



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



CAMILA REIS GUIMARÃES BALEEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM FLUXO DE VALIDAÇÃO INTERNA DE MÉTODOS
DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES AUTOSSÔMICOS PARA APLICAÇÃO
EM LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE.**

Recife
2021

CAMILA REIS GUIMARÃES BALEEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM FLUXO DE VALIDAÇÃO INTERNA DE MÉTODOS
DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES AUTOSSÔMICOS PARA APLICAÇÃO
EM LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

Área de Concentração: Sistemas Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Baleeiro, Camila Reis Guimarães

Desenvolvimento de um fluxo de validação interna de métodos de genotipagem de marcadores autossômicos para aplicação em laboratórios de genética forense / Camila Reis Guimarães Baleeiro. – 2021.

73 f. : il.

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências apêndices.

1. Genética forense. 2 Criminalística. 3. Controle de qualidade. I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador). II. Título.

599.935

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-125

CAMILA REIS GUIMARÃES BALEEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM FLUXO DE VALIDAÇÃO INTERNA DE MÉTODOS
DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES AUTOSSÔMICOS PARA APLICAÇÃO
EM LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rodrigo Moura Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Ronaldo Carneiro da Silva Junior
Polícia Federal – DF

Dedico este trabalho a todos que desejem dar os primeiros passos no processo de validação interna em seus laboratórios. Que este trabalho possa servir de orientação e partilha.

AGRADECIMENTOS

Durante o caminho trilhado até a conclusão do Mestrado, foram várias as fases que passei, e as ajudas que recebi foram muitas e fundamentais. Dentro de todo o processo não posso deixar de agradecer a Carlos Souza, um ser humano incrível e exemplo de liderança. O Prof. Valdir foi um orientador extremamente disponível e presente, e por isso serei para sempre grata e uma grande admiradora. No início dos experimentos, era um sem-fim de dúvidas, e por isso agradeço a Pedro Esmeraldo, Paulo Raimann e Marcelo Malaghini pela paciência e partilha de conhecimentos. No momento de escrever, nada me inspirava, e por isso eu agradeço a Kamila, meu oposto complementar. No momento que tudo deu errado, Nanda estava lá pra ouvir. No momento que precisei da ajuda dos colegas, a equipe do IGFEF foi incrível comigo. Keyla andou comigo por todo o caminho, partilhando as dificuldades. A todos vocês eu agradeço de Coração.

Mas como eu acredito que nada nesta vida é por acaso, e que o meu processo de aprendizado nesse mestrado contribuiu de várias formas para o meu crescimento pessoal, eu agradeço imensamente aos meus pais, avós, família e ancestrais que permitiram que eu concluísse essa fase. Agradeço às pessoas que me inspiram e me ensinam, e, em especial a Jayme. Ele é meu companheiro, meu amigo, e é com ele que eu divido tudo sobre mim. Hoje sou somente gratidão.

O teste de DNA é para a justiça o que o telescópio é para as estrelas; não é uma lição de bioquímica; não é uma demonstração das maravilhas de uma lente de aumento, mas sim uma forma de ver as coisas como elas realmente são.

Barry Scheck e Peter Neufeld - *Actual Innocence*

RESUMO

A Genética Forense é uma área da Criminalística amplamente regulada por normas de qualidade, tendo em vista a necessária robustez das provas por ela fornecidas. Entre os parâmetros de qualidade que devem ser seguidos por laboratórios de Genética Forense em todo o mundo, a validação interna dos métodos por ele utilizados é um procedimento essencial para atestar a validade dos resultados emitidos. O SWGDAM é um grupo composto de cientistas que representam os Laboratórios Forenses dos Estados Unidos e Canadá, e suas publicações são utilizadas como referência na área em todo o mundo. O grupo publicou um guia de referência para a condução do estudo de validação interna em laboratórios de Genética Forense e nele estão descritos quais os ensaios que devem ser realizados para que os principais parâmetros de análise sejam contemplados. Apesar disso, ainda não se dispõe de publicações de referência que reúnam as metodologias que poderão ser adotadas para a condução de cada um dos ensaios descritos, bem como que apresente as principais diferenças entre elas. Esse trabalho visa apresentar e discutir os métodos e procedimentos necessários para que laboratórios de genética forense possam realizar a Validação Interna de kits de amplificação e genotipagem de STRs autossômicos utilizados na rotina de processamento de amostras para análise de DNA.

Palavras-chave: Sequências repetidas em tandem (STRs); Genética Forense; Validação interna; Controle de qualidade; Ciências Forenses

ABSTRACT

Forensic Genetics is an area of Criminalistics largely regulated by Quality Standards, due to the necessary robustness of the evidence provided by it. Within the quality parameters that must be followed by Forensic Genetics Laboratories around the world, the Internal Validation of the methods used by them is an essential procedure to attest their efficacy and reliability in use for forensic casework and/or database analysis. The SWGDAM is a group of scientists representing the Forensic Laboratories of the United States and Canada, and their publications are used as a reference in the field throughout the world. The Group published a Reference Guide for conducting the Internal Validation Study in Forensic Genetics Laboratories, which describes the assays that must be carried out so that the main analysis parameters are considered. Despite this, there are still no reference publications that bring together the methodologies that can be adopted for conducting each of the described tests, as well as presenting the main differences between them. This work aims to present and discuss the methods and procedures necessary for forensic genetics laboratories to carry out the Internal Validation of autosomal STRs amplification and genotyping kits used in casework samples processing for DNA analysis.

Keywords: Short tandem repeat sequence (STRs). Forensic Genetics. Internal Validation. Quality control. Forensic science.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Média da Altura dos alelos detectados para cada ponto de concentração de DNA para as amostras CP (azul) em comparação com as Amostras de Referência (AR) JJ e PL (laranja).	40
Gráfico 2	Percentual de Alelos presentes nas amostras CP (azul), JJ (vermelho) e PL (verde), nos menores pontos de concentração de DNA.	40
Gráfico 3	Limiar Analítico calculado para as amostras CP (azul), JJ (vermelho) e PL (verde), em cada um dos canais de fluorescência do eletroferograma.	43
Gráfico 4	Média das alturas dos alelos por concentração de DNA.	46
Gráfico 5	Percentual de Alelos presentes nas amostras CP (azul), JJ (vermelho) e PL (verde), em cada ponto de concentração de DNA.	46
Figura 1	Mapa de Calor (Heat Map) nas concentrações de 0,0315, 0,0625 e 0,125 ng/μL de DNA para a amostra CP, evidenciando as regiões em que ambos os alelos foram detectados (em verde), nas quais houve a perda de um dos alelos (amarelo) e de ambos os alelos (vermelho). Em preto encontra-se destacado o marcador D3S1358, no qual verificou-se diferenças expressivas entre as replicatas na concentração de 0,0315 ng/μL.	47
Gráfico 6	PHR calculado por faixa de altura dos alelos (RFU).	48
Gráfico 7	Razão entre o tamanho do <i>stutter</i> em relação ao tamanho do seu alelo corresponde em função da altura do pico em RFU para a amostra JJ.	50
Gráfico 8	Quantidade de alelos com a presença de <i>stutter</i> detectados nas amostras CP e JJ em cada ponto de concentração de DNA (1; 0,5; 0,250; 0,125 e 0,0625).	51
Gráfico 9	Média da variação em % das alturas detectadas nas	53

	concentrações de 0,5 (azul) e 1,0 (verde) ng/ μ L.	
Figura 2	Designação alélica e <i>size calling</i> (tamanho dos fragmentos em pares de bases) observados a partir da análise de três <i>ladders</i> , evidenciando-se os dados obtidos para o alelo 9 do STR D3S1359.	54
Figura 3	Fragmento do perfil da doadora feminina (EV), do perfil de mistura (JJXEV 1:20) e do perfil do doador masculino (JJ). No perfil genético de mistura é possível verificar a presença de alelos de ambos os doadores.	56
Figura 4	Fragmento do perfil da doadora feminina (PA), do perfil de mistura (PLXPA 1:20) e do perfil do doador masculino (PL). No perfil genético de mistura as setas vermelhas evidenciam as regiões onde os alelos masculinos não foram amplificados.	56
Figura 5	Pico detectado na amostra CN 18.1 no alelo 12 do STR CSF1PO.	58
Figura 6	Fluxograma de Processamento Laboratorial dos ensaios sugeridos para a condução do Estudo de Validação Interna para <i>kits</i> de amplificação e genotipagem de STRs autossômicos.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados obtidos a partir da quantificação das Amostras de Referência JJ e PL, bem como da amostra do Controle Positivo CP.	41
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
DICLA	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ou ácido desoxirribonucléico
DOQ	Documento Orientativo da Qualidade
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
HLA	Antígenos leucocitários humanos
ILAC	<i>International Laboratory Accreditation Cooperation</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Standards Organization</i>
SWGDM	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, ou <i>Scientific Working Group on DNA Analysis Methods</i>
TWGDAM	<i>Technical Working Group on DNA Analysis Methods</i> , ou Grupo Técnico de Trabalho em Métodos de Análise de DNA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICOS	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	A GENÉTICA FORENSE: HISTÓRICO E TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA	17
3.2	O CRESCIMENTO DA GENÉTICA FORENSE NA INVESTIGAÇÃO CRIMINAL E A NECESSIDADE DE NORMATIZAÇÃO	22
3.3	IMPLANTAÇÃO DO BANCO DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS E DO SISTEMA DE GESTÃO DE QUALIDADE NOS LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE BRASILEIROS	24
3.4	A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E AS NORMAS DE GESTÃO DE QUALIDADE APLICÁVEIS À GENÉTICA FORENSE	27
3.5	VALIDAÇÃO INTERNA	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
	ARTIGO: DESENVOLVIMENTO DE UM FLUXO DE VALIDAÇÃO INTERNA DE MÉTODOS DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES AUTOSSÔMICOS PARA APLICAÇÃO EM LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE	33
5	CONCLUSÕES	65
6	SÚMULA CURRICULAR	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – DADOS DE QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ENSAIO DE MISTURAS	73

1 INTRODUÇÃO

A Genética Forense é uma área da Criminalística amplamente regulada por normas de qualidade, tendo em vista a necessária robustez das provas por ela fornecidas. Nesta perspectiva, a validação interna se apresenta como uma ferramenta essencial ao controle de qualidade, já que é através dela que é possível demonstrar que o laboratório emite resultados válidos e confiáveis. Sua importância decorre do fato de que a análise genética presume o estabelecimento de parâmetros e limites objetivos, que deverão ser aplicados quando da interpretação de eletroferogramas, por exemplo. A realização do estudo de validação interna possibilita que um laboratório de genética forense conheça suas limitações, bem como a faixa de trabalho na qual ele poderá emitir resultados consistentes e reprodutíveis.

As orientações básicas para a condução da validação interna estão contidas em documentos de recomendação emitidos por grupos de trabalho da área forense, tal como o SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*, ou Grupo Científico de Trabalho em Métodos de Análise de DNA), atualmente utilizados como referência. O grupo produziu, em 2016, um documento intitulado *Validation Guidelines for DNA Analysis Methods* (ou Diretrizes de Validação para Métodos de Análise de DNA) que instrui sobre a importância dos estudos de validação e dos ensaios que deverão compor a validação interna. Contudo, os laboratórios de genética forense brasileiros ainda não contam atualmente com uma metodologia padronizada para sua realização.

O presente trabalho tem por objetivo apresentar e discutir as metodologias encontradas nas publicações da área, correlacionando-as com os resultados obtidos a partir da validação interna do *kit PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega Corporation) para amplificação e genotipagem de STRs autossômicos, a fim de auxiliar no estabelecimento de uma metodologia de referência a ser utilizada pelos laboratórios de genética forense nacionais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Apresentar e discutir as metodologias que poderão ser utilizadas para a condução dos estudos propostos pelo SWGDAM, a fim de auxiliar no estabelecimento de uma metodologia a ser usada como referência para a condução da validação interna em laboratórios de Genética Forense brasileiros.

2.2 ESPECÍFICOS

- Apresentar os ensaios que devem ser inevitavelmente conduzidos nos estudos de validação interna laboratoriais.
- Apresentar e discutir a metodologia que poderá ser empregada em cada um dos ensaios, relacionando-a com os resultados práticos obtidos.
- Propor um fluxo metodológico otimizado para que laboratórios de Genética Forense possam realizar estudos de validação interna de acordo com critérios de qualidade internacionalmente recomendados.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A GENÉTICA FORENSE: HISTÓRICO E TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA

As Ciências Forenses atuam no processo de geração e/ou transferência de conhecimento científico e tecnológico em cada um dos ramos das ciências naturais, com a finalidade de aplicá-los na análise de vestígios, visando responder questões científicas de interesse da justiça. É assim importante frisar que este ramo da ciência é composto de um grupo de diversas áreas que convergem em um mesmo fim. Não é uma ciência única e visa, em última instância, atender às demandas judiciais. Não se pode falar em uma estrutura ou método específico para as Ciências Forenses, visto que cada campo do conhecimento tem seus próprios métodos (VELHO et al., 2017).

Uma das principais áreas das Ciências Forenses é a Genética Forense, que trata da utilização dos conhecimentos e das técnicas da genética e da biologia molecular no auxílio à justiça. As técnicas de biologia molecular aplicadas à área criminal concentram-se, em grande parte, na realização de análises do DNA para identificação de um indivíduo a partir da análise de vestígios biológicos, como cabelos, manchas de sangue e fluidos corporais, dentre outros itens passíveis de serem recuperados no local do crime. A determinação de identidade genética pelo DNA tem sido usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e restos humanos, determinar paternidade/maternidade com alto grau de confiabilidade, elucidar trocas de recém-nascidos em berçários, bem como conectar crimes distintos através de coincidências genéticas que indicam uma única autoria (BUTLER, 2012).

Do ponto de vista social, a utilização de marcadores de DNA é uma das mais revolucionárias ferramentas para identificação individual. As técnicas de identificação humana tiveram início com análises bioquímicas de amostras encontradas em locais de crime, que se baseavam nos polimorfismos dos sistemas ABO, HLA (antígenos leucocitários humanos) e de outras proteínas séricas, evoluindo, no decorrer do tempo, para análises de polimorfismos de regiões do DNA propriamente dito. Os miniSTRs e os microssatélites (STRs) se mostram bastante indicados para a análise de fragmentos pequenos de DNA, sendo especialmente importantes na análise de

ossos e materiais biológicos degradados (DUMACHE et al., 2016).

Por muito tempo, as proteínas sanguíneas (e.g. tipagem sanguínea, fator RH e tipagem HLA) foram bastante utilizadas na identificação humana, em decorrência da possibilidade de serem encontradas tanto no sangue propriamente dito, como em outros fluidos corporais, a exemplo do sêmen (KOBACHUK, 2012). No entanto, estas proteínas são produtos de expressão gênica; embora sejam sistemas polimórficos e possuam herança mendeliana polialélica, sua variabilidade é relativamente limitada quando comparada àquela verificada nos microssatélites. Assim, durante décadas seu uso se baseou na exclusão de indivíduos e não na identificação propriamente dita. Com o avanço da ciência e tecnologia, em meados dos anos 1980, o foco passou a ser não o produto de transcrição gênica, e sim a estrutura do próprio DNA (THOMPSON, 2012).

O DNA é uma molécula formada por duas cadeias de polinucleotídeos enrolados de forma helicoidal e ligadas transversalmente através de ligações de hidrogênio, que está presente em todas as células nucleadas dos eucariotos, e se encontra arranjado na forma de cromossomos, bem como no interior das mitocôndrias. Está situado no núcleo de todas as células do corpo humano e nunca é igual de uma pessoa para outra, exceção feita aos gêmeos univitelinos, que são geneticamente idênticos (LAKSHMI et al., 2021).

O objetivo primordial da identificação genética é a utilização de marcadores moleculares que diferenciem um indivíduo de outro através da análise conjunta de diversas regiões polimórficas do DNA, conferindo-lhes uma identidade estatisticamente válida, dentro de uma população de referência. Em julho de 1985, Alec Jeffreys, docente da Universidade de Leicester (Inglaterra), descreveu certas regiões do DNA denominadas de minissatélites, que poderiam potencialmente identificar um indivíduo pessoa com quase 100% de certeza (JEFFREYS et al., 1985a). Foi neste trabalho que se empregou, pela primeira vez, o termo *DNA Fingerprinting* [impressões digitais do DNA] (JEFFREYS et al., 1985a). Em outubro daquele mesmo ano, a tipagem molecular de material genético foi utilizada oficialmente pela primeira vez na resolução de um problema de imigração (JEFFREYS et al., 1985b).

O período que sucedeu as descobertas e publicações de Jeffreys (década de

1990) é considerado a “era de ouro” das pesquisas sobre tipagem de DNA. Esse período é caracterizado pelo acúmulo de publicações e da realização de eventos sobre o assunto, demonstrando o crescente aumento do interesse da comunidade científica por esta área do conhecimento (ROEWER, 2013). As análises de marcadores moleculares se popularizaram no meio acadêmico, resultando na publicação de trabalhos como o de WOLFF et al. (1991), que trata das características únicas do DNA e de como essas características poderiam ser utilizadas para individualizar os sujeitos assim como as impressões digitais.

Brown (2001) apresenta a seguinte definição para as técnicas de *DNA Fingerprint*: “*Estas técnicas são conhecidas como impressão digital genética (genetic fingerprinting), embora o termo mais preciso e utilizado para designá-las seja bandas de DNA. O perfil de DNA se baseia no fato de que gêmeos idênticos são os únicos indivíduos que possuem cópias idênticas do genoma humano, mas este, em indivíduos diferentes, contém muitos polimorfismos, que são posições onde a sequência de nucleotídeos difere em cada membro da população*”.

Com o avanço dos estudos na área, as impressões digitais de múltiplos *loci* foram logo substituídas por ensaios mais específicos capazes de detectar alterações de *locus* único com padrões simplificados e que eram mais fáceis de se interpretar (PARSON, 2018). Para ser considerado polimórfico, o alelo raro de um determinado *locus* deve estar presente em mais de 1% dos indivíduos da população (MOREIRA, 2015). Assim, com esta grande variação no número e nos tipos de variações, fica possível identificar uma pessoa com base no seu padrão de polimorfismos.

As aplicações da biologia molecular para a investigação de crimes têm evoluído ao longo dos últimos 30 anos, a partir das investigações acerca da estrutura e função do DNA, em particular a de sequências não codificantes. Na espécie humana, a composição genética de cada indivíduo resulta da contribuição de 50% do genoma materno e 50% do paterno. Inicialmente se pensava que indivíduos distintos possuíam em torno de 99,9% de sequências idênticas em seu DNA; estudos mais aprofundados, contudo, descreveram diversos tipos de variações que podem ser detectadas, desde variações estruturais a variações em número de cópias de uma sequência conhecida, chegando-se à conclusão que essa similaridade pode ter sido superestimada (FEUK et al., 2006). São as informações presentes nas regiões hipervariáveis e não

codificantes, que a Genética Forense utiliza para identificar indivíduos, ou seja: é nestas regiões que estão presentes as sequências nucleotídicas utilizadas como marcadores moleculares para a identificação humana.

É denominada de minissatélite, ou repetições em tandem de número variável (VNTR, do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*), a região que apresentar temas de repetição de sete a 49 pares de bases (bp). Se o tema de repetição apresentar de um a seis pares de bases, a região é chamada de microssatélite ou regiões curtas repetidas em tandem (*Short Tandem Repeats* - STR). As regiões STRs são as mais utilizadas não só na área de genética de populações, mas também na área forense, por apresentarem diversas características desejáveis, a saber: codominância; abundância no genoma humano; elevado grau de polimorfismo decorrente das altas taxas de mutações verificadas nessas regiões, o que se reflete em uma grande variação entre os indivíduos, sendo as STRs relatadas como responsáveis por 10 a 15% das variantes detectadas na expressão gênica, com padrão de hereditariedade cis (LAPPALAINEN et al., 2019).

Os microssatélites estão distribuídos de forma bastante homogênea no DNA, em aproximadamente 700.000 *loci* diferentes no genoma humano (WILLEMS et al., 2014). Estes *loci* gênicos são muito abundantes e cada um deles possui um número de alelos maior do que aquele geralmente encontrado nas VNTRs, tornando-os, portanto, bastante indicados para identificação humana. Atualmente, as investigações genéticas populacionais baseadas em análises de perfis de *loci* STRs têm sido amplamente empregadas, as quais permitem até mesmo o uso de amostras degradadas e/ou contendo pequenas quantidades de DNA (HILL, et al., 2008; HOLLAND et al., 2013).

Pode ser feita uma analogia entre o sistema de identificação com STRs e o sistema de endereçamento postal, no qual há milhares de indivíduos com o mesmo CEP, algumas centenas com o mesmo endereço de rua, poucos com o mesmo número do edifício, alguns com o mesmo número do apartamento, mas apenas um com o nome e sobrenome correspondentes a este endereço. Da mesma maneira, analisa-se a variabilidade de diversos *loci* de STRs: alguns podem ser semelhantes entre dois indivíduos, mas jamais todos, com exceção de gêmeos univitelinos. Dessa forma, é possível, por exemplo, correlacionar amostras de DNA presentes em cenas

de crime com as de indiciados, ou montar genealogias genéticas (BUTTLER, 2005).

Quando a análise de STRs se torna difícil ou impossível devido à quantidade ou qualidade do DNA que foi recuperado, há a opção de se fazer o exame a partir do DNA mitocondrial (mtDNA), tendo em vista que o fato de haver milhares de cópias do mtDNA em uma célula em comparação às duas cópias do DNA nuclear, confere à técnica uma maior sensibilidade, auxiliando na análise de materiais degradados. Outra vantagem é que, por ter um padrão de herança materna, a ferramenta permite a análise de vínculos de parentesco através da comparação com parentes maternos distantes, principalmente quando o doador original da amostra não está disponível, o que confere uma importância ainda maior à esta técnica (HOLLAND et al., 2013). Este método de análise consiste no sequenciamento de determinadas regiões do DNA mitocondrial, que variam de uma pessoa para outra, sendo que recebemos esse marcador de nossas mães e temos identidade, portanto, com nossos irmãos e parentes próximos pela linhagem materna (JOBIM et al. 2006).

Outra possibilidade metodológica para estudos forenses é a análise do cromossomo Y, muito útil em casos em que há um excesso de DNA de vítima do sexo feminino e pequenas quantidades de DNA masculino. Por exemplo, em casos que incluem agressão sexual sem ejaculação, agressão sexual por um homem vasectomizado, DNA masculino sob as unhas de uma vítima, DNA masculino sobre a pele (no toque), e roupas ou pertences de uma vítima do sexo feminino (ROEWER, 2013). A utilização forense de marcadores do cromossomo Y (Y-STR) aumentou consideravelmente nos últimos anos. Além de serem importantes em casos de violência sexual, também podem ser muito úteis em análises de parentesco, devido ao rigoroso padrão de herança paterna (GETTINGS, 2014).

Na década de 1980, Jeffreys sugeriu que todos os indivíduos poderiam ser identificados através de um padrão exclusivo de DNA (JEFFREYS et al., 1985a). No início, houve muita dúvida sobre o uso da sua descoberta na área forense, por se tratar de uma técnica inovadora mesmo na área da biologia molecular e genética. Oficialmente, o DNA foi usado pela primeira vez para resolver um problema de imigração; um jovem ganês, que morava com a família na Inglaterra, fez uma viagem para seu país de origem e, quando regressou ao Reino Unido, teve sua entrada negada sob a acusação de documentação falsificada. Foi então que o governo

solicitou que Jeffreys fizesse uso de sua recente descoberta para solucionar o caso. Através do exame de DNA, ficou comprovado que a família biológica do rapaz residia mesmo na Inglaterra, possibilitando assim sua entrada (JEFFREYS et al., 1985a).

Em 1988, a técnica desenvolvida por Jeffreys foi usada oficialmente na área forense para investigar uma série de crimes ocorridos no ano de 1986, envolvendo o estupro e homicídio de duas adolescentes na cidade de Leicester, Inglaterra. O caso foi solucionado com a determinação da autoria do delito após toda a população masculina de dois vilarejos do condado de Leicester ter contribuído com a doação de amostras de sangue para confronto com vestígios de sêmen coletados do corpo das vítimas. Este foi o primeiro caso solucionado com o uso da técnica descrito em literatura (JOBBLING, 2013).

A partir de então, o DNA passou a ser usado na investigação de crimes variados, sendo responsável pela descoberta e condenação de inúmeros criminosos e no estudo de vínculos genéticos (MORETI, 2009). O potencial de variabilidade individual do DNA eleva-o ao “padrão ouro” entre as técnicas de identificação humana. A resistência ao tempo e ao calor, o fato de ser encontrado em vários tipos de materiais biológicos e o advento da amplificação de DNA *in vitro* por meio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) reforçam a importância do DNA para as investigações criminais (GUIMARÃES et al., 2009).

3.2 O CRESCIMENTO DO USO DA GENÉTICA FORENSE NA INVESTIGAÇÃO CRIMINAL E A NECESSIDADE DE NORMATIZAÇÃO.

A aplicação da tecnologia do DNA em investigações forenses cresceu rapidamente e a necessidade de normas, padronização, controle de qualidade e de cuidados na coleta e preservação das amostras biológicas, para a adequada utilização da tipagem de DNA se mostrou extremamente necessária para que a comunidade forense pudesse usar de maneira confiável essa notável tecnologia para o interesse da justiça (SCHNEIDER, 2007).

O reconhecimento da necessidade da adoção de critérios e normas de tipagem de DNA dentro da comunidade forense nos Estados Unidos resultou na formação de um grupo nacional de cientistas forenses no ano de 1988, chamado TWGDAM (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*, ou Grupo Técnico de Trabalho

em Métodos de Análise de DNA), renomeado para SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*, ou Grupo Científico de Trabalho em Métodos de Análise de DNA) em janeiro de 1999. Esse grupo publicou uma série de normas para a tipagem de DNA forense (*Guidelines for Quality Assurance Program for DNA Analysis*, ou Diretrizes para Programa de Garantia de Qualidade na Análise de DNA), incluindo o roteiro de 1991 (TWGDAM, 1991), posteriormente revisado e republicado em 1995 (TWGDAM, 1995). As diretrizes TWGDAM/SWGDAM contêm seções que se aplicam aos laboratórios que realizam testes de DNA e a fabricantes de kits de análise de DNA, de instrumentação e de softwares para esta área, sendo amplamente utilizadas até hoje.

Embora nenhuma autoridade legal formal tenha sido concedida ao TWGDAM e SWGDAM, quando o congresso americano autorizou a Lei de Identificação pelo DNA (*DNA Identification Act* – <https://www.congress.gov/bill/103rd-congress/house-bill/829>), em 1994, afirmou-se à época que as diretrizes emitidas pelo TWGDAM seriam consideradas padrões nacionais, até que o escritório dos diretores do FBI (Federal Bureau of Investigation Standards, ou traduzir) emitiu seu próprio roteiro com base na recomendação do Conselho Consultivo de DNA (*DNA Advisory Board - DAB*) (CORMIER et al., 2005).

Utilizando como base as orientações da TWGDAM, foi implementado, em outubro de 1998, o roteiro nacional de testes de DNA forense em laboratórios públicos, também conhecido como padrões FBI ou padrões nacionais, com a finalidade de servir como norma de referência para obtenção de certificação/credenciamento na análise do material genético (USDOJ, 1998). Esses padrões incluem programas de testes de DNA internos, visando à segurança na qualidade, organização e administração, instalações de pessoal, controles das amostras (evidências), validação dos métodos do laboratório, procedimentos analíticos, calibração de equipamentos e manutenção de dados, testes de proficiência, ações corretivas, balanços e padrões dos fornecedores (CROUSE, 2001). O Conselho Consultivo de DNA do FBI foi dissolvido no final de 2000, ficando com o SWGDAM a responsabilidade de recomendar revisões ou acréscimos às diretrizes emitidas pelo FBI (CORMIER et. al., 2005).

O FBI se tornou desde então referência no desenvolvimento de tecnologias para genotipagem de DNA para uso na identificação de criminosos. O sistema de Índice de

DNA Combinado (CODIS, do inglês *Combined DNA Index System*) criado pelo FBI, que começou como um projeto piloto em 1990 e ganhou força em 1994, deu ao FBI a autoridade de estabelecer um banco de dados em nível nacional para fins de investigação criminal (PENA, 2005). Foram selecionados 13 *loci* de STRs que iriam constituir esse registro com o intuito de comparar os perfis genéticos obtidos de suspeitos com os cadastrados no banco e identificação de criminosos a partir de outros crimes (HARES, 2011).

3.3 IMPLANTAÇÃO DO BANCO DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS E DO SISTEMA DE GESTÃO DE QUALIDADE NOS LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE BRASILEIROS

Com o avanço das técnicas de genética forense e o aumento do número de perfis genéticos gerados a partir das amostras criminais, surgiu uma nova ferramenta: os bancos de dados de DNA. A partir da implantação desta ferramenta, os perfis genéticos obtidos de vestígios das vítimas e dos locais de crime, podem ser confrontados a qualquer tempo com perfis de criminosos condenados, mesmo que por outro tipo de crime e em qualquer estado da federação, aumentando bastante a possibilidade de identificação do agressor. Também é possível fazer o cruzamento de dados com perfis de vestígios obtidos de outras vítimas e de outros locais de crime, estabelecendo a relação entre diversos crimes cometidos pelo mesmo indivíduo (JACQUES & MINERVINO, 2007). O FBI disponibiliza gratuitamente este programa aos governos dos países interessados em utilizá-lo na área de segurança pública. Além dos aproximadamente 200 laboratórios de DNA a utilizarem o CODIS nos EUA, mais de 106 laboratórios também o utilizam em outros 58 países (GROSSWEILER, 2021 > disponível em <https://www.ishinews.com/events/codis-and-ndis-update-4/>).

Como parte da Lei de Identificação de DNA (*DNA Identification Act*), todos os laboratórios de DNA que são operados pelo governo federal, que recebem fundos federais ou que empregam software preparado para o CODIS, são obrigados a demonstrar conformidade com os padrões emitidos pelo FBI. Uma série de fatores determina a necessidade da avaliação contínua e evolução da garantia de qualidade e diretrizes de validação para ajudar os laboratórios criminais a cumprir as normas federais americanas para integrar o CODIS e usar novas tecnologias de análise de DNA de forma eficaz (DNA ADVISORY BOARD, 2008).

Em julho de 2004, o FBI emitiu um documento padronizado para realização das auditorias realizadas aos níveis local, estadual e federal (disponível em: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/pdfs/seubert.pdf>) para garantir que os auditores de laboratórios de DNA sigam os padrões de qualidade de forma consistente. A conformidade com os padrões federais estabelecidos e o processo de acreditação dos laboratórios estão inter-relacionados, tendo em vista que para que se cumpram os padrões de qualidade, um laboratório deve buscar ativamente a acreditação; e para ser acreditado, um laboratório deve demonstrar conformidade com os padrões de garantia de qualidade.

O Brasil iniciou a implantação do CODIS a partir de 2009, após ser ministrado um curso de formação que contou com a participação de Peritos Criminais das unidades que possuíam ou estavam em vias de implantar laboratórios forenses de DNA. Neste ano, o FBI e a Polícia Federal brasileira firmaram a *Letter of Agreement*, estabelecendo um convênio entre as instituições e, ainda em 2009, durante a identificação de vítimas do acidente aéreo com o voo AF 447 (Rio de Janeiro-Paris), os Peritos Criminais do Departamento da Polícia Federal fizeram uso do CODIS para comparações entre perfis genéticos de corpos de identidade desconhecida e dos familiares em busca de seus parentes (GARRIDO e RODRIGUES, 2014).

Apesar dos bancos de perfis genéticos para persecução penal estarem bem estabelecidos há cerca de vinte anos nos EUA, no Brasil, somente após a promulgação da Lei No 12.654/2012, que alterou dispositivos da lei de identificação criminal e de execução penal, passando a admitir ou mesmo prevendo a coleta obrigatória e armazenamento de perfis genéticos em bancos de dados para identificação criminal, no caso dos condenados por crimes hediondos, conforme disposto na Lei 8.072 de 25 de julho de 1990 (ANSELMO e JACQUES, 2012). A proposta introduzida pelo diploma legal se assemelha ao modelo criado e utilizado pelos Estados Unidos.

O Decreto nº 7.950, de 12 de março de 2013, instituiu o Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG) e a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG), que tem como objetivo permitir o compartilhamento e a comparação de perfis genéticos constantes dos bancos de perfis genéticos da União, dos Estados e do Distrito Federal, e veio para regulamentar a Lei nº 12.654, que em seu Art. 9º § 1º determinava

que a identificação do perfil genético seria armazenada em banco de dados sigiloso, conforme regulamento a ser expedido pelo poder executivo (BRASIL, 2012).

De acordo com o § 3º do art. 1º, o Art. 5º e o Art. 9º do referido Decreto, os laboratórios integrantes da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG) deverão estar comprometidos com os esforços para a implantação de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) para a área forense, sendo submetidos periodicamente a auditorias promovidas pelo Ministério da Justiça a fim de atestar esse cumprimento. Neste sentido, foi publicada em maio de 2014 a Resolução Nº 5 do Comitê Gestor, recentemente revogada pela Resolução Nº 12 de 2019, que complementou a norma anterior, e que “*dispõe sobre a instituição da Comissão da Qualidade, e os requisitos técnicos para a realização de auditorias nos laboratórios e bancos que compõem a RIBPG*” (Comitê Gestor, 2014).

A Resolução Nº 12/2019 dispõe ainda que esta Comissão da Qualidade deverá ser formada por profissionais com os seguintes atributos: experiência na área de no mínimo cinco anos; experiência em sistemas de gestão da qualidade; conhecimento da norma ABNT NBR ISO 17025:2017; e experiência com realização de auditoria interna e externa de SGQ. Dentro do escopo da norma, estão incluídos parte dos requisitos da ISO 17025:2017, assim como parâmetros de qualidade oriundos das normas seguidas pelo FBI; as auditorias conduzidas pelo Ministério da Justiça buscam avaliar se os laboratórios que compõem a rede cumprem os requisitos mínimos para utilizarem o CODIS no auxílio às investigações criminais.

A validação metodológica é um componente crítico da garantia dos padrões de qualidade para desenvolver e implementar novas tecnologias em tipagem de DNA forense. Em geral, a validação se refere ao processo de se demonstrar que os procedimentos realizados em certo laboratório são robustos, confiáveis e reproduzíveis. Uma vez que o laboratório se mostra competente e os usos forenses dos procedimentos são implementados com sucesso, os testes de proficiência são realizados por analistas qualificados periodicamente, de acordo com as normas e procedimentos internos aplicáveis, para demonstrar a aplicação comprovada da técnica ao longo do tempo (CORMIER et. al., 2005).

3.4 A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E AS NORMAS DE GESTÃO DE QUALIDADE APLICÁVEIS À GENÉTICA FORENSE

Uma organização focada em qualidade promove uma cultura que resulta em comportamentos, atitudes, atividades e processos que agregam valor através da satisfação das necessidades e expectativas dos clientes e de outras partes interessadas. A qualidade dos produtos e serviços de uma organização é determinada pela capacidade de satisfazer os clientes e pelo impacto pretendido e não pretendido nas partes interessadas pertinentes, além do seu valor percebido e o benefício para o cliente (ABNT NBR ISO 9000:2015).

A ISO 9000:2015 é uma norma geral sobre sistemas de gestão de qualidade, que demonstra como o foco na qualidade é um conceito importante quando se fala na emissão de resultados válidos e confiáveis, conceito este intimamente ligado à realidade dos laboratórios de genética forense, tendo em vista que o comprometimento com essa cultura, promove a satisfação da sociedade, que é diretamente beneficiada pelo trabalho realizado nestes órgãos (ABNT NBR ISO 9000:2015).

Existem diversas normas que regulamentam quais os parâmetros e requisitos de qualidade que deverão ser adotados por laboratórios que visam controlar e registrar os procedimentos realizados, visando garantir a qualidade dos resultados por ele emitidos. Atualmente, a ISO 17025 é a principal norma de referência internacional utilizada para a acreditação de laboratórios de ensaios e calibrações em todo o mundo. Ela estabelece quais os requisitos que deverão ser cumpridos para que um laboratório possa obter a acreditação na norma, visando demonstrar que este realiza suas atividades com precisão e confiabilidade, e o seu comprometimento com um sistema de gestão de qualidade bem estabelecido. Em seu item 7.2.2.1 (ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2017) a norma explicita que “O laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório e métodos normalizados utilizados fora de seu escopo pretendido ou modificados de outra forma. A validação deve ser tão abrangente quanto for necessária para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou campo de aplicação”. Vale ressaltar, neste ponto, o conceito de métodos normalizados, que se refere a métodos cuja utilização é mandatória, ou seja, obrigatória (FREITAS et al, 2020).

Atualmente não existe nenhum método normalizado aplicável aos laboratórios de genética forense no Brasil; para efeitos de aplicação da norma 17025, os laboratórios de genética forense trabalham com métodos não normalizados, que podem ser desenvolvidos tanto por empresas especializadas ou universidades, ou ainda pelo próprio laboratório (FREITAS et al, 2020). Independentemente de o laboratório buscar ou não acreditação na ISO 17025, a validação dos métodos por ele utilizados é essencial para que se possa assegurar a validade de seus resultados, demonstrando, para isso, que suas técnicas funcionam conforme esperado, e produzem resultados homogêneos e confiáveis.

Apesar da importância de se observar os requisitos da ISO 17025, a norma não contempla as particularidades da Genética Forense, cujas análises são bem específicas, bem como as implicações legais e jurídicas dos parâmetros de interpretação utilizados na análise dos dados relacionados às amostras criminais. Torna-se necessária, deste modo, a observação e aplicação de outras normas, nacionais e internacionais, para que as competências e especificidades da genética forense possam ser contempladas de maneira mais ampla.

Neste contexto, a Cooperação Internacional de Acreditação de Laboratórios (ILAC), publicou em 2002, o documento ILAC-G19, que trata das orientações específicas para a aplicação da ISO 17025 em laboratórios de análises forenses, documento este que foi traduzido pela DICLA (Divisão de Acreditação de Laboratórios) e publicado pelo INMETRO no documento DOQ-CGCRE-084, intitulado “Tradução Brasileira do Documento ILAC-G19:08/2014 - Módulos de um Processo Forense”. Apesar de se tratar de um documento geral, pois se aplica a qualquer tipo de análise forense, o documento versa sobre a validação de métodos, identificando os tipos de estudos necessários, a depender das atividades específicas da área.

Adicionalmente, o ILAC-G19 reforça a necessidade de validação de métodos e explicita que, no desenvolvimento dos seus processos, a unidade forense deve demonstrar com evidência objetiva, que foram avaliados os fatores que podem influenciar os resultados e manter os respectivos registros. A norma descreve ainda que a interpretação de resultados e achados devem ser baseadas em estudos robustos e procedimentos documentados, o que ratifica a necessidade de realizar estudos de validação de métodos nos laboratórios de genética forense.

Recentemente, a Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO publicou a versão atualizada do documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2011), que visa fornecer orientações sobre validação de métodos analíticos. O documento apresenta os parâmetros mais comumente utilizados no processo de validação, contudo, o laboratório deve definir os parâmetros de validação que melhor evidenciem a adequação do método ao uso pretendido. Para estudos de validação que contemplem análises qualitativas e quantitativas, como é o caso da validação de métodos na genética forense, o documento orienta que devem ser efetuados cálculos que visem estabelecer alguns parâmetros como a seletividade – que consiste basicamente na capacidade de demonstrar resultados específicos dentro de outros possíveis interferentes; a faixa linear de trabalho e sensibilidade – que visa estabelecer quais as faixas de concentração de determinado analito que o sistema é capaz de detectar e analisar com segurança; os Limites de Detecção e Quantificação – que visam avaliar a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada (avaliação qualitativa) e quantificada (avaliação quantitativa) sob as condições estabelecidas para o ensaio, bem como outros parâmetros aplicáveis aos estudos a serem realizados, a depender de seu objetivo.

Constam ainda no DOQ-CGCRE-008 os cálculos estatísticos aplicáveis aos estudos, bem como os pré-requisitos para que os mesmos possam ser utilizados, a depender do caso. Tendo em vista que a genética forense se vale das concentrações de DNA presentes em determinado vestígio encaminhado para análise, e que a determinação desses parâmetros é fundamental para o estabelecimento dos limites que contemplam uma linearidade nos resultados expressos, os parâmetros presentes no referido documento se aplicam às análises genéticas com fins de identificação. Os parâmetros constantes no DOQ-CGCRE-008 apresentam consonância com o descrito nas demais normas aplicáveis à validação de métodos de análise para laboratórios, motivo pelo qual as normas da área se complementam no estabelecimento de conceitos e métodos.

Por fim, está vigente desde 2012 o VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia, publicado pelo INMETRO, que traz a definição dos termos metrológicos utilizados quando da avaliação de parâmetros relacionados à Gestão de Qualidade, e que visam orientar sobre a correta aplicação e interpretação de parte dos conceitos envolvidos nos estudos de validação (INMETRO, 2012).

3.5 VALIDAÇÃO INTERNA

O SWGDAM possui diversas publicações amplamente utilizadas como referência, dentre elas um documento que apresenta as recomendações de revisões dos padrões de garantia de qualidade (QAS) do FBI para análise de DNA. Suas publicações não são consideradas normas, mas sim recomendações e consistem, atualmente, numa referência extremamente relevante dentro da genética forense, sendo seguidas mundialmente. Dentre as recomendações publicadas pelo grupo, ressalta-se o Guia de Validação para Métodos de Análise de DNA Forense (*SWGDAM Validation Guidelines for Forensic DNA Analysis Methods*), que define e exemplifica os tipos de validação de métodos e aborda quais os estudos necessários para cada um deles e cujos conceitos e estudos se assemelham aos constantes no DOQ-CGCRE-008, adicionando a eles os parâmetros mais intimamente ligados às análises de genética forense, tendo em vista tratar-se de documento específico da área.

O grupo define basicamente dois tipos de validação, sendo uma delas a Validação de Desenvolvimento, na qual se objetiva realizar um estudo que possa estabelecer as condições e limitações de novos métodos de análise de DNA para fins forenses, para utilização por quaisquer órgãos ou institutos que os adotem em sua rotina de análise de amostras criminais; e a Validação Interna, que visa estudar o comportamento dos resultados obtidos dentro da realidade de cada laboratório. Este tipo de validação é mais específico, pois leva em consideração aspectos próprios do laboratório como temperatura, equipamentos, e outros aspectos que influenciam o padrão de resultados obtidos, por isso seu objetivo é demonstrar que aquele método funciona conforme o esperado dentro dessas condições (SWGDAM, 2016).

Ainda segundo o referido grupo, o estudo de validação interna deverá contemplar os seguintes parâmetros e/ou ensaios: Utilização de Amostras de fonte conhecida e não probatórias ou amostras simuladas (do inglês, *Known and nonprobative evidence samples or mock evidence samples*); Estudo de Sensibilidade e Efeitos Estocásticos (do inglês, *Sensitivity and Stochastic Studies*); Estudo de Precisão e Exatidão, que inclui ensaios de Repetibilidade e Reprodutibilidade (do inglês, *Precision and accuracy – Repeatability and Reproducibility*); Estudo de Misturas (do inglês, *Mixture studies*); e Avaliação de contaminação (do inglês, *Contamination assessment*), apresentando cada um dos estudos um objetivo distinto, conforme detalhado a seguir.

A amplificação de amostras conhecidas e não probatórias, ou de amostras simuladas, permite que o laboratório forneça evidências de concordância usando um sistema de amplificação. O Estudo de Sensibilidade e Efeitos Estocásticos visa avaliar as variações nas medições em razão da variação na grandeza avaliada, neste caso a concentração de DNA em uma amostra e, segundo o SWGDAM tem por objetivo possibilitar o cálculo da faixa dinâmica e faixa alvo ideal de trabalho, do limite de detecção, do limiar analítico, do equilíbrio entre heterozigotos (por exemplo, razão de altura entre picos), da relação sinal/ruído associado ao ensaio e dos efeitos aleatórios excessivos (estocásticos), geralmente resultantes da baixa quantidade e/ou qualidade do DNA.

O estudo de precisão busca estabelecer relação de concordância entre os valores medidos. A precisão depende apenas da distribuição de erros aleatórios e não se relaciona com o valor verdadeiro; a exatidão, por seu turno, é o grau de conformidade de uma quantidade mensurada com seu valor real ou verdadeiro (INMETRO, 2012; SWGDAM, 2016). O estudo de misturas visa auxiliar o laboratório a estabelecer diretrizes para a interpretação de perfis genéticos com características de mistura, e podem incluir a determinação do número de contribuintes na mistura, a determinação dos perfis de contribuintes principais e secundários e as proporções de cada um dos contribuintes. A avaliação de contaminação visa verificar através da análise de controles negativos, a detecção de DNA exógeno (incluindo alelo *drop-in*) proveniente de reagentes, consumíveis, outras amostras, operador e/ou ambiente laboratorial.

Os estudos supracitados estão intimamente ligados às análises realizadas nos laboratórios de genética forense que precisam frequentemente utilizar parâmetros objetivos e bem estabelecidos nas análises dos perfis genéticos obtidos de vestígios e amostras de referência, a fim de minimizar os riscos de erros nas interpretações de resultados e para garantir uma análise reprodutível tanto pela equipe do laboratório quanto em relação aos demais laboratórios de genética forense do Brasil e do mundo.

Conforme previamente abordado, apesar das fontes bibliográficas da área definirem quais estudos deverão estar presentes na validação interna, elas não definem qual a metodologia que deverá ser adotada na condução de cada um desses estudos. O SWGDAM define ainda que o laboratório deverá avaliar o número e tipo

de amostras que deverão ser utilizadas, bem como decidir se algum dos estudos indicados não é necessário no contexto do estudo que está sendo realizado, contudo, os parâmetros definidos na metodologia deverão demonstrar as limitações e confiabilidade dos dados produzidos a partir dos resultados oriundos de cada um dos ensaios realizados. Por conta disso, as diferentes publicações da área realizam os ensaios de maneiras distintas (BUTLER, 2004).

Atualmente, a validação interna se apresenta como um grande desafio para os laboratórios de Genética Forense, não só pela rapidez com a qual novos *kits* e tecnologias surgem na área, mas também porque é desafiador conduzir estudos deste tipo e ainda processar as amostras encaminhadas e resolver os casos que demandam perícias de DNA com a rapidez necessária. Adicionalmente, a grande variedade de abordagens e opiniões que existem no tópico de validação torna um desafio para um laboratório deduzir um conjunto mínimo de critérios para avaliação para garantir que um método pode ser confiável para produzir informações de qualidade. Apesar disso, uma pesquisa conduzida com laboratórios de genética forense dentro e fora dos EUA demonstrou que 85% dos Laboratórios acreditam que o processo de validação poderia ser padronizado (BUTLER, 2004).

A condução dos estudos propostos, bem como a aplicação dos limiares calculados nas perícias genéticas conduzidas na rotina, permitirá uma análise baseada em dados específicos para os equipamentos e condições do laboratório, a emissão de resultados compatíveis com esses parâmetros, bem como a realização de estudos posteriores com amostras criminais, que devem partir de estudos com amostras cuja quantidade e qualidade do DNA possam ser bem estabelecidas, a fim de detectar variações quanto aos limiares calculados. Isto significa que a partir da validação interna de um kit de amplificação de DNA, com amostras e condições conhecidas e controladas, o laboratório poderá testar quaisquer variações que entenda como necessário às suas análises como mudança em ciclagens e volumes de reagentes utilizados na rotina. Além disso a validação interna oferece um ponto de partida para que estudos específicos para as amostras probativas relacionadas à casuística possam ser conduzidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo.

DESENVOLVIMENTO DE UM FLUXO DE VALIDAÇÃO INTERNA DE MÉTODOS DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES AUTOSSÔMICOS PARA APLICAÇÃO EM LABORATÓRIOS DE GENÉTICA FORENSE.

Baleeiro, Camila R. G.^{1,2}, Souza, Carlos Antonio², Oliveira, Keyla P.^{1,2}, Portela, Kamila L. T.³, Balbino, Valdir de Queiroz¹.

¹ *Universidade Federal de Pernambuco, UFPE*

² *Instituto de Genética Forense Eduardo Campos, IG FEC*

³ *Universidade Federal da Bahia, UFBA*

Resumo/Abstract

A Genética Forense é uma área da criminalística amplamente regulada por Normas de Qualidade, tendo em vista a necessária robustez das provas por ela fornecidas. Dentro dos parâmetros de qualidade que devem ser seguidos por laboratórios de genética forense em todo o mundo, a validação interna dos métodos utilizados é um procedimento essencial para atestar a validade dos resultados emitidos. A NBR ISO 17025, bem como as recomendações emitidas pelo SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) são utilizadas como referência na área, pois visam definir quais os parâmetros mínimos de qualidade aplicáveis a este tipo de estudo. O guia de referência para a condução do estudo de validação interna em laboratórios de Genética Forense, publicado pelo SWGDAM, descreve quais os ensaios que devem ser realizados para que os principais parâmetros de análise sejam contemplados. Apesar disso, ainda não se dispõem de publicações de referência que reúnam as metodologias que poderão ser adotadas para a condução de cada um dos ensaios descritos, ou que apresente as principais diferenças entre elas. Esse trabalho visa apresentar os resultados obtidos a partir da validação interna realizada no Instituto de Genética Forense Eduardo Campos com o uso do kit *PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega Corporation), discutir os métodos e procedimentos necessários para que

laboratórios de genética forense possam realizar a validação interna de kits de amplificação e genotipagem de STRs autossômicos utilizados na rotina de processamento de amostras para análise de DNA, e, por fim descrever quais os parâmetros que deverão ser derivados dos estudos e como eles deverão ser analisados.

Palavras-chave: Sequência repetida em tandem (STR); Genética Forense; Validação interna; Controle de qualidade; Ciências Forenses

Introdução

A Genética Forense é uma área da criminalística amplamente regulada por Normas de Qualidade, tendo em vista a necessária robustez das provas por ela fornecidas, bem como as suas implicações legais na aplicação da justiça. No que tange o Estudo de Validação Interna em laboratórios de Genética Forense, as principais normas internacionais aplicáveis são a ISO 17025 e o guia publicado pelo *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods - SWGDAM* intitulado “Diretrizes de validação para métodos de análise de DNA” (do inglês, *SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods*). O INMETRO é o órgão brasileiro de metrologia que dispõe das versões traduzidas para o português da ISO 17025 e do Vocabulário Internacional de Metrologia – VIM, que orientam sobre os estudos e conceitos relacionados à Gestão de Qualidade (ABNT, 2017; INMETRO, 2012).

Em resposta aos parâmetros de qualidade estabelecidos para análise de amostras criminais, que visam garantir que os resultados emitidos pelos laboratórios são confiáveis e reprodutíveis, a validação interna se apresenta como uma ferramenta essencial para que se possa atestar a validade desses resultados, bem como para conhecer as limitações associadas à análise genética (SWGDAM, 2016).

Tendo em vista que a perícia de DNA tem como principal produto a geração de eletroferogramas, uma interpretação objetiva e confiável dos resultados obtidos depende de conhecimentos prévios acerca dos limites aos quais os equipamentos e reagentes estão submetidos, dentro das condições de cada laboratório. Esse conhecimento permitirá que o laboratório possa comparar perfis genéticos e emitir conclusões com alto grau de confiabilidade quando do processamento das amostras relacionadas aos diversos tipos de crimes.

A partir do estudo de validação interna, o laboratório é capaz de calcular e

estabelecer limiares associados aos diversos parâmetros envolvidos na interpretação de perfis genéticos. São muitas as análises e limiares que podem ser estabelecidos a partir deste estudo, e dentre eles se encontram os parâmetros abaixo descritos:

1. O ruído basal associado aos equipamentos e ensaios realizados;
2. A faixa ideal de trabalho, avaliando o comportamento apresentado pelos perfis genéticos obtidos a partir de amostras com concentrações distintas de DNA;
3. Os limiares de detecção, analítico e estocástico, a fim de estabelecer a concentração e altura mínimas que um pico deverá apresentar para que possa ser interpretado como um alelo, bem como avaliar qual a altura mínima para que um alelo possa ser classificado como homocigoto;
4. A altura média esperada para *stutters*, em cada ponto de concentração, que pode ser especialmente importante na análise de perfis genéticos de mistura;
5. Até que proporção entre diferentes contribuintes é possível detectar os alelos de cada doador de acordo com a sensibilidade dos equipamentos e reagentes utilizados;

Os estudos de validação interna em laboratórios de genética forense têm se tornado uma necessidade crescente, já se dispendo de publicações que abordam quais os estudos que deverão ser contemplados quando da condução dos experimentos, apesar de ainda se carecer maior aprofundamento acerca das formas ideais para a sua realização. Os estudos e guias publicados apresentam formas distintas de realizar cada um dos ensaios, o que gera dúvidas sobre a melhor metodologia a ser aplicada, quais as vantagens e desvantagens de cada uma delas e como os dados provenientes de cada um dos estudos poderão auxiliar a entender o comportamento dos perfis genéticos obtidos após o processamento de amostras probativas relacionadas à rotina do laboratório.

Neste trabalho, descrevemos os resultados obtidos com o uso do kit *PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega Corporation) para amplificação e genotipagem das amostras coletadas da mucosa oral de doadores voluntários, bem como do Controle Positivo do *kit (2800M Control DNA)*, e com o uso do software GeneMapper para análise dos eletroferogramas, a fim de apresentar análises comparativas entre as metodologias que podem ser utilizadas, a forma de interpretação dos resultados obtidos e, por fim, propor um fluxograma para realização do Estudo de Validação Interna de kits de amplificação e genotipagem de STRs autossômicos, utilizados na rotina de processamento de amostras criminais para

análise de DNA.

Materiais e métodos

Amostras Utilizadas

Para a condução dos estudos de validação, utilizou-se um controle positivo do kit *PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega Corporation) e quatro amostras coletadas da mucosa oral de doadores voluntários do próprio laboratório, sendo dois deles do sexo masculino e dois do sexo feminino. Para a escolha dos doadores masculinos, foram avaliados os perfis genéticos de 30 indivíduos, tendo-se escolhidos os dois com maior índice de heterozigosidade. Para a escolha das amostras das doadoras do sexo feminino, priorizou-se aquelas com o maior número de alelos diferentes em relação às mesmas regiões da amostra masculina, tendo em vista que foram utilizadas para os ensaios de mistura. As amostras de referência contendo mucosa bucal foram coletadas mediante autorização por meio de aposição de impressão digital e/ou assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Parecer número 3.343.119, em 23 de maio de 2019).

Procedimentos Laboratoriais

As amostras de mucosa bucal coletadas dos doadores voluntários foram submetidas à extração de DNA pelo sistema automatizado Maxwell® RSC Instrument, com a utilização do kit Maxwell FSC DNA IQ Casework (Promega Corporation). Para a avaliação do ruído de fundo basal do instrumento foram utilizados, adicionalmente, 20 controles negativos (água ultrapura).

As amostras dos doadores, bem como o DNA do controle positivo e dos controles negativos, foram quantificadas em triplicata com o kit Investigator Quantiplex Pro (Qiagen), no equipamento 7500 Real Time PCR System, com auxílio do HID Real Time PCR Analysis Software v.1.2 (Applied Biosystems). A partir dos valores obtidos das amostras de Referência dos doadores e do Controle Positivo, foram preparadas as curvas de diluição seriada nas concentrações de 0,0315, 0,0625, 0,125, 0,250, 0,5, 1,0 e 2,0 ng/μL de DNA para o controle positivo e amostras dos doadores masculinos, e amostras com concentração de 0,5 ng/μL para as amostras femininas.

As amostras da curva de diluição seriada, do estudo de repetibilidade e reprodutibilidade, bem como as amostras dos controles negativos foram amplificadas

em triplicata. Dos 60 eletroferogramas obtidos a partir dos controles negativos, verificou-se que uma das replicatas apresentava sinais de contaminação que não foi observada em nenhuma outra amostra da bateria sendo, por esse motivo, retirado das análises.

A amplificação e genotipagem ocorreu com o uso do kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega Corporation), conforme instruções do fabricante para reações cheias. A amplificação ocorreu no termociclador *GeneAmp™ PCR System 9700* da *Applied Biosystems* em todas as análises, com exceção do estudo de reprodutibilidade que utilizou adicionalmente outros dois termocicladores modelo *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* da *Applied Biosystems*, a fim de avaliar variações eventualmente presentes entre os termocicladores disponíveis no laboratório; a eletroforese, por sua vez, foi realizada no Sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer, com auxílio do 3500 Series Data Collection Software v.3.0 (*Applied Biosystems*), tendo sido utilizado o polímero “*POP-4™ Polymer for 3500/3500*” e o capilar “*3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array, 36 cm*” (*Thermo Fisher*). Após o processamento das amostras as análises foram efetuadas através do software GeneMapper® ID-X v.1.6 (*Applied Biosystems*).

Análise dos Dados

Após a análise no software, os dados referentes à cor de fluorescência (dye), nome da amostra (*sample file name*), *Size standard*, e altura dos picos (height) foram exportados para uma planilha Excel®, a fim de que fossem calculados média, desvio padrão, máximo e mínimo das alturas dos picos das amostras analisadas, para cada um dos canais de fluorescência do kit, possibilitando ainda o cálculo da razão entre as alturas de cada contribuinte, de acordo com as variações próprias de cada estudo.

Resultados e Discussão

Procedimentos Prévios

O estudo de validação interna visa reunir dados provenientes de testes realizados dentro das condições específicas de cada laboratório e tem como objetivo demonstrar que seus métodos e procedimentos funcionam conforme o esperado. Para isso, o laboratório deverá ter todos os seus ensaios devidamente documentados, incluindo em seus registros quais os equipamentos e insumos utilizados. A partir

destas informações, serão calculados os limiares e parâmetros que serão adotados na análise dos perfis genéticos (ENFSI, 2010; SWGDAM, 2016).

Antes de dar início aos estudos de validação interna, o laboratório deverá definir quais os equipamentos e insumos que irão ser utilizados nos ensaios, a fim de que se mantenham os mesmos durante todo o processo. Salienta-se que devem ser reservados insumos e kits dentro da validade, bem como equipamentos devidamente calibrados, garantindo, deste modo, que eventuais variações detectadas sejam próprias de cada um dos estudos.

O estudo de validação interna, segundo as diretrizes do SWGDAM (2016), deve ser composto dos seguintes ensaios: 1. Utilização de Amostras de fonte conhecida e não probatórias ou amostras simuladas; 2. Estudo de sensibilidade e efeitos estocásticos; 3. Estudo de precisão e exatidão, que inclui ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade; 4. Estudo de misturas; e 5. Avaliação de contaminação. A seguir, estão detalhados cada um desses estudos e quais os métodos mais utilizados na condução de cada um deles.

Utilização de Amostras de fonte conhecida e não probatórias ou amostras simuladas

Para a condução dos estudos propostos, o laboratório deverá utilizar amostras conhecidas ou simuladas, tendo em vista que é necessário conhecer o perfil genético das amostras utilizadas para identificar e registrar os desvios possivelmente causados por baixas concentrações de DNA e amostras de mistura. A partir desses estudos, serão definidos os limiares que serão adotados pelo laboratório para análise de suas amostras na rotina, e a obtenção de resultados informativos a partir dos estudos depende diretamente das características das amostras selecionadas.

Para a condução dos estudos de sensibilidade, precisão e exatidão e de misturas, o laboratório deverá definir previamente quais serão as amostras masculinas e femininas utilizadas. Para as amostras masculinas é desejável selecionar perfis com o maior número possível de regiões em heterozigose, a fim de avaliar o equilíbrio entre os alelos em cada região e possíveis *drop outs*.

Para os ensaios de mistura podem ser utilizadas as amostras dos doadores masculinos utilizadas nos ensaios de sensibilidade, contudo é importante que ao selecionar as amostras, sejam avaliados os perfis genéticos das doadoras a fim de escolher as que apresentam o maior número de alelos não coincidentes com o

contribuinte masculino, e evitando, se possível, os perfis genéticos em que os picos dos doadores presentes na mistura se posicionem de maneira frequente em posições de *stutter* em relação ao outro contribuinte, ou seja, que os alelos se posicionem com pelo menos dois *bins* (regiões do eletroferogramas onde os picos correspondem a alelos conhecidos) de diferença nas mesmas regiões, a fim de facilitar a individualização de cada uma das contribuições nas análises.

Para isso, podem ser utilizados controles positivos de kits, amostras adquiridas do Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology* – NIST), que são amostras de referência certificadas, ou amostras doadas voluntariamente pela equipe do laboratório (*Staff*), e são elas que serão utilizadas para a condução dos estudos, sendo recomendado observar o tempo e condições de armazenamento, pois são fatores que podem afetar a estabilidade do DNA genômico e a capacidade de obtenção do perfil genético (PROMEGA, 2013).

Para a condução dos estudos de validação de desenvolvimento de *kits* são usualmente utilizadas amostras NIST (LUDEMAN et al., 2018), contudo existem estudos de validação interna e de desenvolvimento publicados com a utilização de amostras de referência coletadas de mucosa bucal e de sangue (FLORES et al., 2014; BOAVIDA et al., 2018; PROMEGA, 2016), que também são capazes de fornecer resultados assertivos.

Amostras NIST e Controles Positivos de *kits* apresentam como vantagens uma maior qualidade na purificação do DNA extraído, tendo em vista que são submetidos a procedimentos adicionais para controle de qualidade, que visam garantir a confiabilidade na obtenção de perfis genéticos, quando comparado ao obtido pelos métodos de extração de DNA comumente utilizados no laboratório, maior confiabilidade nas quantidades de DNA aferidas na etapa quantificação e apresentam taxa de heterozigosidade elevada (no caso de amostras NIST), o que é recomendável para a condução dos estudos de sensibilidade. Contudo, o perfil de pureza dessas amostras é muito distinto do verificado nas amostras probativas usualmente processadas nos laboratórios de genética forense, motivo pelo qual a utilização de amostras de referência de doadores voluntários pode fornecer resultados mais próximos do real.

O Gráfico 1 apresenta os dados relacionados à média das alturas dos alelos detectados em RFU (Unidade Relativa de Fluorescência) da amostra do controle positivo (CP) em comparação com as amostras de referência (AR) coletadas dos

doadores masculinos (PL e JJ), em cada uma das concentrações de DNA testadas. No Gráfico 2, evidencia-se o percentual de alelos detectados nas amostras de acordo com a concentração de DNA na amostra, sendo apresentado apenas os menores ponto da curva de diluição seriada.

É possível verificar que a amostra CP apresentou visualmente uma maior média na altura dos alelos detectados, nas concentrações superiores a 0,0125 ng/ μ L. Já no que se refere ao percentual dos alelos presentes na amostra, observa-se que no ponto com menor concentração de DNA (0,0315 ng/ μ L), a amostra CP apresentou um percentual superior às demais amostras.

Os dados obtidos a partir da quantificação das amostras evidenciados na Tabela 1, demonstram que o índice de degradação da amostra do Controle Positivo CP foi inferior ao detectado para as Amostras de Referência PL e JJ. Já foi demonstrado que a qualidade do DNA obtido a partir da coleta de amostras bucais de doadores varia em função de aspectos como a lavagem e higiene bucal antes da coleta, a escovação e ainda existem relatos de variações entre a produção de células bucais em função do sexo, idade entre outros fatores (FEIGELSON, 2001).

Os dados obtidos confirmam que a análise exclusiva do Controle Positivo pode superestimar a capacidade de obtenção de resultados interpretáveis em concentrações mais baixas de DNA, bem como a altura esperada dos alelos nas amostras em cada ponto de concentração testada, motivo pelo qual a presença de amostras extraídas no próprio laboratório, seguindo as mesmas etapas laboratoriais que as amostras probativas, pode demonstrar padrões de comportamento mais próximos dos usualmente verificados na rotina do laboratório.

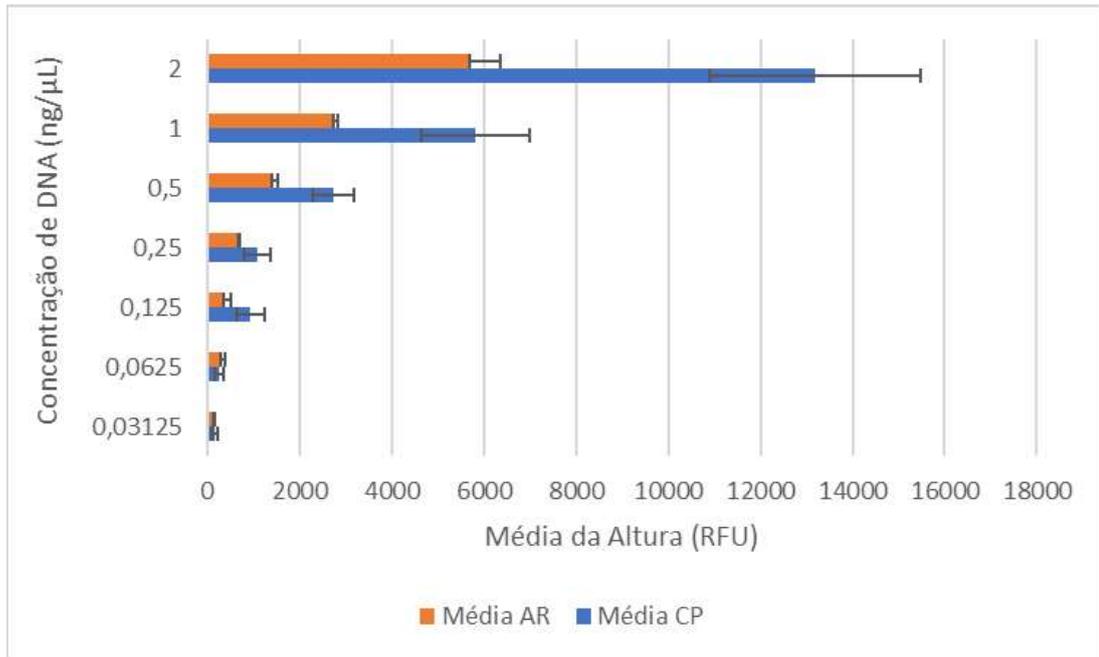


Gráfico 1 - Média da Altura dos alelos detectados para cada ponto de concentração de DNA para as amostras CP (azul) em comparação com as Amostras de Referência (AR) JJ e PL (laranja).

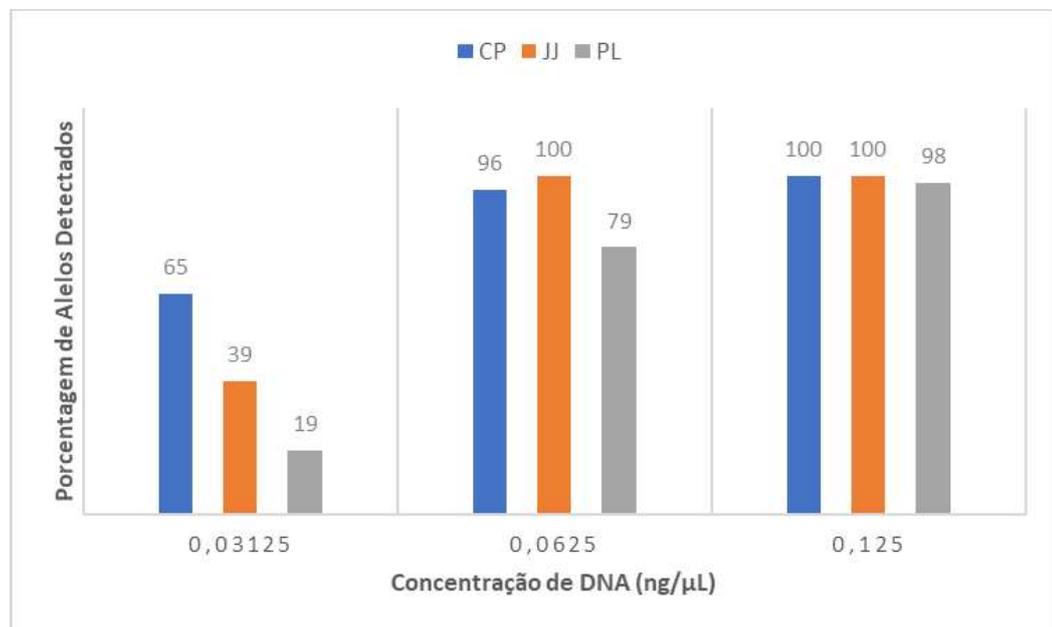


Gráfico 2 - Percentual de Alelos presentes nas amostras CP (azul), JJ (vermelho) e PL (verde), nos menores pontos de concentração de DNA.

Result Summary		Quality Assessment					
Well	Sample Name	Mixture Index	Mixture Threshold	Degradation Index	Degradation Threshold	Inhibition Index	Inhibition Threshold
E2	CPC	0,66	Below Threshold	0,64	Below Threshold	-0,17	Below Threshold
F2	CPD	0,66	Below Threshold	0,65	Below Threshold	-0,03	Below Threshold
F3	PLC	1,09	Below Threshold	1,16	Below Threshold	-0,09	Below Threshold
G3	PLD	0,95	Below Threshold	0,85	Below Threshold	-0,11	Below Threshold
C2	JJC.1	1,29	Below Threshold	1,18	Below Threshold	0,87	Below Threshold
F2	JJD.1	1,03	Below Threshold	0,88	Below Threshold	0,85	Below Threshold

Tabela 1 - Dados da quantificação das amostras utilizadas no Ensaio de Sensibilidade. Na Tabela evidencia-se que o índice de degradação da amostra CP é inferior ao observado para as amostras de Referência JJ e PL .

Após realizar os estudos de sensibilidade e efeitos estocásticos, o laboratório deverá processar amostras conhecidas da casuística e analisá-las, utilizando os limiares derivados do seu estudo de validação interna, a fim comprovar o nível de concordância entre os valores calculados e os resultados obtidos. No que se refere ao número de amostras indicados para o estudo de concordância, o Guia de Validação da PROMEGA sugere a utilização de cinco a dez amostras oriundas de indivíduos conhecidos para a confirmação dos cálculos realizados e, adicionalmente, mais cinco a dez amostras não probativas oriundas de amostras criminais para a avaliação dos parâmetros estabelecidos.

Estudo de Sensibilidade, Efeitos Estocásticos e Relação Sinal/Ruído do Ensaio

Relação Sinal/Ruído

Os experimentos conduzidos para esse estudo visam possibilitar o cálculo dos limiares que deverão ser adotados pelo laboratório quando da análise dos eletroferogramas obtidos a partir de amostras probativas, sendo para isso necessário o cálculo dos limiares de detecção, analítico e estocástico.

Neste ponto, é importante ressaltar que a ausência de padronização das nomenclaturas utilizadas para os limiares calculados nas publicações da área causa confusões entre os conceitos de sensibilidade e limiar analítico (do inglês *Analytical Threshold- AT*). Dentro do contexto da Genética Forense, enquanto a sensibilidade trata da mudança no sinal detectado a depender da concentração de DNA, o AT é a altura mínima requerida acima da qual picos detectados podem ser distinguidos de maneira confiável da linha de base, ou seja, do ruído basal próprio do tipo de análise (Bregu, 2008; SWGDAM, 2017).

O mesmo ocorre quanto às definições de limiar de detecção e de quantificação. Enquanto o limiar de detecção é tido como sendo a mais baixa concentração de um analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado, o limiar de quantificação é a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições de teste declaradas (Gilder, 2007; Shrivastava, 2011).

Para a determinação do limiar de detecção e analítico, é frequentemente utilizada a análise de brancos ou controles negativos, que são amostras sem a presença de DNA, a fim de determinar o ruído basal relacionado aos equipamentos e reagentes utilizados nas análises e, adicionalmente, para realizar a avaliação de contaminação, juntamente com a avaliação dos controles negativos utilizados nos demais estudos (Flores et al, 2014; Boavida et al, 2018).

Contudo, já se sabe que a presença de DNA na amostra influencia diretamente a altura do ruído basal do eletroferograma. Por esse motivo, limiares calculados com o uso de controles negativos podem refletir a realidade de amostras pobres em DNA, mas para amostras da casuística, com maiores concentrações, se recomenda que o cálculo seja realizado através da curva de diluição seriada, por exemplo, já que a aplicação de um limiar analítico muito baixo pode fazer com que o sistema nomeie erroneamente picos do ruído, atrapalhando principalmente a análise de amostras de mistura (Bregu, 2008; Flores, 2014).

No Gráfico 3 é possível verificar o limiar analítico (AT) calculado ($AT = \text{média} + 10 \times \text{desvio padrão}$) através da análise do ruído de fundo detectado nos eletroferogramas obtidos a partir de controles negativos da amplificação e das amostras utilizadas na curva de sensibilidade com menores (0,0625 – 0,250 ng/ μ L) e com maiores concentrações de DNA (0,5 – 1,0 ng/ μ L), em cada um dos canais de fluorescência do eletroferograma.

Os resultados obtidos demonstram um aumento no ruído de fundo, e consequentemente do limiar analítico calculado, com o aumento da concentração de DNA na amostra, o que apresenta consonância com o que demonstram as publicações da área, e demonstra a necessidade de que o cálculo do limiar analítico seja realizado utilizando amostras com a presença de DNA.

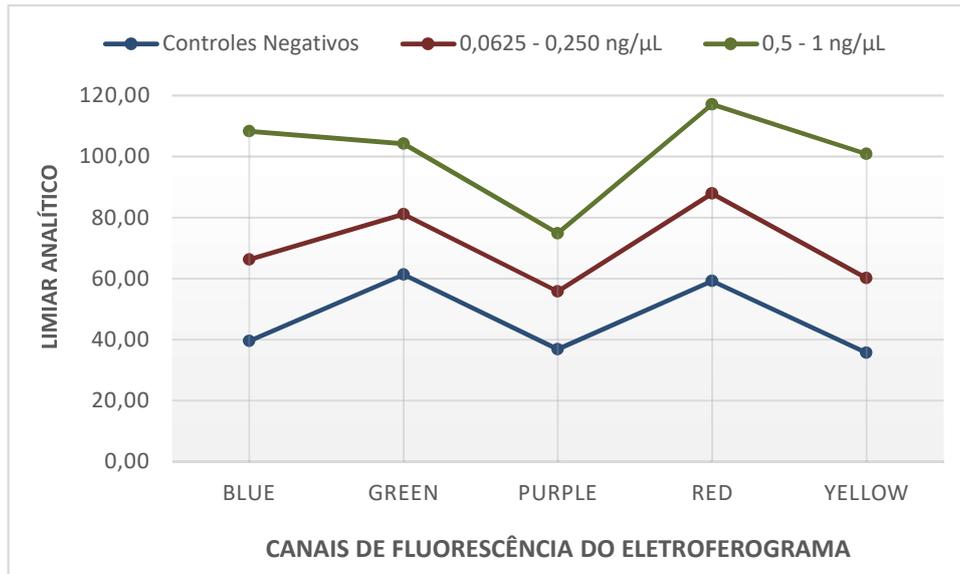


Gráfico 3 – Limiar Analítico calculado para as amostras CP (azul), JJ (vermelho) e PL (verde), em cada um dos canais de fluorescência do eletroferograma.

A utilização de amostras sem a presença de DNA pode ser importante para avaliar a relação sinal/ruído associado unicamente ao equipamento e, para isso, recomenda-se selecionar controles negativos de baterias distintas de amplificação, para que o cálculo possa incluir as variações usualmente detectadas no laboratório. Não é recomendada a utilização de negativos da eletroforese, pois os negativos da amplificação são mais representativos das amostras forenses (Bregu, 2008).

Após o processamento das amostras, para que se possa verificar o ruído basal do equipamento é necessário selecioná-las no software de análise, aplicar um método de análise específico, no qual qualquer pico acima de um RFU é detectado e, no caso de amostras com DNA, eliminar os alelos conhecidos e seus respectivos *stutters*, a fim de que permaneça apenas o ruído basal. Devem adicionalmente ser retirados da análise os artefatos conhecidos, bem como os picos claramente atribuídos ao *pull-up* (reflexão) do *size standard* do kit utilizado, ou de tamanhos inferiores e superiores aos analisados pelo kit.

Os dados relacionados à cor de fluorescência (*dye*), nome da amostra (*sample file name*), *size standard*, e altura dos picos (*height*) devem ser exportados a fim de que sejam calculados média, desvio padrão, máximo e mínimo das alturas dos picos das amostras analisadas, para cada um dos canais de fluorescência do kit. A partir desses parâmetros serão efetuados os cálculos de Limiar de Detecção e Limiar Analítico.

Existem diversos métodos disponíveis para o cálculo dos limiares que serão aplicados à análise de controles negativos e amostras forenses na casuística, e para que se escolha o método mais aplicável, é necessário se atentar ao modelo de distribuição dos dados obtidos, pois muitos dos métodos presumem uma distribuição normal, quando pode ser que a distribuição log-normal seja mais aplicável. É essencial que se adote um nível de significância adequado, principalmente se o laboratório utilizar controles negativos para os cálculos dos limiares. Nesses casos recomenda-se aumentar o valor de K (nível de significância) para compensar o fato de se tratar de amostras sem DNA e, conseqüentemente com menor ruído de fundo (Bregu, 2008).

Estudo de Sensibilidade e Efeitos Estocásticos

Com o objetivo de determinar a faixa dinâmica e faixa alvo ideal de trabalho, e avaliar o equilíbrio de heterozigotos, o DNA extraído das amostras selecionadas pelo laboratório deverá ser quantificado em triplicata e, a partir da média das concentrações obtidas, deverá ser efetuada a curva de diluição seriada com pontos de concentração de interesse do laboratório. O Guia de Validação da PROMEGA sugere pontos com concentrações alvo de 1; 0,500; 0,250; 0,125, 0,0625; e 0,0315 ng/uL, mas o laboratório poderá selecionar outras concentrações caso entenda necessário (PROMEGA, 2013).

Para a condução do presente estudo, a etapa de quantificação é essencial, pois é a partir das quantidades aferidas pelo sistema de PCR em tempo real, que é possível realizar os cálculos necessários para a correta preparação da curva de diluição seriada. Já se sabe que a precisão desta etapa está diretamente relacionada à qualidade da curva controle e, conseqüentemente da correta manutenção das pipetas utilizadas no preparo, motivo pelo qual recomenda-se a utilização de pipetas calibradas e que as aferições sejam realizadas em replicatas, a fim de compensar possíveis variações entre as concentrações obtidas para cada uma delas e alcançar valores mais próximos do real (Grgicak, 2010). Após a preparação da curva de diluição seriada com os pontos de concentrações desejados, eles devem ser quantificados novamente e, a partir das médias obtidas, será feita a normalização para as concentrações pretendidas a fim de efetuar as reações de PCR, para amplificação do DNA e posterior análise dos resultados.

O estudo de sensibilidade visa observar como os alelos se comportam em

diferentes concentrações de DNA no que se refere à altura dos picos, perda alélica, desbalanço entre picos em regiões heterozigóticas, e o aparecimento de artefatos que podem prejudicar as análises. A análise dos dados deste estudo pode fornecer informações quanto à: altura esperada dos alelos para cada concentração, faixa de trabalho em que o aumento na quantidade de DNA irá refletir um aumento semelhante na fluorescência detectada (altura dos alelos), e presença de *dropouts*, *dropins*, bem como de outros artefatos conhecidos nas regiões analisadas no eletroferograma.

O Gráfico 4 apresenta as variações detectadas na altura em RFU dos alelos para cada ponto de diluição seriada (0,0315, 0,0625, 0,125, 0,250, 0,5, 1,0 e 2,0 ng/ μ L) para as Amostras CP, PL e JJ. É possível verificar a altura média dos alelos a depender da concentração de DNA na amostra, bem como verificar se há uma correspondência entre o aumento da concentração de DNA na amostra e a altura dos picos a fim de verificar a faixa linear de trabalho, bem como quais os pontos que não se encontram nessa faixa.

Para que a faixa de trabalho possa ser corretamente determinada, é essencial que se verifique adicionalmente a perda de alelos à medida que a concentração de DNA diminui. O Gráfico 5 evidencia o percentual de alelos obtidos em cada ponto de concentração da curva de diluição seriada para cada uma das amostras e, a partir dele, é possível observar que, na concentração de 0,0315 ng/ μ L, houve uma perda alélica considerável para todas as amostras testadas, o que indica que mesmo que este ponto de concentração tivesse um comportamento linear, ele não poderia ser incluído na faixa de trabalho do laboratório. Por outro lado, o ponto de concentração de 0,125 ng/ μ L se apresenta como o ponto mais baixo em que é possível obter perfis com 100% dos alelos esperados para a amostra, ainda que na Amostra PL tenha se verificado um percentual de 98%.

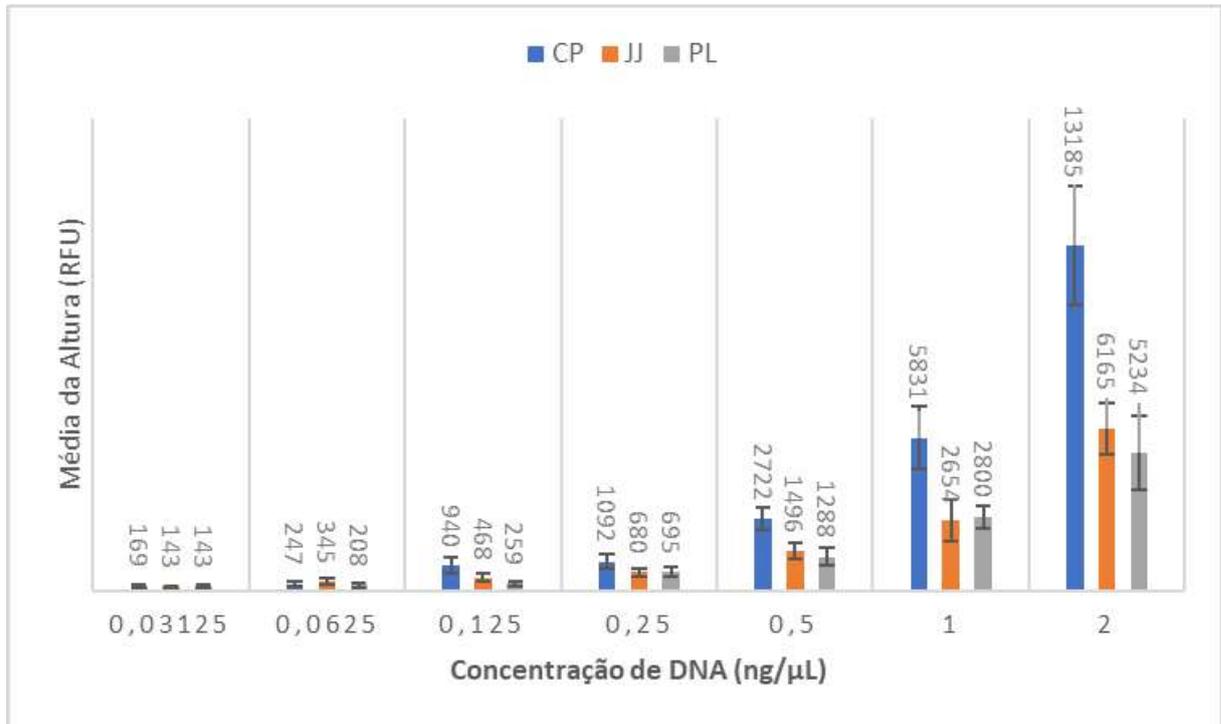


Gráfico 4 - Média das alturas dos alelos por concentração de DNA.

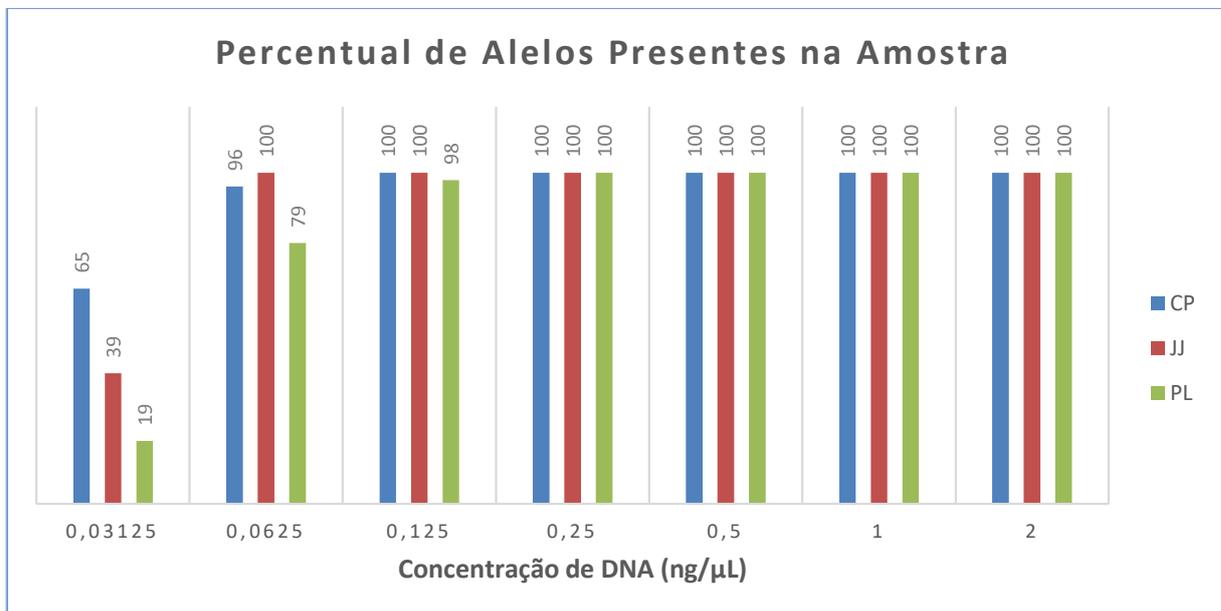


Gráfico 5 - Percentual de Alelos presentes nas amostras CP (azul), JJ (vermelho) e PL (verde), em cada ponto de concentração de DNA

A fim de avaliar o equilíbrio entre os alelos de regiões heterozigóticas, devem ser selecionadas essas regiões em cada uma das amostras utilizadas e as alturas plotadas em um Mapa de Calor (do inglês *Heatmap*). Na Figura 1 é possível verificar o mapa construído para as concentrações de 0,0315, 0,0625 e 0,125 ng/μL para as três replicatas da Amostra CP. No mapa as regiões homozigóticas foram marcadas

em cinza e não foram consideradas nas análises, as regiões nas quais estavam presentes ambos os alelos foram marcados em verde, em amarelo as que houve a perda de um dos alelos e em vermelho as regiões que ambos os alelos estavam ausentes. É possível perceber que à medida que a concentração de DNA diminui, aumenta a perda alélica tanto de um quanto dos dois alelos de cada marcador. Em baixas concentrações de DNA tem-se adicionalmente uma inconsistência entre o comportamento das replicatas, como exemplo o marcador D3S1358 nas amostras CP.1, na qual houve a perda de um dos alelos, na CP.2 onde ambos os alelos foram detectados e na CP.3 onde nenhum deles apareceu no eletroferograma. Os dados relacionados às Amostras PL e JJ foram plotados segundo os mesmos parâmetros, sendo verificados resultados compatíveis, que evidenciaram uma perda alélica ainda maior no ponto de concentração de 0,0315 ng/μL (dados não mostrados).

Concentração																				
0,03125 ng/μL						0,0625 ng/μL						0,125 ng/μL								
Amostra	CP 1.1		CP 1.2		CP 1.3		Amostra	CP 1.1		CP 1.2		CP 1.3		Amostra	CP 1.1		CP 1.2		CP 1.3	
Marçador	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Marker	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Marker	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
AMEI	100	137	182	166	121		AMEI	292	176	250	123	145		AMEI	775	1388	691	770	351	825
D3S1358	150		158	103			D3S1358	247	272	259	174	235	267	D3S1358	1502	1437	1211	795	563	681
D1S1656	114		168	111	195	185	D1S1656	366	124	375	258	269	152	D1S1656	1730	1450	937	762	833	758
D2S441	415		301		161		D2S441	243	455	186	214	335	386	D2S441	1269	838	1129	993	676	627
D10S1248	282	197	199	179	107		D10S1248	202	281	378	268	277	211	D10S1248	1605	982	782	1171	831	735
D13S317			272		258		D13S317	503	272	135	237	114		D13S317	550	724	1054	768	782	820
Penta E	117		302	300			Penta E	225	122	261	302	384	428	Penta E	1048	763	827	978	1505	495
D16S539	118		241	183	141	120	D16S539	312	313	176	300	101	148	D16S539	1325	917	759	935	536	854
D18S51	152		134	167	115		D18S51	265	321	330	169	200	219	D18S51	1687	1080	963	631	786	1132
D2S1338	109		217		151	127	D2S1338	287	242	215	113	178	123	D2S1338	1677	1279	943	777	1030	921
CSF1PO							CSF1PO							CSF1PO						
Penta D	104	116	272	136	154	159	Penta D	389	158	422	329	305	207	Penta D	1417	2018	763	1407	469	844
TH01			118		134		TH01	192	111	157	177	164	147	TH01	1187	806	619	635	749	490
vWA	138	134	238	106	101		vWA	189	110	366	243	200	222	vWA	1075	988	751	843	738	989
D21S11	212		359		191		D21S11	239	215		240	297		D21S11	931	900	883	1073	859	853
D7S820	117				191	100	D7S820	173	249	361	215	186	180	D7S820	1172	964	1008	584	515	769
D5S818							D5S818							D5S818						
TPOX							TPOX							TPOX						
D8S1179	216		125	103	111		D8S1179	231	127	228	182	158	216	D8S1179	645	780	887	797	787	379
D12S391	123	212	181	240	122		D12S391	425	477	185	283	306	286	D12S391	1425	991	778	1099	1098	612
D19S433	121	205	300	144	123		D19S433	311	243	245	116	265	183	D19S433	853	988	897	1133	850	1047
SE33	268		115		100	107	SE33	171	248	256	539	248	236	SE33	900	774	1231	779	1218	934
D22S1045							D22S1045							D22S1045						
FGA	164	201					FGA	413	278	203	198	324		FGA	1833	1122	1176	693	688	478

Figura 1 - Mapa de Calor (Heat Map) nas concentrações de 0,0315, 0,0625 e 0,125 ng/μL de DNA para a amostra CP, evidenciando as regiões em que ambos os alelos foram detectados (em verde), nas quais houve a perda de um dos alelos (amarelo) e de ambos os alelos (vermelho). Em preto encontra-se destacado o marcador D3S1358, no qual verificou-se diferenças expressivas entre as replicatas na concentração de 0,0315 ng/μL.

Selecionando as regiões heterozigóticas onde houve a amplificação de ambos os alelos, é possível calcular a razão entre as alturas dos picos (do inglês, *Peak Height Ratio - PHR*), que irá auxiliar o analista a entender qual o desbalanço previsto a depender da altura dos alelos de um perfil genético, já que este parâmetro está comumente associado à concentração de DNA em determinada amostra. No Gráfico 6 estão dispostos os valores de PHR de acordo com as faixas de altura dos alelos, e é possível verificar que a razão entre os alelos irmãos é maior em quanto maior é a emissão de fluorescência.

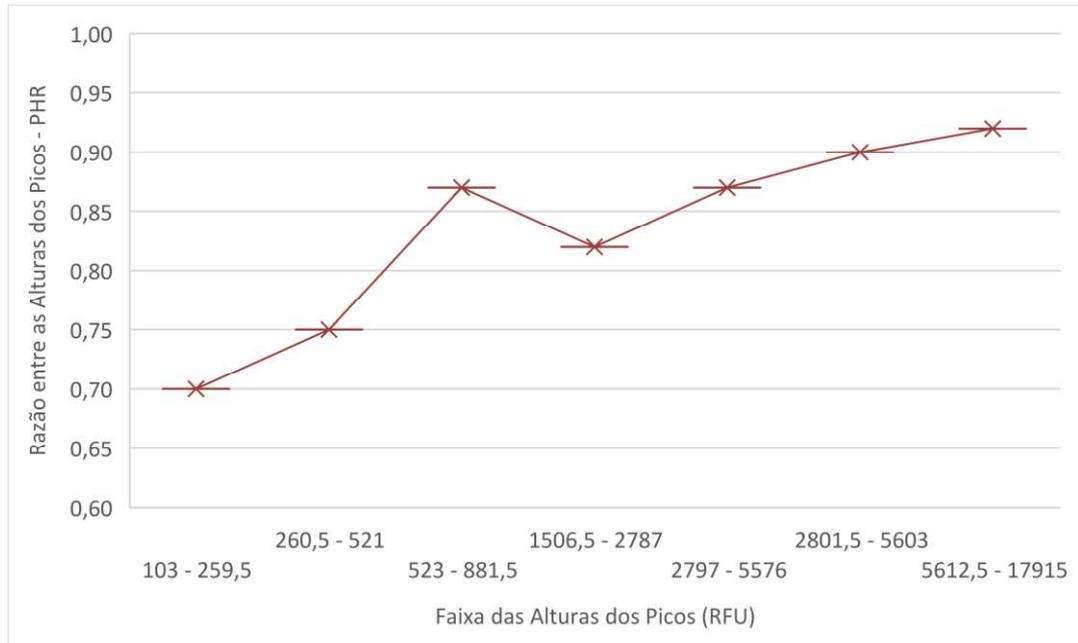


Gráfico 6 - PHR calculado por faixa de altura dos alelos (RFU).

Com esses dados também é possível calcular o limiar estocástico, que é definido como o valor da altura de um pico abaixo do qual é razoável supor que o *dropout* alélico pode ter ocorrido em uma amostra de fonte única (SWGDM, 2017). Para que este limite possa ser estabelecido, é necessário que se observe dentro da faixa de trabalho previamente definida, em que ponto a perda alélica começa a ocorrer, e qual a altura detectada para o alelo em que a perda do seu respectivo alelo irmão ocorreu, o que poderia levar a uma interpretação equivocada sobre a referida região, na qual o alelo poderia ser falsamente identificado como um homocigoto.

De acordo com os resultados obtidos, a faixa de trabalho foi estabelecida entre 0,0625 e 1,0 ng/μL, e a perda alélica observada ocorreu no menor ponto desta faixa de trabalho, motivo pelo qual foi o ponto utilizado para o cálculo. Analisando-se as perdas alélicas ocorridas neste ponto de concentração, foram marcadas as alturas em que um dos alelos foi perdido para que o limiar estocástico fosse determinado (dados não mostrados).

No site do *National Institute of Standards and Technology – NIST* (Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia), é possível encontrar o documento “*Introduction to Interpretation Issues*” publicado em 2013 por Butler no qual são apresentados sete métodos que possibilitam o cálculo do limiar estocástico pelo laboratório (SONJA KLEIN, 2011)

Análise dos *Stutters*

Stutters são artefatos de PCR gerados devido ao deslizamento da fita durante a amplificação dos STRs resultando em uma exclusão (*Stutter* anterior ou N-1) ou inserção (*Stutter* posterior ou N + 1) de um pico na fita de DNA recém-sintetizada. Eles tendem a aumentar de tamanho/frequência à medida que a quantidade de DNA aumenta na amostra, e a avaliação desse artefato dentro da Validação Interna possibilita ao laboratório conhecer sua altura esperada a depender da concentração de DNA e, conseqüentemente, da altura dos alelos detectados, bem como verificar em quais dessas concentrações esse tipo de artefato está presente (RIMAN et al., 2020).

O conhecimento prévio desse parâmetro em amostras de fonte única permitirá identificar a presença de contribuintes minoritários em Amostras de Mistura, tendo em vista que os alelos de menores contribuintes frequentemente estão localizados em posição de *stutter* em relação ao contribuinte principal, gerando dúvidas quanto a sua correta identificação no perfil genético.

Esta avaliação também poderá ser realizada utilizando os dados exportados a partir do estudo de sensibilidade, referentes à altura dos alelos conhecidos e dos picos posicionados antes e após cada um dos alelos. Após plotar os dados de interesse o analista irá calcular a razão média entre o tamanho do alelo e de seu respectivo *stutter*, a fim de obter a média e desvio padrão para cada ponto de concentração incluído no ensaio.

O Gráfico 7 evidencia os dados obtidos para a amostra JJ na concentração de 1 ng/μL, onde avaliou-se a razão entre o tamanho do *stutter* em relação ao seu alelo correspondente, apresentado em percentual, em relação à altura dos picos detectados em RFU. Dos 103 picos de *stutter* detectados para a referida amostra, 87 (84%) apresentaram altura entre 6 e 12% da apresentada pelo seu alelo correspondente, contudo esse percentual não variou em função da altura do pico. A partir das demais amostras foram obtidos dados semelhantes (dados não mostrados).

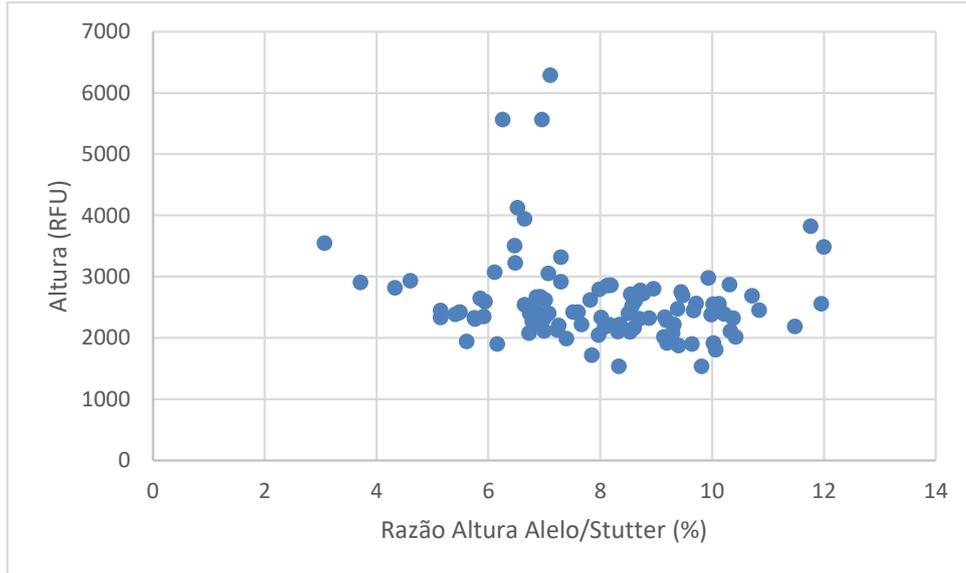


Gráfico 7 - Razão entre o tamanho do stutter em relação ao tamanho do seu alelo corresponde (%) em função da altura do pico em RFU para a amostra JJ.

A partir dessa análise também pode ser avaliada a presença de *stutter* a depender da concentração de DNA na amostra. O Gráfico 8 apresenta o comparativo entre a quantidade de alelos com a presença de *stutters* detectados nas amostras CP e JJ em cada ponto de concentração de DNA (1; 0,5; 0,250; 0,125 e 0,0625). Nas concentrações de 1,0 e 0,5 ng/ μ L há uma maior ocorrência de alelos com a presença de *stutters*, enquanto em menores concentrações eles acontecem em uma frequência menor, o que foi principalmente observado na amostra de referência JJ.

Este dado demonstra que a detecção do *stutter* associado ao alelo varia em função da quantidade de DNA na amostra, tendo em vista que em menores concentrações o *stutter* pode não superar o limiar analítico aplicado nas análises, fator que pode servir como forma de diferenciá-lo de um possível menor contribuinte, quando do aparecimento de picos em amostras que possam ser identificadas como de mistura entre diferentes doadores.

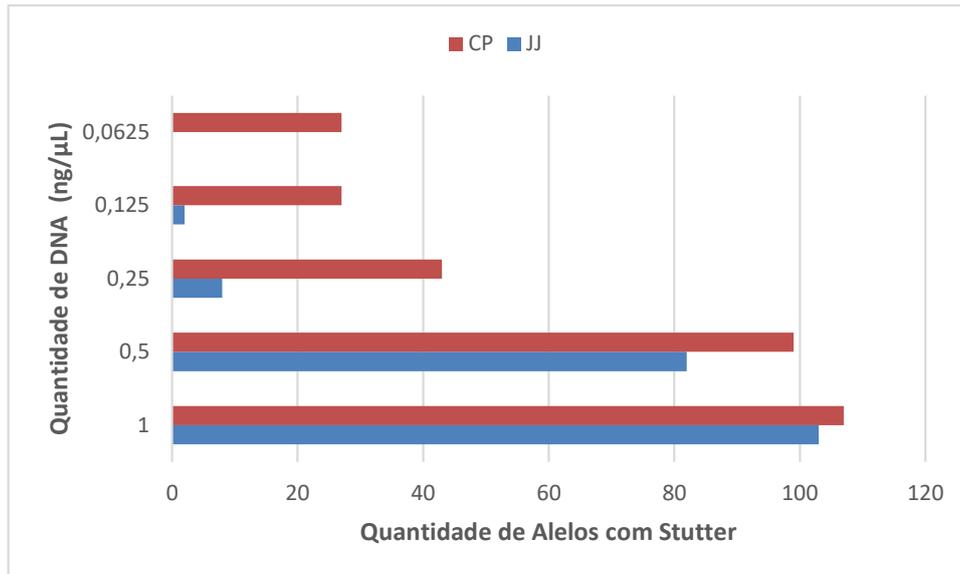


Gráfico 8 - Quantidade de alelos com a presença de stutter detectados nas amostras CP e JJ em cada ponto de concentração de DNA (1; 0,5; 0,250; 0,125 e 0,0625).

Estudo de Precisão e Exatidão - Repetibilidade e Reprodutibilidade

Segundo o SWGDAM, a precisão caracteriza o grau de concordância mútua entre uma série de medições, valores e/ou resultados, depende apenas da distribuição de erros aleatórios e não se relaciona com o valor verdadeiro ou o valor especificado. Já a exatidão é o grau de conformidade de uma quantidade mensurada com seu valor real ou verdadeiro (SWGDAM, 2016). Para a condução dos estudos supracitados, recomenda-se que sejam utilizadas as mesmas amostras utilizadas no estudo de sensibilidade, que possuam concentração de DNA dentro da faixa ideal de trabalho calculada, a fim de avaliar se é possível obter resultados consistentes a partir das variações aplicadas.

Por possuírem conceitos distintos, os experimentos e análises necessários são diversos para cada um deles. No que se refere ao estudo de precisão e exatidão, que inclui ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade, é possível verificar várias formas para condução dos estudos. Para o estudo de repetibilidade para kits autossômicos, sugere-se que sejam avaliadas as diferenças entre resultados obtidos após a amplificação de pelo menos cinco replicatas de uma amostra, pelo mesmo operador; e no de reprodutibilidade os mesmos parâmetros só que para cinco operadores diferentes (ENFSI, 2010; PROMEGA, 2013).

Com o processo de automatização cada vez mais presentes nos laboratórios de genética forense, espera-se que a precisão entre as medidas seja maior, devido a

utilização de pipetadores automáticos, por exemplo, motivo pelo qual o processamento passe a ser cada vez menos realizado de maneira manual (LECLAIR AND SCHOLL, 2005). Por esse motivo, as variações observadas nas alturas dos picos e qualidade dos perfis analisados podem estar mais intimamente relacionadas às diferenças entre equipamentos do que entre operadores, e as possibilidades de testar as diferenças eventualmente detectadas entre amostras amplificadas com diferentes termocicladores podem fornecer informações importantes sobre a realidade do laboratório.

A partir dos dados obtidos podem ser avaliados se houve, em todas as replicatas, a obtenção de perfis completos e balanceados, se o balanço entre os heterozigotos estava dentro do padrão, a designação alélica e a observação quanto a média e desvio padrão das alturas dos alelos amplificados. As variações também podem ser avaliadas com outros parâmetros de interesse do laboratório, como o padrão de comportamento de amostras distintas coletados de uma série de doadores (FLORES et al, 2014).

No Gráfico 9 constam os dados da média do percentual das variações entre as alturas dos alelos detectados em cada uma das amostras amplificadas em 3 baterias distintas de amplificação, cada uma delas realizada em um termociclador distinto, para as concentrações de 0,5 e 1,0 ng/μL. É possível observar no Gráfico que os valores não variaram em função da concentração ou da fonte de DNA. A análise dos dados não demonstrou nenhuma variação que fosse constante em algum dos termocicladores (dados não mostrados), sendo as diferenças detectadas provavelmente decorrentes das variações esperadas em pipetagens manuais.

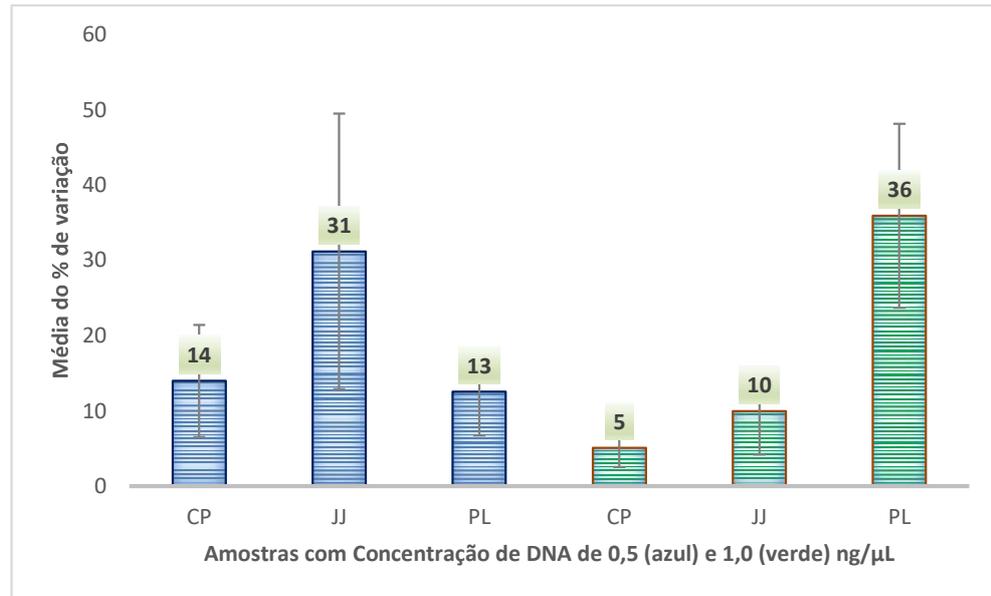


Gráfico 9 – Média da variação em % das alturas detectadas nas concentrações de 0,5 (azul) e 1,0 (verde) ng/μL

Para o estudo de precisão, as análises buscam verificar as designações alélicas e *size calling* (tamanho dos fragmentos em pares de bases) entre os diferentes perfis obtidos, após diferentes injeções de escadas alélicas utilizadas durante os demais estudos, e até em controles positivos, submetidos a injeções distintas no analisador genético (Flores et al, 2014; Boavida et al, 2018).

O Guia de Validação da Promega sugere que sejam avaliados de cinco a dez *ladders* para o estudo de precisão em diferentes injeções, calculando, para cada um dos alelos da escada alélica a média e o desvio padrão dos tamanhos de cada par de bases (PROMEGA, 2013). Para a análise dos dados, deve ser estabelecido que a nomeação dos alelos não apresente variações, enquanto para o tamanho dos alelos admite-se uma variação $\pm 0,5$ bp em torno da média calculada para os alelos da escada alélica, (ENFSI, 2010; PROMEGA, 2013).

A Figura 2 demonstra um fragmento dos eletroferogramas obtidos a partir de três dos oito *ladders* analisados, onde está evidenciada a designações alélica e *size calling* (tamanho dos fragmentos em pares de bases) para o alelo 9, no STR D3S1359, onde é possível observar que a diferença entre os tamanhos em pares de bases, detectados pelo software de análise, não foi superior a 0,5 pb.

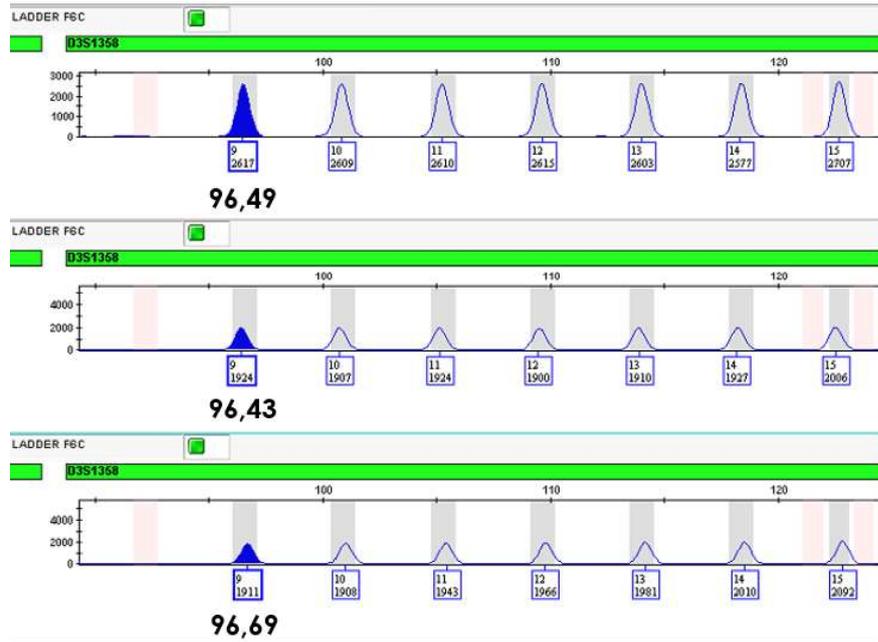


Figura 2 - Designação alélica e size calling (tamanho dos fragmentos em pares de bases) observados a partir da análise de três ladders, evidenciando-se os dados obtidos para o alelo 9 do STR D3S1359.

Estudo de Misturas

O estudo de misturas permite não apenas avaliar a quantidade de material masculino em relação ao feminino presente em determinada amostra, mas também estabelecer em quais proporções é possível detectar alelos interpretáveis do menor contribuinte, em relação ao doador majoritário, em amostras com perfis de mistura. Esses parâmetros são importantes não só para a análise de misturas oriundas das amostras criminais, mas também para avaliar eventuais contaminações de amostras com DNA exógeno (PROMEGA, 2013).

Tendo em vista que os dados obtidos na etapa da quantificação do DNA são fundamentais para confirmar as concentrações e proporções desejadas em cada uma das amostras testadas, salienta-se que para o estudo de misturas é importante ter amostras oriundas de indivíduos do sexo masculino e feminino, a fim de que seja possível avaliar em que proporções de DNA masculino *versus* DNA feminino é possível individualizar as contribuições de cada doador na mistura. Salienta-se neste ponto que alguns manuais de kits de quantificação informam sobre a maior precisão nos valores obtidos quando o DNA feminino está em maior proporção que o DNA masculino (QIAGEN, 2018).

Dentro da casuística dos laboratórios, conhecer os limiares pode ser particularmente interessante para a análise de perfis genéticos oriundos de amostras

relacionadas a crimes sexuais, quando na maioria das vezes, o DNA feminino se encontra em maior proporção que o masculino, especialmente em amostras em que não foi possível a detecção de PSA ou a visualização de espermatozoides, o que acaba inviabilizando a obtenção de perfil genético masculino que permita confrontos (BENSCHOP, 2010).

No que se refere ao número de amostras que deverão ser utilizadas, o Guia de Validação da Promega sugere o mínimo de duas misturas, e que sejam testadas as seguintes proporções para cada doador: 19:1, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3,1:9 e 1:19 (PROMEGA, 2013). O estudo de Validação Interna do *kit PowerPlex® Fusion 6C* obteve perfis interpretáveis de ambos os doadores em amostras de mistura em proporções de 10:1 e 1:10, verificando para as referidas proporções alguns eventos de *dropout*, sendo essa a maior diferença testada neste estudo (BOAVIDA, 2018).

Apesar da razão que representa a maior diferença entre as contribuições seja de 19:1 e 1:19, caso o laboratório ainda consiga individualizar os perfis genéticos de cada contribuinte ou realizar confrontos com as proporções sugeridas, testes com diferenças ainda maiores ou intermediárias podem ser realizados, principalmente no caso da validação de *kits* de amplificação dos STRs do haplótipo do cromossomo Y, a fim de verificar se é possível a recuperação de DNA em desproporções maiores que no caso da amplificação de STRs autossômicos.

Neste ponto, salienta-se a importância de realizar os testes com mais de uma mistura, tendo em vista que até para a mesmas proporções é possível obter resultados distintos. Nas Figuras 3 e 4 é possível verificar um fragmento representativo dos perfis genéticos obtidos a partir da proporção de 1:20 (1 de DNA masculino para 20 de DNA feminino) em duas misturas distintas, com doadores diferentes, evidenciando as mesmas regiões no fragmento exibido. Enquanto na mistura JJxEV é possível identificar todos os alelos do perfil minoritário masculino, na mistura PLxPA os alelos masculinos não foram amplificados em todas as regiões (setas vermelhas evidenciam alelos ausentes), comportamento que foi verificado no perfil genético como um todo (dados não mostrados). Salienta-se neste ponto que para ambas as misturas, a proporção calculada na etapa de quantificação foi condizente com a pretendida (Apêndice A).

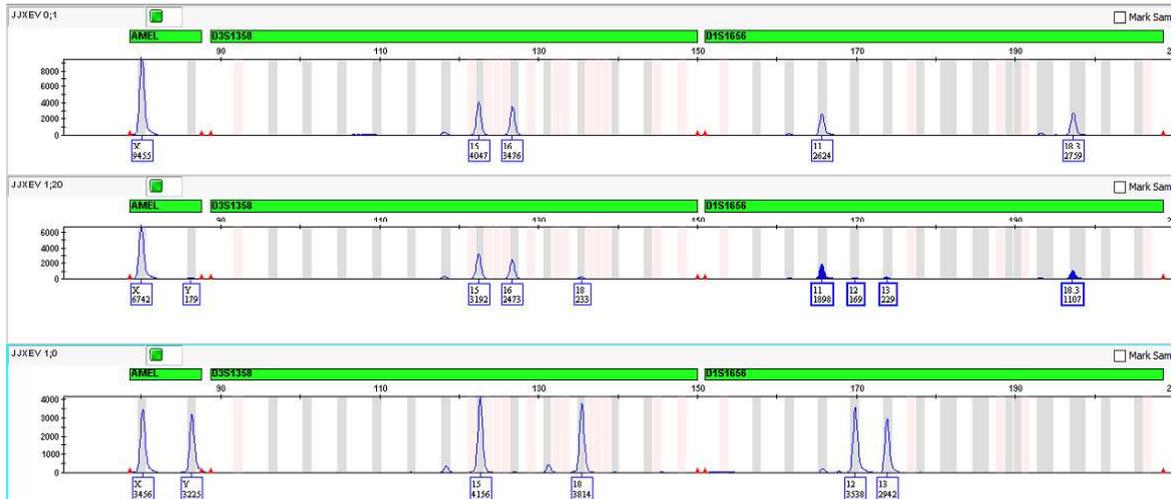


Figura 3 – Fragmento do perfil da doadora feminina (EV), do perfil de mistura (JJXEV 1:20) e do perfil do doador masculino (JJ). No perfil genético de mistura é possível verificar a presença de alelos de ambos os doadores.

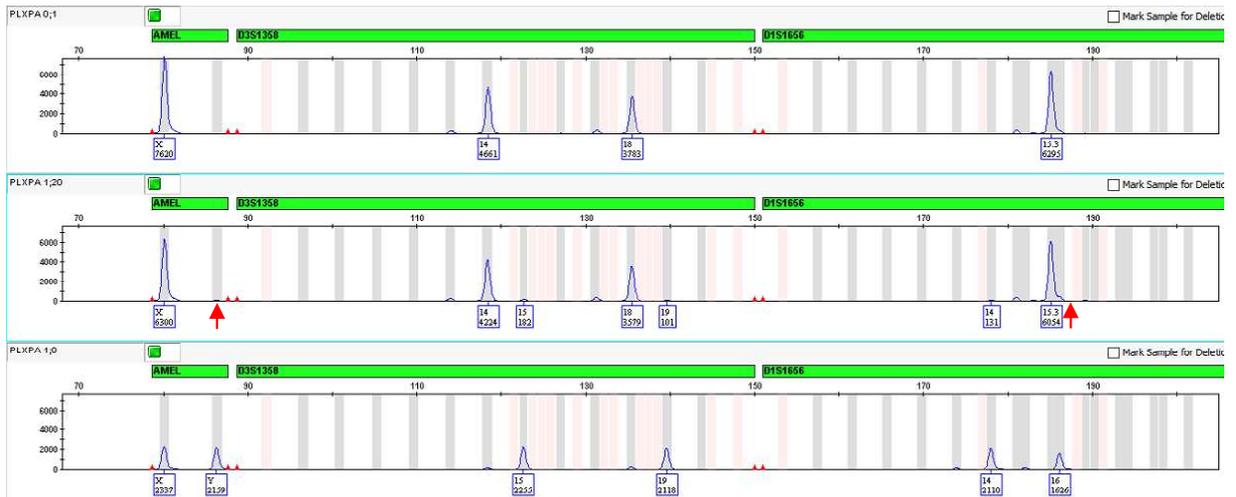


Figura 4 – Fragmento do perfil da doadora feminina (PA), do perfil de mistura (PLXPA 1:20) e do perfil do doador masculino (PL). No perfil genético de mistura as setas vermelhas evidenciam as regiões onde os alelos masculinos não foram amplificados.

A partir dos dados obtidos a partir da análise de amostras de mistura é possível: relacionar os valores correspondentes à razão entre as alturas observadas para os alelos de cada contribuinte, com a sua proporção alvo, de acordo com os resultados obtidos na quantificação; avaliar a ausência de alelos de cada um deles para cada uma das razões testadas, incluindo neste caso, alelos em eventual posição de *stutter* na mistura que estejam com alturas muito baixas; e até que proporção é possível obter alelos de ambos contribuintes, bem como as possibilidades de individualizar cada contribuição genética no perfil obtido, a fim de obter perfis passíveis de confrontos para ambos os contribuintes.

Caso no estudo de misturas, o laboratório busque relacionar as proporções calculadas na etapa de quantificação com os resultados observados a partir da análise de eletroferogramas, o laboratório poderá determinar que o processamento de amostras de mistura oriundas de crimes com vítima do sexo feminino e autor do sexo masculino e vice-versa, poderá ser interrompido na etapa de quantificação, sempre que as proporções indicadas pelo equipamento estejam fora dos limites do laboratório estabelecidos pelo estudo de validação ou quando não houver material masculino detectado na quantificação. Outro aspecto interessante é que conhecendo as limitações de seus equipamentos e reagentes, o laboratório é capaz de identificar equipamentos e *kits* mais sensíveis às possíveis desproporções entre contribuintes em uma amostra de mistura, muito comum na análise de amostras criminais.

Avaliação de contaminação

O Limiar de Detecção calculado a partir da análise do ruído basal dos Controles Negativos durante o Estudo de Sensibilidade e Efeitos Estocásticos deverá ser aplicado ao método de análise dos Controles Negativos no software, a fim de verificar a presença de alelos que pudessem ser provenientes de contaminação exógena e o eventual aparecimento de alelos deverá ser explicado.

Os perfis genéticos obtidos a partir dos controles negativos amplificados foram avaliados, tendo sido detectado o aparecimento de picos aleatórios e isolados, acima do limiar aplicado no software de análise, em 3 das 59 replicatas. A Figura 5 apresenta um exemplo de pico detectado na replicata CN 18.1, alelo 12 do STR *CSF1PO* que, caso tivesse aparecido no perfil como um todo, poderia indicar uma contaminação externa. Neste ponto, cabe ressaltar que a presença de picos aleatórios e esporádicos no perfil genético não significa necessariamente uma contaminação oriunda de materiais biológicos de pessoas ou outras amostras, e pode ser decorrente, inclusive, dos próprios plásticos utilizados durante o processamento das amostras (Neureuther et al, 2014).

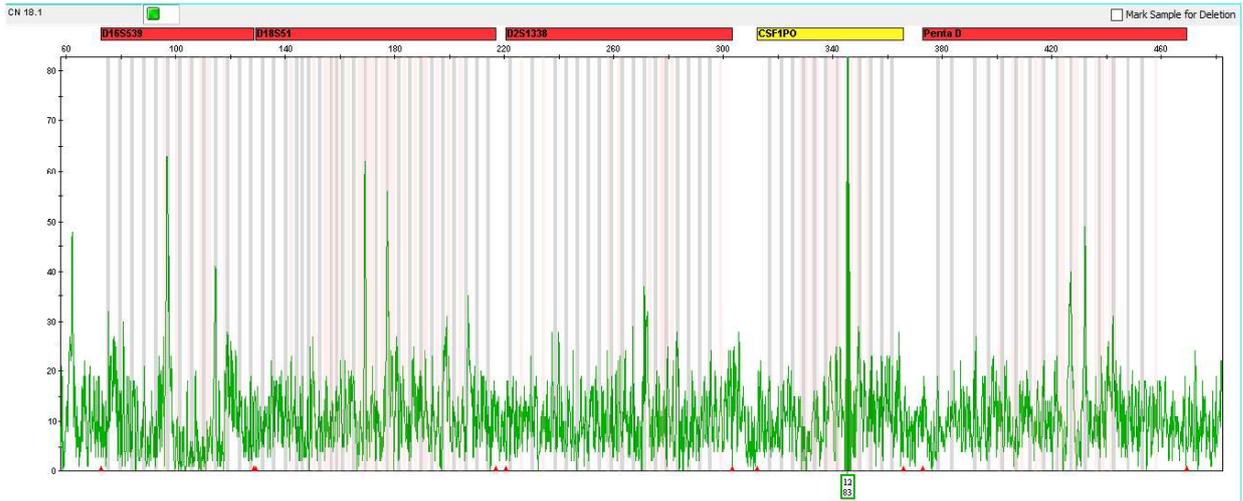


Figura 5 – Pico detectado na amostra CN 18.1 no alelo 12 do STR CSF1PO.

Fluxograma de Processamento Laboratorial

A fim de otimizar o tempo e recursos investidos para a condução dos ensaios que compõem o Estudo de Validação Interna, foi elaborado um fluxograma de processamento laboratorial apresentado na Figura 6, que contempla os processos anteriormente descritos de maneira resumida. O Fluxograma foi elaborado de forma a contemplar os ensaios descritos no presente trabalho, devendo os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade e a amplificação dos controles negativos para verificação do ruído de fundo serem realizados preferencialmente em datas diferentes, para que as variações ambientais próprias do laboratório possam ser consideradas durante a análise dos resultados derivados de cada um desses estudos. Ressalta-se neste ponto, a necessidade de que as etapas de quantificação e amplificação das amostras dos diferentes ensaios sejam realizadas em replicatas, sendo 5 replicatas uma quantidade indicada para que as variações sejam contempladas com grau de confiança razoável para a etapa de amplificação de DNA (ENFSI, 2010).

Conforme anteriormente descrito, a precisão alcançada nas concentrações e proporções desejadas nos ensaios está diretamente atrelada à qualidade das pipetas utilizadas e a um sistema de quantificação bem estabelecido, por isso é necessário que estes pontos sejam verificados antes do início dos ensaios. Na etapa de quantificação a avaliação dos valores obtidos em cada replicata irá possibilitar um cálculo mais preciso para a preparação das alíquotas com as concentrações desejadas. Após cada bateria de quantificação é necessária a avaliação das

quantidades para os cálculos necessários, mas também para avaliação dos indicadores de qualidade como degradação e inibição a fim de avaliar se as amostras apresentam algum desses parâmetros alterados que possa interromper os experimentos. O mesmo procedimento de checagem deverá ser realizado ao fim de cada bateria de amplificação e genotipagem, para que o analista realize uma análise crítica preliminar dos eletroferogramas, a fim de verificar comportamentos distintos do esperado no perfil genético das amostras que poderão prejudicar ou invalidar os ensaios posteriores.

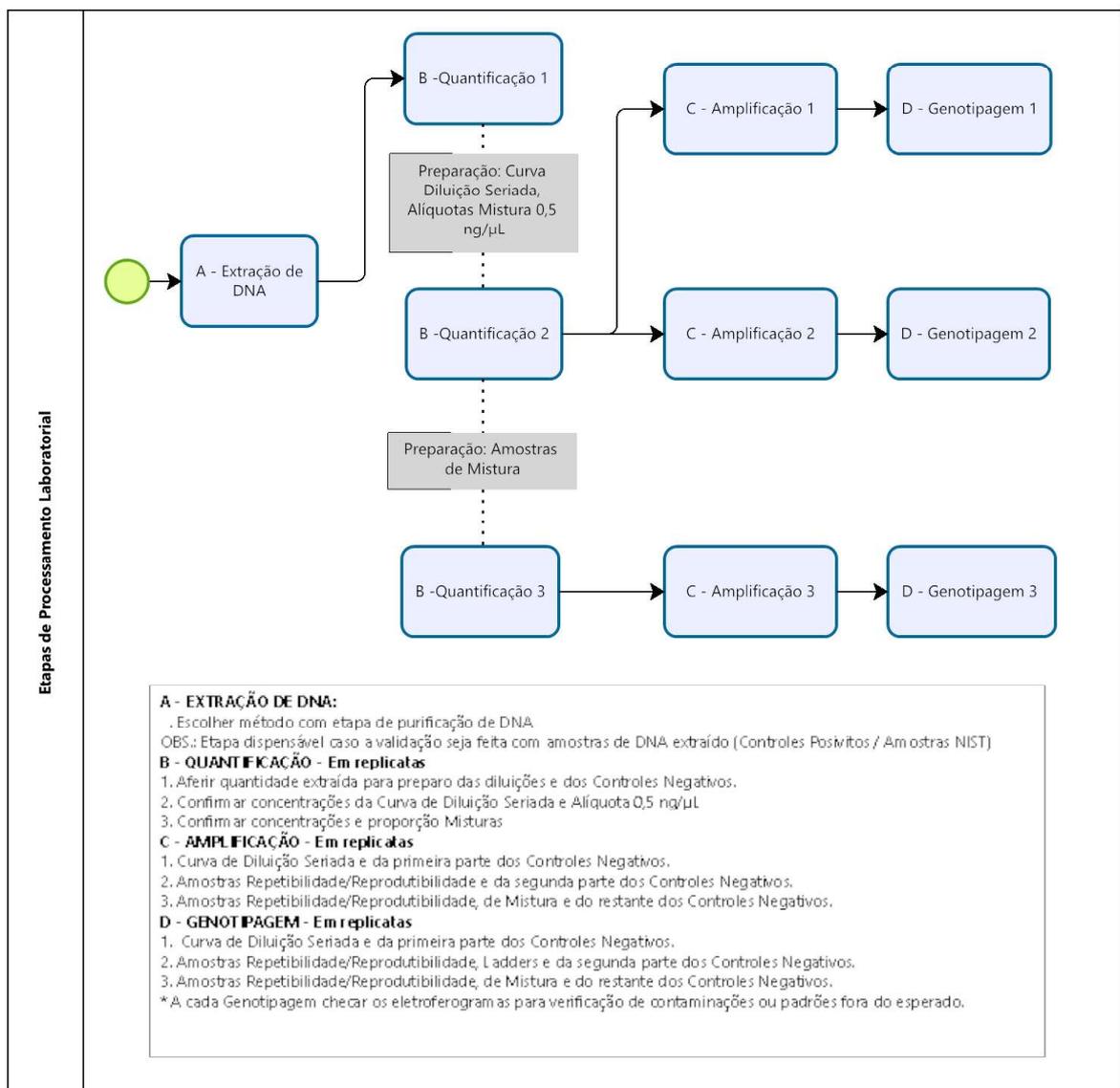


Figura 6 - Fluxograma de Processamento Laboratorial dos ensaios sugeridos para a condução do Estudo de Validação Interna para kits de amplificação e genotipagem de STRs autossômicos.

Conclusões

Este estudo descreve uma avaliação crítica das metodologias e resultados obtidos a partir do Estudo de Validação Interna realizado a partir do processamento de Amostras de Referência coletada da mucosa oral e de um Controle Positivo, utilizando para amplificação e genotipagem das amostras o kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega Corporation), e cuja eletroforese, ocorreu no Sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer, com auxílio do 3500 Series Data Collection Software v.3.0 (*Applied Biosystems*).

A realização do Estudo de Validação Interna em um Laboratório de Genética Forense demanda um tempo prévio dedicado ao planejamento e aprofundamento em cada um dos ensaios envolvidos, a fim de evitar retrabalho e para que sejam realizados os registros necessários. Para que o estudo possa ser conduzido da forma ideal, a calibração dos equipamentos, em especial das pipetas utilizadas, e um sistema de quantificação de DNA em funcionamento são necessários para a obtenção de dados precisos e reprodutíveis.

A escolha das amostras é etapa essencial, tendo em vista que as suas características influenciam na quantidade de dados e no perfil característico dos resultados derivados de cada um dos ensaios, sendo as Amostras de Referências bucais alternativas viáveis, que são capazes de fornecer resultados mais compatíveis com os oriundos de amostras probativas em comparação com os obtidos de amostras purificadas industrialmente como Controles Positivos de *kits*, já que passam pelas mesmas etapas de processamento laboratorial.

O estudo de sensibilidade deve ser conduzido e analisado de acordo com os critérios que mais se adequem à realidade do laboratório, sendo de suma importância que dele se derivem os limiares utilizados pelo laboratório quando da análise de eletroferogramas, incluindo a análise das eventuais perdas alélicas, efeitos estocásticos típicos de amostras com baixa concentração de DNA e o perfil esperado de *stutters*. Para isso, a utilização da curva de diluição seriada preparada neste estudo possibilitou a determinação de uma faixa de trabalho entre 0,0625 e 1,0 ng/μL de DNA, sendo o ponto de 0,0125 ng/μL o menor ponto onde houve a amplificação do perfil completo, e ainda a altura esperada do ruído de fundo para controles negativos e amostras com DNA, bem como dos picos por canal de fluorescência e concentração de DNA além da razão entre as alturas de alelos em regiões heterozigóticas esperada de 0,7, e o comportamento esperado para *stutters*.

Os estudos de concordância e de Precisão e Exatidão confirmaram os limites estabelecidos pelo laboratório e auxiliam na verificação das variações naturalmente esperadas em perfis obtidos de replicatas de uma mesma amostra, processadas sob as mesmas ou sob distintas condições, sendo a crescente automatização dos laboratórios um fator a ser considerado nas variações utilizadas no estudo de Reprodutibilidade.

A análise de misturas é uma etapa que demanda preparação cuidadosa, a fim que se possa obter proporções mais próximas às desejadas. A inclusão de mais de uma mistura é desejável para que o laboratório obtenha resultados mais representativos e a escolha prévia de amostras que não possuam muitos alelos coincidentes nos mesmos STRs influencia na quantidade de dados que poderão ser analisados a partir do estudo.

Agradecimentos

Pela colaboração, apoio e partilha de conhecimentos agradeço a Fernanda Rodrigues, Pedro Esmeraldo, Paulo Raimann, Marcelo Malaghini e a todos que fazem o Instituto de Genética Forense Eduardo Campos.

Referências

BENSCHOP, Corina CG, et al. Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic science international: genetics*, 2010, 4.2: 115-121.

BOAVIDA A, BOGAS V, SAMPAIO L, ET AL. PowerPlex® Fusion 6C system: internal validation study. *Forensic Sci Res*. 2018;3:130–137.

BREGU, Joli, et al. Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *Journal of forensic sciences*, 2013, 58.1: 120-129.

ENFSI DNA WORKING GROUP, et al. Recommended minimum criteria for the validation of various aspects of the DNA profiling process. Germany: European Network of Forensic Science Institute, 2010.

FEIGELSON, Heather Spencer et al. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, v. 10, n. 9, p. 1005-1008, 2001.

FLORES, Shahida, et al. Internal validation of the GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 10: 33-39.

GILDER JR, DOOM TE, INMAN K, KRANE DE: Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007, 52:97-101.

GRGICAK CM, URBAN ZM, COTTON RW. Investigation of reproducibility and error associated with qPCR methods using Quantifiler duo DNA quantification kit. *J Forensic Sci* 2010;55:1331–9.

INVESTIGATOR® QUANTIPLEX® PRO RGQ KIT HANDBOOK.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=901fab34-fae8-4247-bc24-057840b27c50&lang=em> (acesso em 08/09/2021).

LECLAIR, Benoît; SCHOLL, Tom. Application of automation and information systems to forensic genetic specimen processing. *Expert review of molecular diagnostics*, 2005, 5.2: 241-250.

LUDEMAN, M.J., ZHONG, C., MULERO, J.J. ET AL Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *Int J Legal Med* 132, 1555–1573 (2018).

MARTIN G. ENSEBERGER, KRISTY A. LENZ, LEARDEN K. MATTHIES, GREGORY M. HADINOTO, JOHN E. SCHIENMAN, ANGELA J. PRZECH, MICHAEL W. MORGANTI, DANIEL T. RENSTROM, VICTORIA M. BAKER, KORI M. GAWRYS, MARLIJN HOOGENDOORN, CAROLYN R. STEFFEN, PABLO MARTÍN, ANTONIO ALONSO, HOPE R. OLSON, CYNTHIA J. SPRECHER, DOUGLAS R. STORTS, Developmental validation of the PowerPlex® Fusion 6C System, *Forensic Science*

International: Genetics, Volume 21, 2016, Pages 134-144, ISSN 1872-4973, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.011>.

PROMEGA CORPORATION. Internal Validation Guide of Autosomal STR Systems for Forensic Laboratories. 2013.

RIMAN, S., IYER, H., BORSUK, L. A., & VALLONE, P. M. (2020). Understanding the characteristics of sequence-based single-source DNA profiles. *Forensic Science International: Genetics*, 44, 102192.

SHRIVASTAVA A, GUPTA VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *ChronYoung Sci* 2011;2:21-5.

SONJA KLEIN (CA DOJ) presentation at the CAC meeting (Sacramento, CA), October 25, 2011: "Approaches to estimating a stochastic threshold" (acesso em 02/09/2021: https://strbase.nist.gov/training/MixtureWebcast/2_ InterpretationFundamentals-Butler.pdf).

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS. Interpretation guidelines for autosomal STR typing by forensic DNA testing laboratories. 2017.

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS. Validation guidelines for DNA analysis methods. 2016.

5 CONCLUSÕES

A partir da análise dos trabalhos publicados na literatura foi possível reunir as metodologias aplicáveis para a condução dos ensaios necessários à realização do Estudo de Validação Interna em Laboratórios de Genética Forense, sendo possível a construção de um Fluxograma para Realização dos Procedimentos Laboratoriais necessários. As discussões realizadas puderam levantar informações essenciais à escolha de amostras, métodos de processamento e de cálculo que sejam compatíveis com a realidade da análise de eletroferogramas obtidos a partir de amostras forenses na casuística do laboratório. Estudos posteriores de Validação Interna poderão adicionar informações importantes quanto à metodologia e forma de análise escolhidas, a fim de enriquecer as informações disponíveis sobre o tema.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Curso de Perícia em Genética Forense: Sistema de Gestão de Qualidade. (Carga Horária: 76h). Secretaria Nacional de Segurança Pública, SENASP, Brasil.
- Curso Básico sobre Bancos de Dados de DNA e a Lei nº 12.654/2012. (Carga horária: 50h). Ministério da Justiça, MJ, Brasil.
- Treinamento Fluxo de Trabalho em Identificação Humana. (Carga horária: 30h). *Thermo Fisher Scientific*, THERMO FISHER, Estados Unidos.
- Treinamento em Coleta, Manuseio, Acondicionamento e Transporte de Materiais Biológicos para Perícias em Genética Forense.
- Treinamento sobre o equipamento *QIAgility*.
- Treinamento online básico sobre o *Software GeneMapper* IDX v1.6.
- Curso de Coordenação Pedagógica e Oficinas Práticas Pedagógicas no Âmbito da ACIDES. (Carga horária: 60h). Secretaria de Defesa Social de Pernambuco, SDS/PE, Brasil.
- Palestrante no Minicurso Genética Forense (I Encontro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco).
- Conteudista no Curso de Coleta de DNA de Condenados, SENASP (em andamento).

REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratório de teste e calibração. Rio de Janeiro: ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1999.

ANSELMO, M.A.; JACQUES, G.S. Banco de perfil genético deve se tornar realidade no país. Revista Consultor Jurídico, 2 de junho de 2012.

BOARD, DNA Advisory. Quality assurance standards DNA databasing laboratories. (2008). Forensic Science Communications, 10.

BRASIL Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012. Altera as Leis nº 12.037, de 1º de outubro de 2009, e 7.210, de 11 de julho de 1984 Lei de Execução Penal, para prever a coleta de perfil genético como forma de identificação criminal, e dá outras providências. Brasília, DOU de 29.5.2012.

BROWN, T.A. Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma introdução. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. p.376. 2001.

BUTLER, J.M., TOMSEY, C.S., KLINE, M.C. (2004) Can the validation process in forensic DNA typing be standardized? Proceedings of the 15th International Symposium on Human Identification. Available at <http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp15proc/oralpresentations/butler.pdf>.

BUTLER, J. M. Forensic DNA typing. 2nd ed. San Diego: Academic Press; cap. 1, p.1-13, cap.2, p. 23-30, cap.3, p. 42-45, cap. 5, p. 85-92, cap.12, p. 318-322, 2005.

BUTLER JM, Degraded DNA. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: methodology. Academic Press; San Diego, CA: 2012. pp. 293–309.

COMITÊ GESTOR da RIBPG. RESOLUÇÃO Nº 5, de 29 de maio de 2014. DOU de 07/10/2014 (nº 193, Seção 1, pág. 41). Brasília, 2014.

CORMIER, K.; CALANDRO, L.; REEDER, D. Evolution of the quality assurance documents for DNA laboratories. *Forensic Magazine*, 2: 1–3. 2005.

CROUSE, C. A. Implementation of forensic DNA analysis on casework evidence at the Palm Beach County Sheriff's office crime laboratory: historical perspective. *Croat Med J.*;42:247-5. 2001.

DUMACHE R, CIOCAN V, MURESAN C, ENACHE A (2016) Molecular DNA Analysis in Forensic Identification. *Clin Lab* 62:245–248.

DWYER, JIM; NEUFELD, PETER J.; SCHECK, BARRY. *Actual innocence: Five days to execution and other dispatches from the wrongly convicted*. Doubleday Books, 2000.

FEUK, Lars; CARSON, Andrew R.; SCHERER, Stephen W. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7.2: 85-97.

FREITAS, JORGE M. Validação de Ensaio em Genética Forense. In: *Introdução à Genética Forense – Organizadores Claudemir Rodrigues Dias Filho, Eduardo Leal Rodrigues, Marcelo Malaghini, Pablo Abdon da Costa Francez e Rodrigo Grazinoli Garrido – 3ª.Ed.– Campinas: Editora Millennium, 2020.p.245- 256.*

GARRIDO, R.G.; RODRIGUES, E.L. *Ciência Forense. Da cena do crime ao laboratório de DNA*. Rio de Janeiro: Ed. Projeto Cultural. 256 p. 2014.

GETTINGS, K. B. Yfiler Plus Kit, Improved Haplotype Discrimination Using “Rapidly Mutating” Y-STR Markers in a Large Multiplex Kit. (2014). Disponível: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/YfilerPlus_HotTopics%20Workshop_MAA_FS_2014.pdf> Acesso em: 19 de janeiro 2021.

GROSSWEILER, L. CODIS and NDIS Update (2021) Disponível: <https://www.ishinews.com/events/codis-and-ndis-update-4/> > Acesso em: 05 de outubro 2021.

GUIMARÃES, M. A.; SOARES-VIEIRA, J. A.; SILVA, R. H. A.; Evison, M. P. A standard procedure for accommodating forensic anthropological and genetic analysis of decomposing human remains from tropical climates. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2:165–166. 2009.

HARES, D. R. Expanding the CODIS Core Loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 52-54, 2011.

HILL, Carolyn R., et al. Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *Journal of forensic sciences*, 2008, 53.1: 73-80.

HOLLAND, M; MELTON, T.; HOLLAND, C. Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practices and Future Potential. *Forensic DNA Analysis, Current Practices and Emerging Technologies*, NW: CRC Press, pp. 249-278, 2013.

ILAC - INTERNATIONAL LABORATORY ACCREDITATION COOPERATION. Guidelines for Forensic Science Laboratories. ILAC-G19:2002. 2002. 14p.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). Brasil. Vocabulário Internacional de Metrologia - conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012) [Internet]. 1 ed. Luso-Brasileira; 2012. Acessível em: http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf

JACQUES, G. S.; MINERVINO, A. C. Aspectos éticos e legais dos bancos de dados de perfis genéticos. *Perícia Federal*, Brasília, 26: 17-20. 2007.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 314: 67–7, 1985a.

JEFFREYS, A. J.; BROOKFIELD, J. F.; SEMEONOFF, R. Positive identification of na

immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317:818–819. 1985b.

JOBIM, L. F.; COSTA, R. L.; SILVA, M. *Identificação Humana*. 2. ed. Campinas: Millenium Editora, v. 2. 302p. 2006.

JOBLING, M. A. Curiosity in the genes: the DNA fingerprinting story *Investigative Genetics*, 4:20. 2013.

KOBACHUK, L.D.G. Estudo de frequências alélicas de dez locos STRs do cromossomo X na população do estado do Paraná e sua contribuição na identificação humana. 2012.

LAKSHMI, J. B., TEJASVI, M. L. A., AVINASH, A., CHANCHALA, H. P., TALWADE, P., AFROZ, M. M., ... & SRISHA, V. (2021). DNA Profiling in Forensic Science: A Review. *Global Medical Genetics*.

LAPPALAINEN, Tuuli, et al. Genomic analysis in the age of human genome sequencing. *Cell*, 2019, 177.1: 70-84.

MOREIRA, L. M. 2015B. Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. In: Prosdócimi, F. & Moreira, L. M. *Genômica comparativa*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. Vol. 1. Pp. 81- 100.

MORETI, T. *Identificação humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina*. 145f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

NBR ISO 9000/2005 - Sistema de Gestão da Qualidade: Fundamentos e Vocabulário. Rio de Janeiro, ABNT, 2005.

PARSON, Walther. Age estimation with DNA: from forensic DNA fingerprinting to forensic (epi) genomics: a mini-review. *Gerontology*, 2018, 64.4: 326-332.

PENA, S. D. J. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas 20, 447-460, 2005.

ROEWER, L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Roewer Investigative Genetics 4, 22, 2013.

SCHNEIDER, Peter M. Scientific standards for studies in forensic genetics. Forensic science international, 2007, 165.2-3: 238-243.

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS. Interpretation guidelines for autosomal STR typing by forensic DNA testing laboratories. 2017.

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS. Validation guidelines for DNA analysis methods. 2016.

THOMPSON, Robyn; ZOPPIS, Silvia; MCCORD, Bruce. An Overview of DNA Typing Methods for Human Identification: Past, Present, and Future. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2012, 830: 3-16.

TWGDAM - Technical Working Group on DNA Analysis Methods. Guidelines for a Quality Assurance Program for DNA Analysis. Crime Laboratory Digest, Vol. 18, p. 44-75. 1991.

TWGDAM - Technical Working Group on DNA Analysis Methods. Guidelines for a Quality Assurance Program for DNA Analysis. Crime Laboratory Digest, Vol. 22, p. 21-43. 1995.

USDOJ - United States Department of Justice. Federal Bureau of Investigation. DNA Advisory Board. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. 1998.

VELHO, J. A.; GEISER, G. C.; ESPÍNDULA, A. Ciências Forenses, 3. ed. São Paulo: Millenium, 2017.

WILLEMS, Thomas, et al. The landscape of human STR variation. *Genome research*, 2014, 24.11: 1894-1904.

WOLFF, R.; NAKAMURA, Y.; ODELBERG, S.; SHIANG, R.; WHITE, R. Generation of variability at VNTR loci in human DNA. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications* 58, 20-38, Birkhäuser Basel: Springer. 1991.

APÊNDICE A – DADOS DE QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ENSAIO DE MISTURAS

Result Summary		Quality Assessment					
Well	Sample Name	Mixture Index	Mixture Threshold	Degradation Index	Degradation Threshold	Inhibition Index	Inhibition Threshold
A2	No Template Control	0,00	Below Threshold	Not Applicable	Below Threshold	-1,70	Possible Inhibition
B2	No Template Control	0,00	Below Threshold	Not Applicable	Possible Degradation	-0,33	Below Threshold
C2	PLXPA 1:0	1,25	Below Threshold	1,25	Below Threshold	-0,19	Below Threshold
D2	PLXPA 40:1	1,08	Below Threshold	1,09	Below Threshold	-0,10	Below Threshold
E2	PLXPA 20:1	0,90	Below Threshold	0,91	Below Threshold	-0,09	Below Threshold
F2	PLXPA 10:1	1,04	Below Threshold	0,99	Below Threshold	-0,18	Below Threshold
G2	PLXPA 4:1	1,23	Below Threshold	1,06	Below Threshold	-0,14	Below Threshold
H2	PLXPA 2:1	0,99	Below Threshold	0,87	Below Threshold	-0,36	Below Threshold
A3	PLXPA 1:1	1,45	Below Threshold	1,29	Below Threshold	-0,05	Below Threshold
B3	PLXPA 1:2	2,95	Possible Mixture	1,34	Below Threshold	-0,02	Below Threshold
C3	PLXPA 1:4	5,40	Possible Mixture	1,41	Below Threshold	-0,20	Below Threshold
D3	PLXPA 1:10	12,51	Possible Mixture	2,00	Below Threshold	-0,23	Below Threshold
E3	PLXPA 1:20	21,28	Possible Mixture	1,55	Below Threshold	-0,22	Below Threshold
F3	PLXPA 1:40	39,42	Possible Mixture	1,52	Below Threshold	0,05	Below Threshold
G3	PLXPA 0:1	22183,86	Possible Mixture	1,43	Below Threshold	-0,21	Below Threshold
H3	JJXEV 1:0	1,08	Below Threshold	1,18	Below Threshold	-0,33	Below Threshold
A4	JJXEV 40:1	1,11	Below Threshold	1,22	Below Threshold	-0,04	Below Threshold
B4	JJXEV 20:1	1,19	Below Threshold	1,17	Below Threshold	-0,10	Below Threshold
C4	JJXEV 10:1	1,21	Below Threshold	1,17	Below Threshold	-0,19	Below Threshold
D4	JJXEV 4:1	1,30	Below Threshold	1,27	Below Threshold	-0,12	Below Threshold
E4	JJXEV 2:1	1,63	Below Threshold	1,45	Below Threshold	-0,03	Below Threshold
F4	JJXEV 1:1	2,08	Possible Mixture	1,71	Below Threshold	-0,04	Below Threshold
G4	JJXEV 1:2	2,83	Possible Mixture	1,98	Below Threshold	-0,01	Below Threshold
H4	JJXEV 1:4	3,28	Possible Mixture	2,09	Below Threshold	-0,29	Below Threshold
A5	JJXEV 1:10	10,20	Possible Mixture	3,58	Below Threshold	-0,19	Below Threshold
B5	JJXEV 1:20	21,18	Possible Mixture	4,21	Below Threshold	-0,24	Below Threshold
C5	JJXEV 1:40	39,56	Possible Mixture	4,02	Below Threshold	-0,19	Below Threshold
D5	JJXEV 0:1	0,00	Below Threshold	4,60	Below Threshold	-0,09	Below Threshold