ao poder de discriminação são sempre inferiores a 65% e os valores da heterozigotia são sempre inferiores a 56%. Assim conclui-se que estes marcadores devem ser utilizados, para já, complementarmente aos marcadores do tipo STR. No entanto, sublinhamos que não estamos presente marcadores do tipo STR, mas sim marcadores bi-alélicos, pelo que poderão ser necessários ajustes em alguns requisitos.

Por fim, calcularam-se as distâncias genéticas entre a população Portuguesa e as populações Espanhola, Americana, Inglesa e Sueca, tendo-se verificado que todas as populações apresentam distância genética significativa. Contudo, mais estudos serão necessários realizar, aumentando a amostra de estudo.

Assim, no geral, conclui-se que o kit em estudo, necessita de alguns ajustes relativamente à classificação de bom marcador genético, mas os seus marcadores são bons marcadores para estudos genéticos e forenses.

Capítulo 5 (Conclusão geral)

5. Conclusão geral

Implementou-se, com sucesso, a técnica de PCR multiplex para os marcadores STR e InDel, tendo sido feitos também, testes de validação, testes estatísticos populacionais e forenses e ainda testes de distâncias genéticas inter-populacionais.

Foi possível concluir que o kit PowerPlex[®] ESI17 (Promega) e os seus marcadores foram validados para o uso forense, nomeadamente nos parâmetros sensibilidade, limiares analíticos, deteção de misturas e precisão do método. Relativamente aos testes estatísticos, pôde-se concluir que os marcadores seguem as características adequadas para bons marcadores genéticos (elevado poder discriminatório, valores de heterozigotia superiores a 70%, facilidade de reprodutibilidade da técnica, localização em diferentes cromossomas, ou com localização distante, baixas taxas de mutação, pequenos produtos de amplificação e baixo teor de artefactos). No que concerne aos testes de distâncias genéticas, conclui-se que existem distâncias genéticas significativas entre a população de estudo e outras populações estudadas anteriormente.

Assim conclui-se que o kit PowerPlex[®] ESI17 (Promega) é um bom kit para o uso genético e forense.

Relativamente ao kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen) e aos seus marcadores, estes foram validados para o uso forense nos parâmetros sensibilidade, limiares analíticos, deteção de misturas e precisão do método. Em relação aos testes estatísticos, conclui-se que os marcadores seguem as características adequadas para bons marcadores genéticos, com a exceção do valor de heterozigotia que é inferior a 70% e aos valores de poder de discriminação que são relativamente baixos. Relativamente aos testes de distâncias genéticas, foi possível concluir que existem distâncias genéticas significativas entre a população de estudo e as outras populações estudadas.

Assim, conclui-se que o kit Investigator DIPlex[®] (Qiagen) não apresenta todas as características necessárias para ser considerado um bom kit para a área genética e forense, pelo que, para já seria aconselhável utilizar este kit complementarmente aos kits de STR, até que mais estudos sejam realizados e que os seus requisitos sejam definidos.

É ainda necessário realizar os testes anteriormente referidos mas com a população de estudo relativamente maior.

Capítulo 6 (Bibliografía)

6.Referências bibliográficas

1. Albinsson, L; Ansell, R, (2011), “Swedish population data and concordance for the kits PowerPlex® ESX16 system, PowerPlex® ESI16 system, AmpFISTR® NGM™, AmpFISTR® NGM Plus™ and Investigator ESSplex”, *Forensic Science International: Genetics*, (5), pp. e89-e92.
2. Amorim, A, (2013), *Genética Forense in conferências “Ciclo Crime e Violência”*, Academia das Ciências de Lisboa, Lisboa, no prelo.
3. Balding, D.J, (2005), “Typing technologies”, in *Statistics in practice- The weight of evidence for Forensic DNA Profiles*, pp. 44-55, Wiley and Sons, Lta, Chichester, UK.
4. Barbisin, M; Fang, R; O’Shea, C; Calandro, L; Furtado, M; Shewale, J, (2009), “Developmental validation of the Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit for Simultaneous Quantification of Total Human and Human Male DNA and Detection of PCR Inhibitors in Biological Samples”, *J. Forensic Science*, 54 (2), pp.305-319.
5. Botstein, D; White, R; Skolnick, M; Davis, R, (1980), “Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms”, *Am. J. Hum. Genet.*, 32, pp. 314-331.
6. Brochures & Specifications: Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit (English).
7. Butler, J, (2006), “Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing”, *Forensic Science Journal*, 51 (2), pp. 253-262.
8. Butler, J (2012), “DNA Extraction Methods”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology (2ªedição)*, pp. 29-47, Elsevier, Estados Unidos América.
9. Butler, J (2012), “DNA Quantification”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology (2ªedição)*, pp. 49-67, Elsevier, Estados Unidos América.
10. Butler, J (2012), “PCR Amplification: Capabilities and Cautions”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology (2ªedição)*, pp. 69-97, Elsevier, Estados Unidos América.

11. Butler, J (2012), “Short Tandem Repeat (STR) Loci and Kits”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (2ª edição), pp. 99-139, Elsevier, Estados Unidos América.
12. Butler, J (2012), “Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (2ª edição), pp. 141-165, Elsevier, Estados Unidos América.
13. Butler, J (2012), “Degraded DNA”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (2ª edição), pp. 293-309, Elsevier, Estados Unidos América.
14. Butler, J (2012), “Low-Level DNA Testing: Issues, Concerns and Solutions”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (2ª edição), pp. 311-346, Elsevier, Estados Unidos América.
15. Butler, J (2012), “Single Nucleotide Polymorphisms and applications”, in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (2ª edição), pp. 347-369, Elsevier, Estados Unidos América.
16. Butler, J (2012), “Sample Collection, DNA Extraction and DNA Quantitation” in *Forensic DNA Typing*, (2ª edição), pp. 33-61, Elsevier, Estados Unidos América.
17. Butler, J (2012), “The Polimerase Chain Reaction (DNA Amplification)” in *Forensic DNA Typing*, (2ª edição), pp. 63-83, Elsevier, Estados Unidos América.
18. Butler, J (2012), “Commonly used Short Tandem Repeat Markers and Commercial Kits” in *Forensic DNA Typing*, (2ª edição), pp. 85-121, Elsevier, Estados Unidos América.
19. Butler, J (2012), “DNA Separation Methods: Slab Gel and Capillary Electrophoresis” in *Forensic DNA Typing*, (2ª edição), pp. 313-323, Elsevier, Estados Unidos América.
20. Butler, J (2012), “DNA Detection Methods: Fluorescent Dyes and Silver Staining” in *Forensic DNA Typing*, (2ª edição), pp. 325-343, Elsevier, Estados Unidos América.
21. Butler, J (2012), “Instrumentation for STR Typing: ABI310, ABI3100, FMBIO Systems” in *Forensic DNA Typing*, (2ª edição), pp. 345-370, Elsevier, Estados Unidos América.

22. Butler, J (2012), “STR Genotyping Issues” in Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 373-387, Elsevier, Estados Unidos América.
23. Butler, J (2012) “DNA Extraction”, in Fundamentals of Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 99-109, Elsevier, Estados Unidos América.
24. Butler, J (2012) “DNA Amplification (The Polimerase Chain Reaction)”, in Fundamentals of Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 126-146, Elsevier, Estados Unidos América.
25. Butler, J (2012) “Short Tandem Repeat Markers”, in Fundamentals of Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 147-173, Elsevier, Estados Unidos América.
26. Butler, J (2012) “Fundamental of DNA Separation and Detection”, in Fundamentals of Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 176-203, Elsevier, Estados Unidos América.
27. Butler, J (2012) “STR Genotyping and Data Interpretation”, in Fundamentals of Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 206-227, Elsevier, Estados Unidos América.
28. Butler, J (2012) “Statistical Interpretation: Evaluating the Strength of Forensic DNA Evidence”, in Fundamentals of Forensic DNA Typing, (2ªedição), pp. 229-258, Elsevier, Estados Unidos América.
29. Carvalho, A; Pinheiro, M, (2013), “Population data of 30 insertion/deletion polymorphisms from a sample taken in the North of Portugal”, Int. J. Legal Med, 127, pp. 65-67.
30. Castilho, R, “Genética de Populações: Noções básicas com aplicação em aquacultura”, Grupo Biodiversidade e Conservação do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, Faro.
31. Correia, P, (2008) “Lofoscopia- Uma breve introdução”, in CSI Criminal, (1ªedição), pp. 143-156, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
32. Dognaux, S; Larmuseau, M; Jansen, L; Heylen, T; Vanderheyden, N; Noel, F; Decorte, R, (2011), “Allele frequencies for the new European Standart Set (ESS) loci and D1S1677 in the Belgian population”, Forensic Science International: Genetics.
33. Evett, I; Weir, B, (1998), “Calculating Match Probabilities”, in Interpreting DNA Evidence, pp. 207-209, Sinauer.

34. Excoffier, L; Laval,G; Schneider,S, (2005), “Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis”, *Evolutionary Bioinformatics*, 1, pp.47-50.
35. Fondevila, M; Phillips, C; Santos, C; Pereira, R; Gusmão, L; Carracedo, A; Butler, J; Lareu, M; Vallone, P, (2012), “Forensic performance of two insertion-deletion marker assays”, *Int. J. Legal Med.*, 126, pp. 725-737.
36. Francez, P; Rodrigues, E; Velasco, A; Santos, S, (2011), “Insertion-deletion polymorphisms- utilization on forensic analysis”, *Int. J. Legal Medicine*.
37. Friis, S; BØrsting, C; Rockenbauer, E; Poulsen, L; Fredslund, S; Tomas, C; Morling, N, (2012), “Typing of 30 insertion/deletions in Danes using the first commercial indel kit- Mentype[®] DIPplex”, *Forensic Science International: Genetics*, 6, pp. e72-e74.
38. García, O; Alonso, J; Cano, J.A; García, R; Luque, G.M; Yuso, I; Maulini, S; Parra, D; Yurrebaso, I, (2012), “Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 system and Investigator ESSplex in Spain”, *Forensic Science International: Genetics*, (6), pp. e78-e79.
39. Gill,P, (2002), “Role of Short Tandem Repeat DNA in Forensic Casework in the UK- Past, Present and Future Perspectives”, *BioTechniques*, 32 (2), pp. 366-385.
40. Guo,S; Thompson,E, (2006) “Performing the Exact test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles”, *Biometrics*, 48 (2), pp.361-372.
41. Hill, C; Duewer, D; Kline, M; Sprecher, C; McLaren, R; Rabbach, D; Krenke, B; Ensenberger, M; Fulmer, P; Storts, D; Butler, J, (2011) “Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex[®] ESX17 and ESI17 systems”, *Forensic Science International: Genetics*, (5), pp. 269-275.
42. Hill, C; Kline, M; Coble, M; Butler, J, (2008), “Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples”, *Forensic Science Journal*, 53 (1), pp.73-80.
43. Huston, K. A. Statistical analysis of STR data. *GenePrint*, p.14-15, 1998.
44. “Investigator DIPplex Handbook”, (2011), QIAGEN.

45. Jacqueline K.; Wittke- Thompson; Anna Pluzhinikov; Nancy Cox, (2005), “Rational Inferences about Departures from Hardy-Weinberg Equilibrium”, *Am.J.Hum.Genet.*, 76, pp.967-986.
46. Kis, Z; Kozma, Z; Domján, L; Pamjav, H, (2011), “Genome deletion and insertion polymorphisms (DIPs) in the Hungarian population”, *Forensic Science International: Genetics*, 6, pp. e125-e126.
47. LaRue, B; Ge, J; King, J; Budowle, B, (2012), “A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex[®] kit; an INDEL-based assay for human identification”, *Int. J. Legal Medicine*, 126, pp.533-540.
48. Manta, F; Caiafa, A; Pereira, R; Silva, D; Amorim, A; Carvalho, E; Gusmão, L, (2012), “Indel markers: Genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations and application in a paternity investigation with post mortem material”, *Forensic Science International: Genetics*, 6, pp. 658-661.
49. Matos S., Vieira Silva C., Amorim A., Morais P., Afonso Costa H., Marques Santos R., Espinheira R., Costa Santos J. “Caracterização genética da população do sul de Portugal com marcadores do tipo InDel”, 3^oEncontros de Biologia Molecular, Almada-Portugal, 15-16 Março 2013.
50. Martín, P., García, O., Heinrichs, B., Yurrebaso, I., Aguirre, A., Alonso, A., (2012), “Population genetic data of 30 autosomal indels in Central Spain and the Basque Country populations”, *Forensic Science International: Genetics*.
51. Mills, R, Luttig, C, Larkins, C, Beauchamp, A, Tsui, C, Pittard, W., Devine, S, (2006), “An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome”, *Genome Research*, 16, pp. 1182-1190.
52. Myles, P.S, Gin,T, (2003), “Statistical methods for anaesthesia and intensive care”, pp.52-53, Butterworth Heinewnn, Edinburgo.
53. Nagylaki, T, (1997), “Fixation Indices in Subdivided Populations”, *Genetics Society of America*, 148, pp. 1325-1332.
54. Pereira, R, Phillips, C, Alves,C, Amorim,A, Carracedo, Á, Gusmão, L, (2009), “A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms”, *Electrophoresis*, 30, pp. 3682-3690.
55. 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, pp. 282-285.

56. Pinheiro, M, (2008) “A perícia em Genética e Biologia Forense”, in CSI Criminal, (1ªedição), pp.25-38, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
57. Pinheiro, M (2010) “Algumas Perspectivas da Identificação Genética” in Genética Forense- Perspectivas da identificação genética, pp.17-78, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
58. Pinheiro, M (2010) “Interesse dos Microssatélites na Identificação Genética” in Genética Forense- Perspectivas da identificação genética, pp.79-102, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
59. Pinheiro, M (2010) “Valorização Probabilística da Prova e Respetiva interpretação em Genética Forense” in Genética Forense- Perspectivas da identificação genética, pp.257-326, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
60. Qiagen, (2010), “Qiagen suplementar material: population data for analysis from the investigator DIPplex[®] kit”.
61. Santos, A, (2008) “Patologia Forense e a autópsia médico-legal, sua contribuição na investigação criminal”, in CSI Criminal, (1ªedição), pp. 131-141, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
62. Sprecher, C.J; McLaren, R.S; Rabbach, D.R; Ensenberger, M.G; Fulmer, P.M; Krenke, B.E; Corona, C, Scurria, M.A; Good, T.D; Dwight, S.J; McDougall, M.G; Storts, D.R, (2009), “The PowerPlex[®] ESX and ESI Systems: Meeting the new European standart”, Profiles in DNA, 12 (2).
63. Technical Manual- “PowerPlex[®] ESI17 System”, (2011), Promega Corporation.
64. Tereba A (1999) Tools for analysis of population statistics. Profile in DNA 14-16. Free software distributed by the authors at website <http://www.promega.com/geneticidtools/>.
65. Tucker, V, Hopwood, A, Sprecher, C, McLaren, R, Rabbach, D, Ensenberger, M, Thompson, J, Storts, D, (2011), “Developmental validation of the PowerPlex[®] ESI16 and PowerPlex[®] ESI17 Systems: STR multiplexes for the new European standart”, Forensic Science International: Genetics, 5, pp. 436-448.
66. Tucker, V, Hopwood, A, Sprecher, C, McLaren, R, Rabbach, D, Ensenberger, M, Thompson, J, Storts, D, (2012), “Developmental validation of the

- PowerPlex[®] ESX16 and PowerPlex[®] ESX17 Systems”, *Forensic Science International: Genetics*, 6, pp. 124-131.
- 67.** Tucker, V, Kirkham, A, Hopwood, A, (2012), “Forensic validation of the PowerPlex[®] ESI 16 STR Multiplex and comparison of performance with AmpFISTR[®] SGM Plus[®]”, *Int. J. Legal Med.*, 126, pp.345-356.
- 68.** Vidal, P,M, (2005), “Estatística prática para as Ciências da Saúde”, pp.101-115, Lidel, Lisboa, Portugal.
- 69.** Vieira Silva C, Matos S, Afonso Costa H, Morais P, Marques Santos R, Espinheira R, Costa Santos, J e Amorim, A., (2013), “Genetic Portrait of caucasian south portuguese population with DIPplex[®]”, *Forensic Science International: Genetics*. *Forensic Science International: Genetics*, 7, pp. e101-e103.
- 70.** Vieira Silva C, Matos S, Amorim A, Afonso Costa H, Morais P, Marques Santos R, Espinheira R e Costa Santos, J. “Insertion/Deletion polymorphisms in South Portugal Caucasian Population: A preliminary study”, *DNA in Forensics 2012: Exploring the Phylogenies*, 8^o workshop de cromossoma Y e 5^o encontro internacional EMPOP, Innsbruck, 6-8 Setembro 2012.
- 71.** Walsh, PS; Metzger, DA; Higuchi, R, (1991), “Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material”, *Biotechniques*, 10 (4), pp. 506-513.
- 72.** Weber, J; David, D; Heil, J; Fan, Y; Zhao, C; Marth, G, (2002), “Human Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms”, *Am. J. Human Genetics*, 71, pp. 854-862.
- 73.** Whitley, E, Ball, J, (2002), “Statistics review 3: Hypothesis testing and P values”, *Critical Care*, vol.6, n^o3, pp.222-225.
- 74.** Wigginton, E; Cutler, D; Abecasis, G, (2005), “A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium”, *Am.J.Hum.Genet.*, 76, pp.887-893.

Capítulo 7 (Anexos)

Anexo 1. Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à comparação com o método desenvolvido. Neste ensaio as amostras foram preparadas com o volume total de 25 µl (recomendado pelo fabricante) e com o volume total de 12,5 µl.

	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl
D3S1358	14-16	14-16	15-17	15-17	15-17	15-17	15	15	16-17	16-17
D19S433	12-14	12-14	14	14	13-14.2	13-14.2	12-16.2	12-16.2	12-14	12-14
D2S1338	16-17	16-17	17	17	17-20	17-20	19-26	19-26	20-23	20-23
D22S1045	15-16	15-16	11-16	?	11-17	11-17	17	17	15-17	15-17
D16S539	8-11	8-11	9-13	9-13	10-11	10-11	9-11	9-11	11-13	11-13
D18S51	12	12	14	14	13-17	13-17	17	17	15-20	15-20
D1S1656	12-15	12-15	16	16	12-16	12-16	15-16.3	15-16.3	12-17.3	12-17.3
D10S1248	13-14	13-14	14-15	?	14	14	13-14	13-14	13-15	13-15
D2S441	8-11.3	8-11.3	10-11.3	?	10-11	10-11	13-14	13-14	10	10
TH01	8-9	8-9	3-7	?	6	6	8	8	6-7	6-7
vWA	16-17	16-17	16-18	?	14-20	14-20	14-16	14-16	16-19	16-19
D21S11	30-31	30-31	30-31	?	29-32.2	29-32.2	28-30	?-?	28-31.2	28-31.2
D12S391	20-22	20-22	18-23	?	18-23	18-23	17-20	?-20	18-19	18-19
D8S1179	10-12	10-12	14-16	14-16	13-16	13-16	13-15	13-15	13-14	13-14
FGA	22-26	22-26	22-24	22-24	21-26	21-26	23-24	23-24	23-24	23-24
SE33	26.2-30.2	26.2-30.2	14-15	?	19-23.2	19-23.2	18-32.2	18-32.2	16-25.2	16-25.2
Amelogenina	X-Y	X-Y	X-Y	?	X	X	X-Y	X-Y	X	X

Anexo 1 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex[®] ESI 17 no que diz respeito à comparação com o método desenvolvido. Neste ensaio as amostras foram preparadas com o volume total de 25 µl (recomendado pelo fabricante) e com o volume total de 12,5 µl.

	Amostra 6		Amostra 7		Amostra 8		Amostra 9	
	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl	12,5µl	25µl
D3S1358	15-16	15-16	14-15	14-15	16-17	16-17	14-17	14-17
D19S433	14-15	14-15	14	14	13	13	13-14	13-14
D2S1338	22-23	22-23	16-24	16-24	20	20	20-24	20-24
D22S1045	16-17	16-17	11	11	15-16	15-16	11-16	11-16
D16S539	11-13	5-11-13	9-13	9-13	11-13	11-13	11-13	11-13
D18S51	17-20	17-20	16-20	16-20	13-19	13-19	13-20	13-20
D1S1656	12	12	13-14	13-14	14-17.3	14-17.3	13-17.3	13-17.3
D10S1248	12-15	12-15	14	14	14-16	14-16	14	14
D2S441	10-12	10-12	11-12	11-12	11-14	11-14	11-12	11-12
TH01	6	6	6-9.3	6-9.3	6-9	6-9	6-9	6-9
vWA	14-19	14-19	16-17	16-17	14	14	14-17	14-17
D21S11	29-31.2	29-31.2	30-31	30-31	30	30	30	30
D12S391	17-19	17-19	21-23	21-23	17.3-22	17.3-22	21-22	21-22
D8S1179	13	13	13-15	13-15	12-13	12-13	12-13	12-13
FGA	23-26	23-26	19-22	19-22	22-23	22-23	22-23	22-23
SE33	15-16	15-16	17-26.2	17-26.2	19-29.2	19-29.2	17-19	17-19
Amelogenina	X	X	X-Y	X-Y	X	X	X	X

Anexo 2. Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito aos seus limiares analíticos. As amostras foram diluídas de 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Amostra 1				Amostra 2				Amostra 3			
Conc. (ng/µl)	0,34	0,03	0,01	ind.	0,27	0,03	0,02	0,002	0,31	0,06	0,02	0,01
Diluição	1:2	1:10	1:50	1:100	1:2	1:10	1:50	1:100	1:2	1:10	1:50	1:100
D3S1358	15-17	15-17	15-?	?-?	15-16	15-16	?-16	?-16	15-16	15-16	15-?	?-16
D19S433	13-14	13-?	13-?	?-?	13-14	13-14	13-?	13-?	13-14	13-14	13-?	?-14
D2S1338	16-24	16-24	?-24	?-?	17-24	17-24	17-24	?-?	16-24	16-24	16-24	16-?
D22S1045	11-16	11-16	?-?	?-?	15-16	15-16	?-16	15-?	16	16	16	16
D16S539	9-12	9-12	?-?	?-?	12	12	12	12	12	12	12	12
D18S51	15-17	15-17	?-17	?-?	14-15	14-15	?-15	14-15	15	15	15	15
D1S1656	13-14	13-14	13-14	13-?	15	15	15	15	14-15	14-15	14-?	14-15
D10S1248	14-17	14-17	14-17	?-17	13-14	13-14	13-14	13-14	13-17	13-17	13-?	?-?
D2S441	11-14	11-14	?-?	11-14	12-14	12-14	?-?	?-?	11-12	11-12	11-12	?-?
TH01	6-7	6-7	6-?	?-?	9-9.3	9-9.3	9-?	?-?	7-9	7-9	7-9	?-?
vWA	16-17	16-17	?-?	?-?	16-18	16-18	?-18	16-?	16	16	16	?-?
D21S11	28-31	28-31	28-?	?-?	28-31	28-31	?-31	?-?	28	28	28	?-?
D12S391	21-22	21-22	21-?	?-?	20.3-22	20.3-22	?-?	20.3-22	20.3	20.3	20.3	?-?
D8S1179	12-13	12-13	?-13	?-?	13-16	13-16	13-16	13-?	12-13	12-13	12-13	?-?
FGA	21-26	21-26	21-26	21-?	19-22	19-22	19-22	?-22	19-26	19-26	19-26	?-26
SE33	16-20.2	16-20.2	?-20.2	16-20.2	19.2-28.2	19.2-28.2	?-28.2	?-?	16-28.2	16-28.2	16-28.2	?-?
Amelogenina	X-Y	X-Y	X-?	?-?	X	X	X	X	X	X	X	?

Anexo 2 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito aos seus limiares analíticos. As amostras foram diluídas de 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

Conc. (ng/µl) Diluição	Amostra 4				Amostra 5			
	0,455 1:2	0,04 1:10	0,01 1:50	0,002 1:100	1,31 1:2	0,26 1:10	0,05 1:50	0,026 1:100
D3S1358	14-16	?-?	?-?	?-?	15-18	15-18	15-?	?-18
D19S433	14-16	?-18	14-?	?-?	13-15	13-15	?-?	?-15
D2S1338	17	?-?	?-?	?-?	18-24	18-24	?-24	?-?
D22S1045	15	?	15	?-?	15-17	15-17	?-?	15-17
D16S539	12-15	?-?	12-15	?-?	10-11	10-11	10-11	10-11
D18S51	13-15	22-25	13-15	?-?	14-18	14-18	?-18	?-18
D1S1656	13-17	?-17	?-17	?-?	13-18.3	13-18.3	?-?	?-18.3
D10S1248	13	?-?	13	?-?	15-16	15-16	15-16	?-16
D2S441	11-14	?-?	11-14	?-?	11-13	11-13	?-13	11-?
TH01	9-9.3	9-?	9-9.3	?-?	7-9	7-9	7-?	?-?
vWA	14-16	?-?	14-?	?-?	17-18	17-18	?-?	?-?
D21S11	31.2-32.2	29.2-32	?-32.2	?-?	30-30.2	30-30.2	?-?	?-?
D12S391	16-21	25-26	16-?	?-?	18-19	18-19	?-19	?-?
D8S1179	14-16	11-12-14-15	?-16	?-16	12	12	12	12
FGA	24	?-?	24	?-?	20-23	20-23	20-?	20-?
SE33	26.2-28.2	?-?	26.2-?	?-?	25.2-28.2	25.2-28.2	?-?	?-28.2
Amelogenina	X-Y	?-?	X-Y	?-?	X	X	X	X

Anexo 3. Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Contaminante 1	Contaminante 2
D3S1358	15	15	17	15-18	16	15-17	15-16	14-16
D19S433	14	15	14	14	13-15	13-14	13-14	12-15
D2S1338	18-20	17-23	20-25	18-19	16-23	16-24	17-24	17-21
D22S1045	15-16	12-15	11-15	15	15	11-16	15-16	15-17
D16S539	11-13	10-11	9-11	11	12	9-12	12	10-12
D18S51	16-19	13-17	14-16	11-18	17	15-17	14-15	11-17
D1S1656	15-16	14-16.3	15-15.3	11-15	12-16	13-14	15	15-16
D10S1248	13-15	13-14	13-16	16	13-15	14-17	13-14	14-15
D2S441	10-14	14	11-11.3	10-11	11-14	11-14	12-14	10-14
TH01	9-9.3	7	6-9.3	6	7-9	6-7	9-9.3	7-9.3
vWA	15-16	15-20	15-17	14-16	16	16-17	16-18	17-18
D21S11	29-32.2	29-31.2	25.2-28	28-29	30-31.2	28-31	28-31	30.2-32.2
D12S391	18-19	18-23	17.3-20	17-18	18-19	21-22	20.3-22	23
D8S1179	13	14	14	12-13	13-14	12-13	13-16	11-14
FGA	23-24	22-22.2	19-23	22	23-26	21-26	19-22	23-24
SE33	26.2-	20.2-24.2	16-27.2	17-18	18-28.2	16-20.2	19.2-28.2	21.2-22.2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y	X	X-Y	X	X-Y

Anexo 3 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Mistura de 1:9					
	A1:C1	A2:C1	A3:C1	A4:C2	A5:C2	A6:C2
D3S1358	15-16	15-16	15-16-17	14-15-16-18	14-15-16	14-15-16-17
D19S433	13-14	13-14-15	13-14	12-14-15	12-13-15	12-13-14-15
D2S1338	17-24	17-23-24	17-20-24-25	17-18-19-21	17-21	16-17-21-24
D22S1045	15-16	12-15-16	11-15-16	15-17	15-17	11-15-16-17
D16S539	11-12-13	10-11-12	9-11-12	10-11-12	10-11-12	9-10-12
D18S51	14-15-16-19	13-14-15-17	14-15	11-17-18	11-17	11-15-17
D1S1656	15-16-17.3	14-15-16.3	15-15.3	11-15-16	12-15-16	13-14-15-16
D10S1248	13-14	13-14	13-14-16	14-15-16	13-14-15	14-15-17
D2S441	12-14	12-14	11-12-14	10-11-14	10-11-14	10-11-13-14
TH01	9-9.3	7-9-9.3	6-9-9.3	6-7-9.3	7-9.3	7-9.3
vWA	16-18	15-16-18-20	15-16-17-18	14-16-17-18	15.2-16-17-18	16-17-18
D21S11	28-29-31-34	28-29-31-31.2	25.2-28-31	28-29-30.2-32.2	30.2-31.2-32.2	28-30.2-31-32.2
D12S391	18-19-20.3-22	18-20.3-22-23	17.3-20-20.3-22	17-18-23	17.1-18.1-19-OL	21-22-23
D8S1179	13-15-16	13-14-16	13-14-16	11-12-13-14	10-11-13-14	11-12-13-14
FGA	19-22-23	19-22-22.2	19-22-23	22-23-24	22-23-24-26	21-23-24-26
SE33	19.2-26.2-28.2	19.2-20.2-24.2-28.2	16-19.2-27.2-28.2	17-18-21.2-22.2	18-21.2-22.2-28.2	16-20.2-21.2-22.2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y	X-Y	X-Y

	Mistura de 1:1					
	A1:C1	A2:C1	A3:C1	A4:C2	A5:C2	A6:C2
D3S1358	15-16	15-16	15-16-17	14-15-16-18	14-16	14-15-16-17
D19S433	13-14	13-14-15	13-14	12-14-15	12-13-15	12-13-14-15
D2S1338	17-18-20-24	17-23-24	17-20-24-25	17-18-19-21	16-17-21-23	16-17-21-24
D22S1045	15-16	12-15-16	11-15-16	15-17	15-17	11-15-16-17
D16S539	11-12-13	10-11-12	9-11-12	10-11-12	10-12	9-10-12
D18S51	14-15-16-19	13-14-15-17	14-15-16	11-17-18	11-17	11-15-17
D1S1656	15-16	14-15-16.3	15-15.3	11-15-16	12-15-16	13-14-15-16
D10S1248	13-14-15	13-14	13-14-16	14-15-16	13-14-15	14-15-17
D2S441	10-12-14	12-14	11-12-14	10-11-14	10-11-14	10-11-14
TH01	9-9.3	7-9-9.3	6-9-9.3	6-7-9.3	7-9-9.3	6-7-9.3
vWA	15-16-18	15-16-18-20	15-16-17-18	14-16-17-18	16-17-18	16-17-18
D21S11	28-29-31-32.2	28-29-31-31.2	25.2-28-31	28-29-30.2-32.2	30-30.2-31.2-32.2	28-30.2-31-32.2
D12S391	18-19-20.3-22	18-20.3-22-23	17.3-20-20.3-22	17-18-23	19-23	21-22
D8S1179	13-16	13-14-16	13-14-16	11-12-13-14	11-13-14	11-12-13-14
FGA	19-22-23-24	19-22-22.2	19-22-23	22-23-24	23-24-26	21-23-24-26
SE33	19.2-26.2-28.2-29.2	19.2-20.2-24.2-28.2	16-19.2-27.2-28.2	17-18-21.2-22.2	18-21.2-22.2-28.2	16-20.2-21.2-22.2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y	X-Y	X-Y

Anexo 3 (cont.). Resultados do teste de validação do método PowerPlex® ESI 17 no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Mistura de 9:1					
	A1:C1	A2:C1	A3:C1	A4:C2	A5:C2	A6:C2
D3S1358	15-16	15-16	15-16-17	14-15-16-18	14-16	14-15-16-17
D19S433	13-14	13-14-15	13-14	12-14-15	12-13-15	12-13-14-15
D2S1338	17-18-20-24	17-23	17-20-24-25	17-18-19-21	16-17-21-23	16-21-24
D22S1045	15-16	12-15	11-15-16	15	15-17	11-15-16-17
D16S539	11-12-13	10-11-12	9-11-12	10-11-12	10-12	9-10-12
D18S51	14-15-16-19	13-14-15-17	14-15-16	11-17-18	11-17	11-15-17
D1S1656	15-16	14-15-16.3	15-15.3	11-15-16	12-15-16	13-14-15-16
D10S1248	13-14-15	13-14	13-14-16	14-15-16	13-14-15	14-15-17
D2S441	10-12-14	12-14	11-11.3-14	10-11-14	10-11-14	10-11-14
TH01	9-9.3	7-9-9.3	6-9-9.3	6-7-9.3	7-9-9.3	6-7-9.3
vWA	15-16-18	15-16-18-20	15-16-17-18	14-16-17-18	16-17-18	16-17-18
D21S11	28-29-31-32.2	28-29-31-31.2	25.2-28-31	28-29-30.2-32.2	30-30.2-31.2-32.2	28-30.2-31-32.2
D12S391	18-19-20.3-22	18-20.3-22-23	17.3-20-20.3-22	17-18-23	18-19-23	21-22-23
D8S1179	13-16	13-14-16	13-14-16	11-12-13-14	11-13-14	11-12-13-14
FGA	19-22-23-24	22-22.2	19-22-23	22-23-24	23-24-26	21-23-24-26
SE33	19.2-26.2-28.2-29.2	19.2-20.2-24.2-28.2	16-19.2-27.2-28.2	17-18-21.2-22.2	18-21.2-22.2-28.2	16-20.2-21.2-22.2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y	X-Y	X-Y

Anexo 4. Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito aos seus limiares analíticos. As amostras foram diluídas de 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Amostra 1				Amostra 2				Amostra 3			
Conc. (ng/µl) Diluição	0,3 4	0,0 7	0,0 1	0,00 6	0,2 7	0,0 5	0,0 1	0,00 5	0,3 1	0,0 6	0,0 1	0,00 6
	1:2	1:1 0	1:5 0	1:10 0	1:2	1:1 0	1:5 0	1:10 0	1:2	1:1 0	1:5 0	1:10 0
Amelogenina	X-?	X- Y	X-?	?	X	X	X	?	X-?	X-?	?	X-?
HLD77	D	D	D	D	I-D	I-D	?-D	?	D	D	D	D
HLD45	I-D	I-D	I-?	?-D	I	I	I	?	I-D	I-D	?	?
HLD131	?-D	I-D	D	?	I	I	I	?	I	I	?	?
HLD70	I-D	I-D	I-?	I-?	I-D	I-D	?-D	?	I	I	?	?
HLD6	D	D	D	D	I-D	I-D	?-D	I-D	D	D	D	D
HLD111	?	I-D	?	?	D	D	?	?	D	D	?	?
HLD58	?	I-D	?	?	?-D	?	?	?	?-D	?	?	?
HLD56	I	I	I	?	I-D	I-D	?	?	I	I	?	?
HLD118	D	D	?	?	I-D	I-D	?	?	D	D	?	?
HLD92	D	D	D	D	I-D	I-D	?	?	I-D	I-D	?	?-D
HLD93	I-?	?-D	?	?	?	I	?	?	?	D	?	?
HLD99	?	I-D	I-?	?	I	I	I	I	I	I	I	I
HLD88	I-D	I-D	?-D	?	I-D	I-D	?	?	I	I	?	?
HLD101	D	D	D	?	I-D	I-D	?	?	I-D	I-D	?	?-D
HLD67	I-?	I-D	?	I-?	I	I	?	?	I-?	I-?	?	?
HLD83	I-D	I-D	I-D	I-?	D	D	D	?	D	D	D	D
HLD114	I-D	I-D	I-D	I-?	D	D	?	D	I-D	I-D	I-?	I-?
HLD48	I-?	I-D	?	?	I-D	I-D	?-D	?	D	D	D	D
HLD124	D	D	D	?	I-D	I-D	I-?	?-D	I-D	I-D	I-D	I-?
HLD122	I	I	I	?	D	D	?	D	I-D	I-D	?	?
HLD125	D	D	D	D	I-D	I-D	I-D	I-?	I-D	I-D	I-D	I-?
HLD64	I	I	?	?	D	D	?	?	I-D	I-D	?	?
HLD81	I-D	I-D	I-D	I-?	D	D	D	?	D	D	D	D
HLD136	D	D	?	?	I	I	I	?	I-D	I-D	?	?
HLD133	I	I	I	?	I-D	I-D	?	?-D	I-D	I-D	?	?
HLD97	D	D	D	D	D	D	D	?	D	D	D	D
HLD40	I	I	I	?	I-D	I-D	?	?	I-D	I-D	?	?
HLD128	I-D	I-D	I-?	?	I-D	I-D	I-?	?	I-D	I-D	?	?-D
HLD39	I	I	I	?	I-D	I-D	?	?	I-D	I-D	I-?	?
HLD84	I-D	I-D	?	?	I-D	I-D	?-D	?	D	D	?	D

Anexo 4 (Cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito aos seus limiares analíticos. As amostras foram diluídas de 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Amostra 4				Amostra 5			
Conc. (ng/µl) Diluição	0,92	0,18	0,04	0,018	1,31	0,26	0,05	0,026
	1:2	1:10	1:50	1:100	1:2	1:10	1:50	1:100
Amelogenina	X	X	X	?	X	X	X	?
HLD77	D	D	D	D	D	D	D	D
HLD45	I-?	I-D	I-?	?	?	I	I	?
HLD131	D	D	?	D	?	D	D	?
HLD70	I-?	I-D	?	?	I-D	I-D	?	?
HLD6	D	D	D	D	D	D	D	D
HLD111	I	I	I	I	?	D	D	?
HLD58	?	I	?	?	?	D	?	?
HLD56	I	I	I	?	?	I-D	?	?
HLD118	I-D	I-D	I-D	I-?	I	I	I	I
HLD92	I-D	I-D	?	?	I	I	I	?
HLD93	?	D	?	?	?-D	I-D	?	?
HLD99	I-D	I-?	I-?	I-?	?	I-D	I-D	I-?
HLD88	D	D	D	D	?	I-D	I-D	?-D
HLD101	I-D	I-D	I-D	I-D	?	I-D	?-D	I-?
HLD67	?-D	I-D	?	?	?	I-D	I-D	?
HLD83	I	I	I	I	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD114	I-D	I-D	I-D	I-D	D	D	D	D
HLD48	I-D	I-D	I-?	?	?	D	D	?
HLD124	I	I	I	I	I	I	I	I
HLD122	D	D	D	D	I-D	I-D	I-D	?
HLD125	D	D	D	D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD64	I-D	I-D	I-?	I-?	?	D	D	?
HLD81	D	D	D	D	?	D	D	?
HLD136	D	D	D	D	I-D	I-D	I-D	?-D
HLD133	I-D	I-D	I-?	I-D	D	D	D	D
HLD97	D	D	D	D	I	I	I	I
HLD40	D	D	D	D	D	D	D	D
HLD128	I	I	I	?	I-D	I-D	I-D	?-D
HLD39	D	D	D	D	I	I	I	I
HLD84	I	I	I	I	I-D	I-D	I-D	I-?

Anexo 5. Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y
HLD77	I-D	D	I-D	I
HLD45	I	D	I-D	I-D
HLD131	I	I	I-D	I-D
HLD70	I-D	I-D	I	I-D
HLD6	I	I-D	D	D
HLD111	I-D	I-D	I-D	I
HLD58	I-D	I	I-D	I-D
HLD56	I-D	I	D	I-D
HLD118	D	I-D	I-D	D
HLD92	D	I	I-D	I-D
HLD93	I-D	I-D	D	I-D
HLD99	I-D	I-D	I	I-D
HLD88	I	I-D	D	I-D
HLD101	I-D	I-D	I	I
HLD67	I-D	I	I	I-D
HLD83	I-D	I	I	I
HLD114	I-D	I	I-D	D
HLD48	D	I	I	I-D
HLD124	I	I	I-D	I-D
HLD122	I-D	D	I-D	D
HLD125	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD64	I	D	I-D	I-D
HLD81	I	D	I-D	I-D
HLD136	I	I-D	I-D	I
HLD133	I	D	I-D	I
HLD97	I-D	I-D	D	I
HLD40	I-D	I	I	I
HLD128	D	D	D	D
HLD39	I-D	D	I-D	D
HLD84	I	I	I	I-D

Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Amostra 5	Amostra 6	Contaminante 1	Contaminante 2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y
HLD77	I-D	D	I-D	I
HLD45	D	I-D	I	I
HLD131	I-D	I-D	I	I-D
HLD70	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD6	D	D	I-D	D
HLD111	I	I-D	D	I
HLD58	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD56	I-D	I	I-D	I
HLD118	I	D	I-D	I-D
HLD92	I	D	I-D	D
HLD93	I	I-D	I-D	I-D
HLD99	I	I-D	I	I-D
HLD88	I-D	I-D	I-D	D
HLD101	I-D	D	I-D	I-D
HLD67	I	I-D	I	I-D
HLD83	I-D	I-D	D	D
HLD114	I-D	I-D	D	D
HLD48	I-D	I-D	I-D	D
HLD124	I-D	D	I-D	I-D
HLD122	D	I	D	I
HLD125	D	D	I-D	D
HLD64	I	I	D	I
HLD81	D	I-D	D	I-D
HLD136	I	D	I	I
HLD133	I	I	I-D	I
HLD97	D	D	D	I
HLD40	D	I	I-D	I-D
HLD128	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD39	I-D	I	I-D	I
HLD84	I-D	I-D	I-D	I

Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

	Mistura na proporção de 1:1 (1µl de amostra para 1µl de contaminante)					
	A1+C1	A2+C1	A3+C1	A4+C2	A5+C2	A6+C2
Amelogenina	X-Y	X-Y	X	X-Y	X-Y	X-Y
HLD77	I-D	I-D	I-D	I	I-D	I-D
HLD45	I	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD131	I	I	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD70	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD6	I-D	I-D	I-D	D	D	D
HLD111	I-D	I-D	I-D	I	I	I-D
HLD58	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD56	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I
HLD118	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD92	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD93	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD99	I-D	I-D	I	I-D	I-D	I-D
HLD88	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD101	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD67	I-D	I	I	I-D	I-D	I-D
HLD83	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD114	I-D	I-D	I-D	D	I-D	I-D
HLD48	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD124	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I
HLD122	I-D	D	I-D	I-D	I-D	I
HLD125	I-D	I-D	I-D	I-D	D	D
HLD64	I-D	D	I-D	I-D	I	I
HLD81	I-D	D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD136	I	I-D	I-D	I	I	I-D
HLD133	I-D	I-D	I-D	I	I	I
HLD97	I-D	I-D	D	I	I-D	I-D
HLD40	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	D
HLD128	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD39	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I
HLD84	I-D	I-D	I-D	I	I-D	I-D

Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

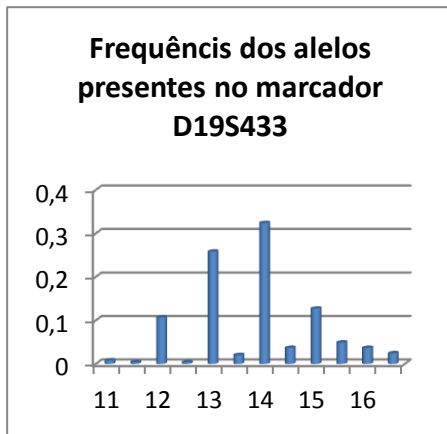
	Mistura na proporção de 1:9 (1µl de amostra para 9µl de contaminante)					
	A1+C1	A2+C1	A3+C1	A4+C2	A5+C2	A6+C2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y	X-Y	X-Y
HLD77	I-D	I-D	I-D	I	I-D	I-D
HLD45	I	I-D	I	I-D	I-D	I-D
HLD131	I	I	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD70	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD6	I-D	I-D	I-D	D	D	D
HLD111	I-D	I-D	I-D	I	I	I-D
HLD58	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD56	I-D	I-D	I-D	I-D	I	I
HLD118	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD92	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	D
HLD93	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD99	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD88	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD101	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD67	I-D	I	I	I-D	I-D	I-D
HLD83	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD114	I-D	I-D	I-D	I	I-D	I-D
HLD48	I-D	I-D	I-D	D	D	I-D
HLD124	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD122	I-D	D	I-D	I-D	I-D	I
HLD125	I-D	I-D	I-D	I-D	D	D
HLD64	I-D	D	I-D	I-D	I	I
HLD81	I-D	D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD136	I	I	I	I	I	I-D
HLD133	I-D	D	I-D	I	I	I
HLD97	I-D	I-D	D	I	I-D	I-D
HLD40	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD128	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD39	I-D	I-D	I-D	I-D	I	I
HLD84	I-D	I-D	I-D	I	I-D	I-D

Anexo 5 (cont.). Resultados do teste de validação do método Investigator DIPplex® no que diz respeito à contaminação do método. As amostras foram misturadas nas proporções de 1:1, 1:9 e 9:1 e a PCR foi desenvolvida com o volume total de 12,5µl.

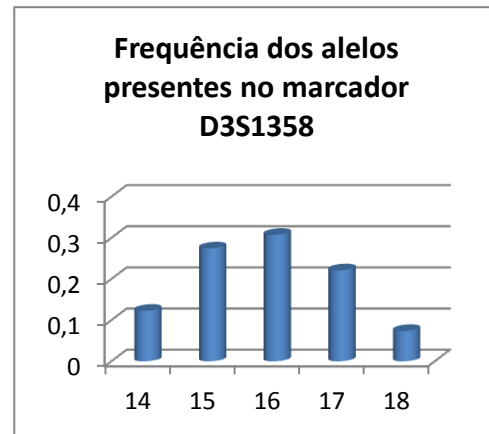
	Mistura na proporção de 9:1 (9µl de amostra para 1µl de contaminante)					
	A1+C1	A2+C1	A3+C1	A4+C2	A5+C2	A6+C2
Amelogenina	X	X-Y	X	X-Y	X-Y	X-Y
HLD77	I-D	I-D	I-D	I	I-D	I-D
HLD45	I	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD131	I	I	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD70	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD6	I-D	I-D	I-D	D	D	D
HLD111	I-D	I-D	I-D	I	I	I-D
HLD58	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD56	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I
HLD118	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD92	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	D
HLD93	I-D	I-D	D	I-D	I-D	I-D
HLD99	I-D	I-D	I	I-D	I-D	I-D
HLD88	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD101	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD67	I-D	I	I	I-D	I-D	I-D
HLD83	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD114	I-D	I-D	I-D	D	I-D	I-D
HLD48	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD124	I	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD122	I-D	D	I-D	I-D	I-D	I
HLD125	I-D	I-D	I-D	I-D	D	D
HLD64	I-D	D	I-D	I-D	I	I
HLD81	I-D	D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD136	I	I-D	I-D	I	I	I
HLD133	I-D	I-D	I-D	I	I	I
HLD97	I-D	I-D	D	I	I-D	I-D
HLD40	I-D	I-D	I-D	I-D	D	I
HLD128	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D
HLD39	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I
HLD84	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D	I-D

Anexo 6. Representação gráfica das frequências relativas observadas nos marcadores kit PowerPlex® ESI17 (Promega).

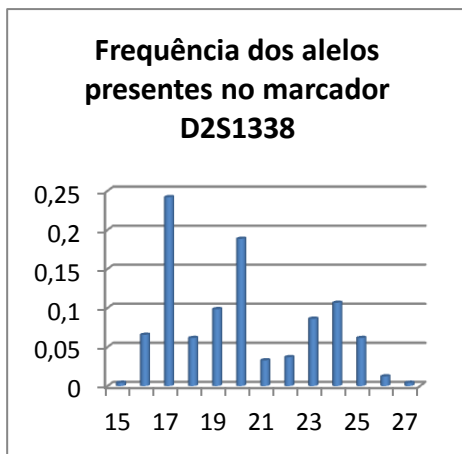
a)



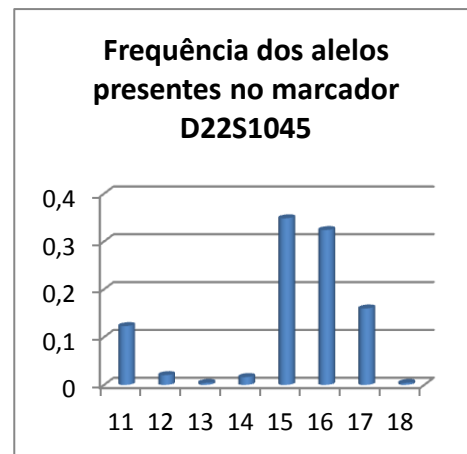
b)



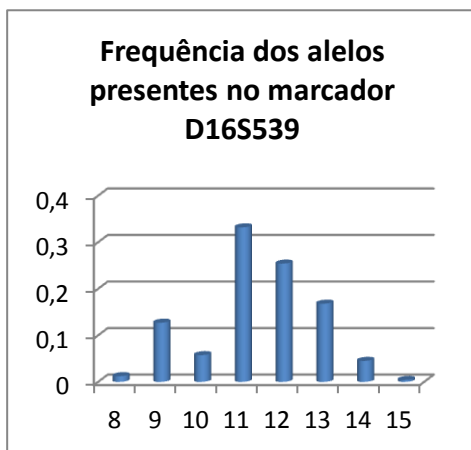
c)



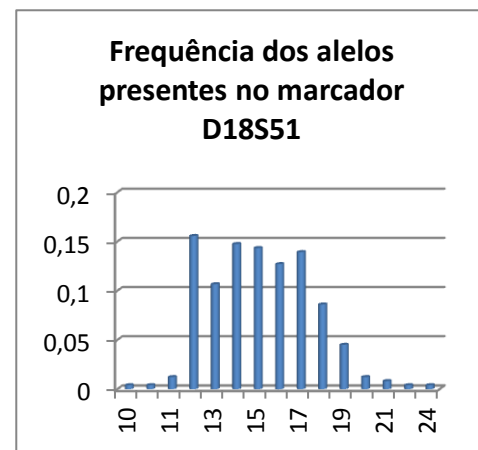
d)



e)

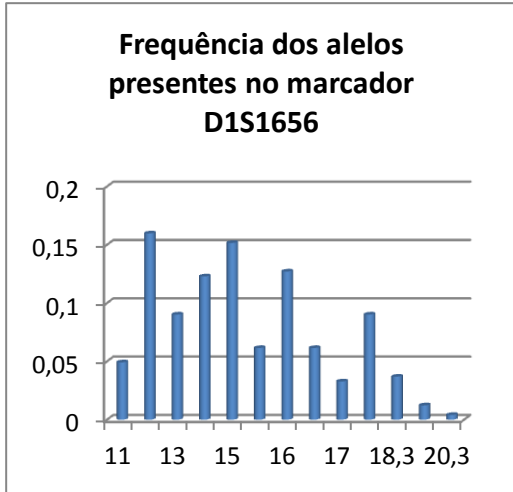


f)

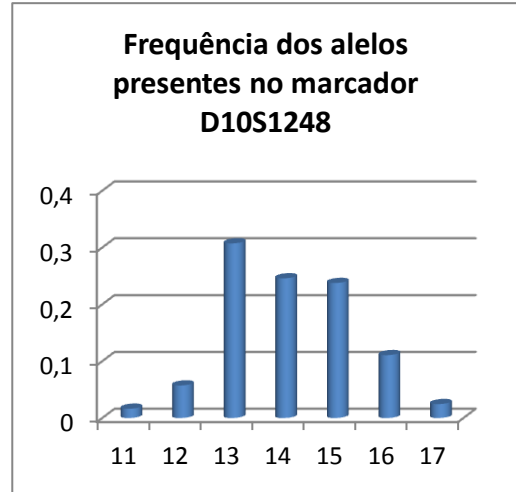


Anexo 6 (Cont.). Representação gráfica das frequências relativas observadas nos marcadores kit PowerPlex® ESI17 (Promega).

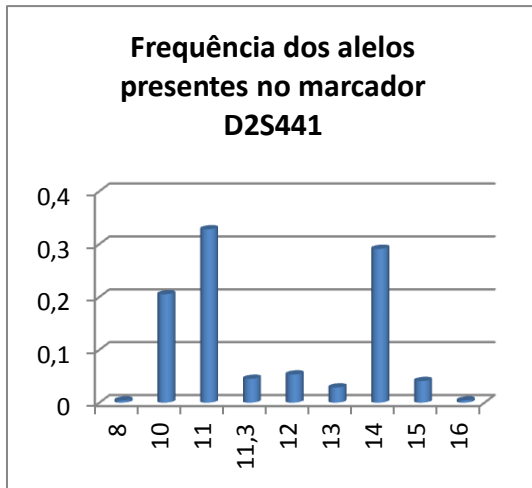
g)



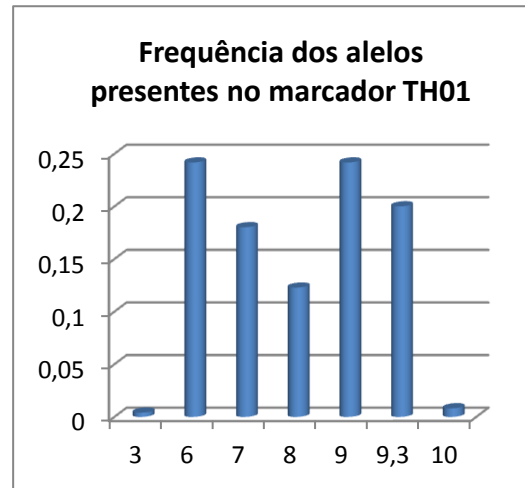
h)



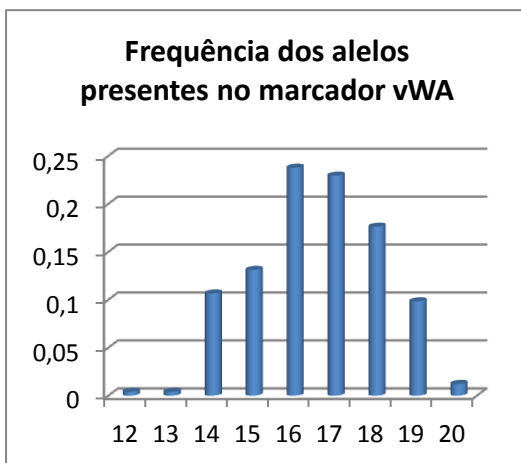
i)



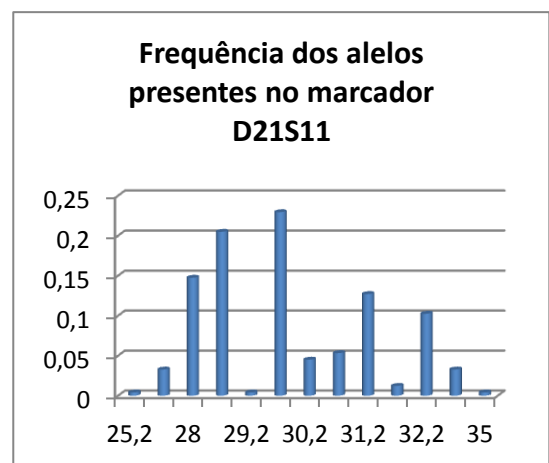
j)



k)

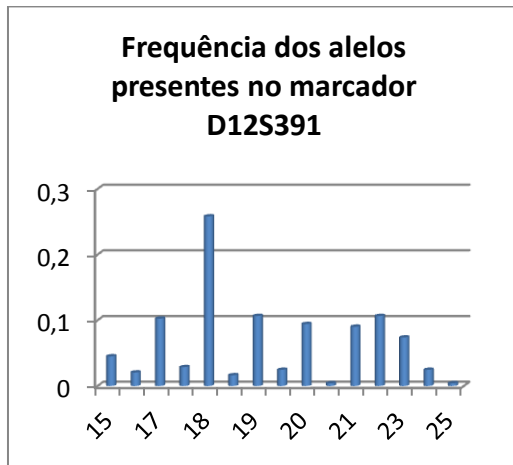


l)

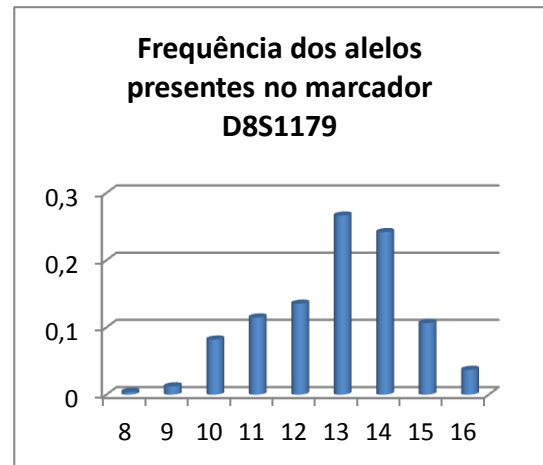


Anexo 6 (Cont.). Representação gráfica das frequências relativas observadas nos marcadores kit PowerPlex® ESI17 (Promega).

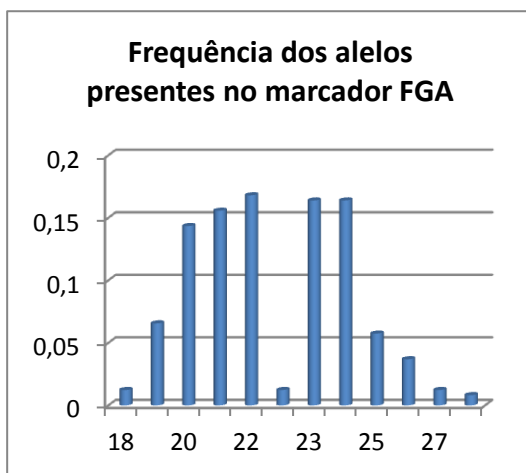
m)



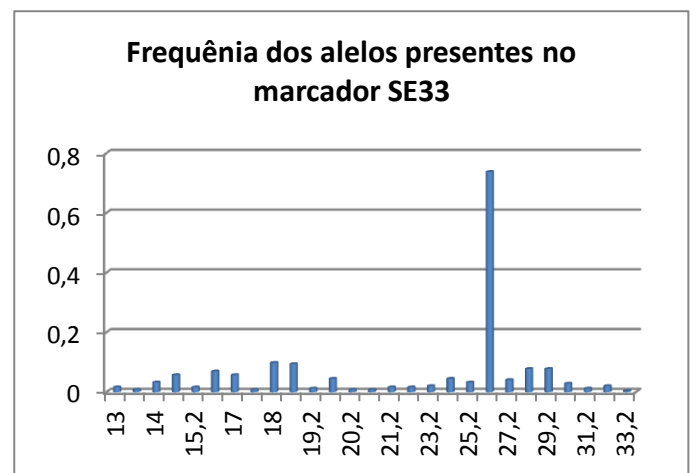
n)



o)



p)



Anexo 7. Frequências alélicas obtidas aquando da análise com o software Arlequin v3.5 dos marcadores do tipo STR do kit PowerPlex® ESI17 (Promega).

Alelo	D3S1358	D19S433	D2S1338	D22S1045	D16S539	D18S51	D1S1656	D10S1248	D2S441	TH01	vWA	D21S11	D12S391	D8S1179	FGA	SE33
3										0,00 3968						
6										0,26 5873						
7										0,17 4603						
8					0,01 5823					0,15 4762				0,00 3165		
9					0,11 7089					0,26 5873				0,01 2658		
9,3										0,12 6984						
10				0,003 165	0,05 6962	0,00 6329			0,21 6216	0,00 7937				0,08 2278		
10,2						0,00 6329										
11		0,00 7299		0,117 089	0,32 2785	0,01 2658	0,05 5085	0,012 658	0,35 473					0,09 8101		
11,2		0,00 365														
11,3									0,00 6757							
12		0,12 4088		0,028 481	0,27 5316	0,13 9241	0,17 3729	0,053 797	0,06 7568		0,00 3165			0,13 2911		
13		0,28 8321		0,006 329	0,16 7722	0,10 443	0,08 8983	0,313 291	0,03 3784		0,00 3165			0,26 5823		0,01 5957
13,2		0,02 1898														0,00 5319
14	0,13 6076	0,33 2117		0,012 658	0,04 1139	0,15 5063	0,14 4068	0,259 494	0,27 7027		0,11 0759			0,26 2658		0,04 2553
14,2		0,01 0949														
15	0,27 2152	0,13 1387	0,00 6329	0,354 43	0,00 3165	0,14 557	0,19 0678	0,224 684	0,03 7162		0,12 6582		0,04 8276	0,10 443		0,05 8511
15,2		0,03 6496														0,00 5319
15,3							0,04 661									
16	0,30 0633	0,04 3796	0,06 6456	0,319 62		0,11 7089	0,16 5254	0,107 595	0,00 6757		0,22 7848		0,02 4138	0,03 481		0,09 5745
16,3							0,02 1186									
17	0,22 4684		0,24 3671	0,155 063		0,13 6076	0,03 3898	0,028 481			0,24 6835		0,09 6552			0,07 4468
17,3							0,05 9322						0,01 7241			
18	0,06 6456		0,06 0127	0,003 165		0,09 8101					0,17 4051		0,26 8966	0,00 3165	0,01 2739	0,11 7021
18,3							0,01 2712						0,00 6897			
19			0,09 4937			0,05 0633					0,08 8608		0,11 7241		0,07 0064	0,11 1702
19,2																0,00 5319
19,3							0,00 8475						0,01 3793			
20			0,19 9367			0,01 2658					0,01 8987		0,08 2759		0,14 0127	0,04 2553
20,2																0,01 0638

Anexo 8. Frequências alélicas obtidas aquando da análise com o software Arlequin v3.5 dos marcadores do tipo InDel do kit Investigator DIPlex® (Quiagen).

	Deleção	Inserção
HLD77	0,5542	0,4458
HLD45	0,4583	0,5417
HLD131	0,4375	0,5625
HLD70	0,4208	0,5792
HLD6	0,5375	0,4625
HLD111	0,4667	0,5333
HLD58	0,55	0,45
HLD56	0,275	0,725
HLD118	0,6083	0,3917
HLD92	0,55	0,45
HLD93	0,525	0,475
HLD99	0,425	0,575
HLD88	0,4792	0,5208
HLD101	0,525	0,475
HLD67	0,375	0,625
HLD83	0,475	0,525
HLD114	0,55	0,45
HLD48	0,3917	0,6083
HLD124	0,4333	0,5667
HLD122	0,6333	0,3667
HLD125	0,4875	0,5125
HLD64	0,4333	0,5667
HLD81	0,5792	0,4208
HLD136	0,45	0,55
HLD133	0,4792	0,5208
HLD97	0,5294	0,4706
HLD40	0,4917	0,5083
HLD128	0,5708	0,4292

