

# INTERNAL VALIDATION OF DNA EXTRACTION FROM HUMAN BLOOD REFERENCE SAMPLES USING CHELEX® 100 RESIN

## VALIDAÇÃO INTERNA DA EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE REFERÊNCIA DE SANGUE HUMANO UTILIZANDO A RESINA CHELEX® 100

## VALIDACIÓN INTERNA DE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE REFERENCIA DE SANGRE HUMANA UTILIZANDO LA RESINA CHELEX® 100

**Marlon Anselmo Duarte da Costa<sup>1</sup>, Apoena de Oliveira Lopes<sup>2</sup>, Rafael de Liz<sup>3</sup>, Alexandro Mangueira Lima de Assis<sup>4</sup>, Diana Vilas Boas e Silva<sup>5</sup>, Luiz Guilherme Barros Cocentino<sup>6</sup>**

**1.** Perito Criminal Federal lotado no Serviço de Perícias em Genética Forense do Instituto Nacional de Criminalística. Possui graduação em Farmácia e mestrado em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB), com especializações em Identificação Humana e em Genética Forense, ambas pela Academia Nacional de Polícia (ANP).

**Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/2937648832967253>

**2.** Perito Criminal Federal desde 2009, atuando principalmente nas áreas de Meio Ambiente, Documentoscopia e Genética Forense. É especialista em Documentoscopia (2014) e em Genética Forense (2022), ambas pela Academia Nacional de Polícia. Atualmente lotado no Serviço de Perícias em Genética Forense do Instituto Nacional de Criminalística.

**Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/4854072719952407>

**3.** Perito Criminal Federal desde 2019. Possui graduação em Farmácia (2004) com habilitação em Análises Clínicas (2006) pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); especialização em Imunologia e Microbiologia pela Faculdade Única (2019), mestrado (2007) e doutorado (2012) em Farmácia, área de concentração Fármaco-Medicamentos, pela UFSC. Pós-Doutorado (2014) pelo Instituto Nacional de Pesquisa Científica – Laval, Canadá (2014) e Pós-Doutorado pelo Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (2015). Tem experiência nas áreas de Imunologia, Biologia Celular e Criminalística com ênfase em Genética Forense e Fortalecimento da Cadeia de Custódia.

**Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/0593388653233347>

**4.** Perito Criminal Federal desde 2003, atualmente lotado no Setor Técnico-Científico da Polícia Federal em Alagoas. Graduado em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba, com doutorado em Química e Biotecnologia, mestrado em Genética e especialização em Genética Forense pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Docente permanente do Programa de Pós-graduação em Materiais do Centro de Tecnologia da UFAL e pesquisador do Laboratório de Eletroquímica, Polímeros e Ciências Forenses da UFAL (@lepfor\_ufal). Professor convidado da disciplina “Perícia: Justiça pela Ciência” ofertada pela Faculdade de Direito da Universidade de Brasília. Atua nos seguintes temas: Genética Forense, Química Forense, Identificação Humana, Impressões Digitais, DNA de Toque, Documentoscopia Forense, Criminalística e na pesquisa de materiais avançados com aplicação inovadora em Ciências Forenses. **Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/4184234863416619>

**5.** Perita Criminal Federal desde 2013, atualmente lotada no Serviço de Perícias em Genética Forense do Instituto Nacional de Criminalística (INC). Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (2005) e mestrado em Biologia Celular pela Universidade Federal de Minas Gerais (2008). **Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/7415048251831100>

**6.** Perito Criminal Federal com atuações nas áreas de Meio Ambiente, Local de Crime, Reproduções Simuladas e Genética Forense. Possui graduação em Agronomia pela Universidade de Brasília (2002), especializações em Geoprocessamento também pela Universidade de Brasília (2003) e em Genética Forense pela Academia Nacional de Polícia (2022).

**Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/8568772371972167>



# Resumo

O processo de extração de DNA é uma etapa crucial para o exame de identificação genética. O presente estudo tem por objetivo verificar a eficiência do protocolo de extração por meio da resina Chelex® 100 em amostras de referência de sangue com vistas à obtenção de DNA em quantidade e qualidade suficientes para a genotipagem, sem a necessidade de quantificação prévia. Foram utilizadas amostras de sangue total de 6 (seis) voluntários e, posteriormente, coletados suabes (por meio de imersão em tubo com sangue) para proceder à metodologia de extração por Chelex® 100. Em seguida, os produtos de extração foram quantificados, efetuou-se o cálculo da média e desvio padrão dos valores encontrados e, logo após, realizou-se a amplificação de todos os eluídos com o volume médio obtido no cálculo. Foi analisada a qualidade dos eletroferogramas das amostras amplificadas e calculada a taxa de retrabalho para a amostragem do estudo (razão do número de amostras com necessidade de reamplificação pelo número de amostras totais). Os resultados encontrados demonstraram que a utilização de 1 µL do DNA extraído por Chelex® 100, sem diluição, foi suficiente para a obtenção de perfis genéticos interpretáveis. Por fim, foi possível demonstrar que a etapa experimental da validação da extração de DNA a partir de suabes com sangue de referência por Chelex® 100 encontra-se concluída no Serviço de Perícias em Genética Forense da Polícia Federal, podendo, assim que completada as demais etapas documentais da validação, ser realizada com celeridade e eficiência, uma vez que o DNA obtido apresentou quantidade e qualidade suficientes para ser amplificado e genotipado, de acordo com os requisitos do Laboratório.

**Palavras-chave:** Extração, DNA Forense, Sangue, Chelex, RMI, Validação.

## Abstract

The DNA extraction process is a crucial step in the genetic identification test. The present study aims to verify the efficiency of the extraction protocol using Chelex® 100 resin in blood reference samples in order to obtain DNA in sufficient quantity and quality for genotyping, without the need for quantification procedures. Blood samples from 6 (six) volunteers were used and, subsequently, swabs were collected (by immersion in the tube containing blood) to carry out the extraction procedure by Chelex® 100. Then, the quantification of each extraction product, calculation of the average and standard deviation of the values were found and, thereafter, amplification of all eluates with the average volume obtained in the calculation was performed. The quality of the electropherograms of amplified samples was analyzed and the rework rate for the study sample was calculated (number of samples to be reamplified divided by the number of total samples). The results showed that the use of 1 µL of DNA extracted by Chelex method was sufficient to obtain reference genetic profiles. Finally, we demonstrated that the DNA extraction in swabs with blood reference samples by Chelex® 100 has the experimental stage of its validation concluded at the Laboratory of Forensic Genetics of the Brazilian Federal Police and can, once validated, be performed with speed and efficiency, since the DNA obtained presented sufficient quantity and quality to be amplified and genotyped, in accordance with the Laboratory requirements.

**Keywords:** Extraction, Forensic DNA, Blood, Chelex, Validation.

## Resumen

El proceso de extracción de ADN es un paso crucial en la prueba de identificación genética. Este estudio tiene como objetivo verificar la eficiencia del protocolo de extracción mediante resina Chelex® 100 en muestras de sangre de referencia para obtener ADN en cantidad y calidad suficiente para el genotipado, sin necesidad de procedimientos de cuantificación. Se utilizaron muestras de sangre de 6 (seis) voluntarios y, posteriormente, se recolectaron hisopos (por inmersión en el tubo con sangre) para realizar el procedimiento de extracción mediante Chelex® 100. Luego, se realizó la cuantificación de cada producto de extracción, cálculo del promedio y desviación estándar de los valores encontrados y, después, amplificación de todos los eluatos con el volumen medio obtenido en el cálculo. Se analizó la calidad de los electroferogramas de las muestras amplificadas y se calculó la tasa de retrabajo de la muestra del estudio (número de muestras que necesitaban reamplificación dividido por el número de muestras totales). Los resultados encontrados mostraron que el uso de 1 µL de ADN extraído por Chelex, sin dilución, fue suficiente para obtener perfiles genéticos de referencia. Finalmente, demostramos que la extracción de ADN a partir de hisopos con sangre de referencia utilizando Chelex® 100 ha alcanzado la etapa de validación experimental culminada en el Servicio Pericial de Genética Forense de la Policía Federal de Brasil, y puede, una vez validada, realizarse con rapidez y eficiencia, ya que el ADN obtenido fue en cantidad y calidad suficiente para ser amplificado y genotipado, de acuerdo con los requerimientos del Laboratorio.

**Palabras clave:** Extracción, ADN Forense, Sangre, Chelex, RMI, Validación.



## 1.Introdução

A Genética Forense tem apresentado importância crescente nos cenários de investigação criminal; identificação humana, determinação de espécies animais e de plantas para fins forenses; além de aplicações com impacto social, envolvendo a identificação de pessoas desaparecidas. Nesse contexto, o processamento de amostras biológicas visando à obtenção de perfil genético inclui, regra geral, as etapas de amostragem, extração, quantificação, amplificação e genotipagem. Dentre essas fases, a extração de DNA tem se mostrado etapa crucial para que se proceda aos passos seguintes do exame de identificação genética (DIAS FILHO *et al.*, 2020).

A extração de DNA da amostra é uma etapa importante do processamento do material biológico em análise e tem por objetivo disponibilizar DNA em quantidade e pureza adequadas para as próximas etapas do processamento da amostra (BUTLER, 2009). Diversas metodologias de extração estão disponíveis para utilização em laboratórios forenses, como por exemplo aquelas baseadas em fenol-clorofórmio, sílica ou separação magnética, cuja escolha depende das características da amostra a ser processada ou das rotinas laboratoriais estabelecidas (SINGH; KUMARI; IYENGAR, 2018). Dentre as metodologias de extração disponíveis para uso em amostras de referência, destaca-se o método que utiliza a resina Chelex (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991).

O Chelex é uma resina composta de copolímeros de estireno-divinilbenzeno contendo grupos pareados de íons iminodiacetato, que atuam como quelantes de íons polivalentes, com alta seletividade por íons divalentes (BIO-RAD LABORATORIES, 2017), sendo útil ao se ligar a íons  $Mg^{2+}$ , que são cofatores de DNAses, resultando na inibição da degradação do DNA de interesse (BUTLER, 2009); além disso, há indícios de que a resina possui a capacidade de evitar a degradação do DNA quando uma amostra biológica é submetida à ebulição (LEE; MCCORD; BUEL, 2014). O método que utiliza a resina Chelex é uma metodologia de extração rápida de DNA, de baixo custo, a qual não requer múltiplas transferências de tubos e não utiliza solventes orgânicos tóxicos, como o fenol-clorofórmio (PHILLIPS; MCCALLUM; WELCH, 2012). Por outro lado, a resina Chelex também pode atuar como um inibidor da reação em cadeia da polimerase (PCR), uma vez que possui afinidade pelos íons magnésio, necessários para o funcionamento da Taq polimerase (WILLARD; LEE; HOLLAND, 1998); dessa forma, é importante que a resina seja separada do eluído previamente à amplificação na reação de PCR.

Atualmente, o Serviço de Perícias em Genética Forense (SEPGEF) do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal realiza a extração de DNA de referência a partir de amostras coletadas por suabe oral utilizando resina Chelex® 100, cujo método já está validado. No entanto, outros tipos de amostras de referência podem ser objeto de análise pelo SEPGEF. Segundo o Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de

Perfis Genéticos (RIBPG), existem diversas categorias de amostras biológicas, relacionadas com crimes ou procedimentos investigatórios, passíveis de serem inseridos no Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG) (RIBPG, 2022). Dentre essas categorias, destaca-se a de Resto Mortal Identificado (RMI), a qual compreende o perfil genético obtido de indivíduos falecidos e com identidade conhecida. De acordo com a Resolução nº 11/2019 da RIBPG, tais perfis podem ser incluídos em bancos de dados de perfis genéticos mediante determinação judicial ou solicitação da autoridade policial. Nos casos de solicitação da autoridade policial, a inclusão ocorrerá nas seguintes hipóteses: (i) quando houver ação penal proposta contra o falecido; (ii) quando o falecido estiver sendo investigado em inquérito policial, previamente instaurado, para apurar a autoria de crimes praticados mediante violência ou grave ameaça; ou (iii) quando o óbito ocorrer em decorrência de confronto armado. Além disso, a inclusão do perfil em banco de dados de perfil genético independe de solicitação de autoridade policial, membro do Ministério Público ou autoridade judiciária, caso o indivíduo possua condenação por crime doloso praticado mediante violência grave contra a pessoa; crime contra a vida; crime contra a liberdade sexual; ou crime sexual contra vulnerável (RIBPG, 2019). Nos casos de RMIs, a coleta de material biológico para obtenção do perfil genético pode-se dar por meio da coleta de sangue da cavidade cardíaca utilizando suabe estéril ou cartão FTA.

Ademais, o SEPGEF possui laboratório acreditado pela norma ISO/IEC 17025:2005 para a realização de exames de identificação e vínculo genético. Nesse sentido, a validação de novas metodologias a serem utilizadas na rotina do SEPGEF é uma exigência da referida norma, cabendo ao laboratório demonstrar que novos métodos e procedimentos produzem resultados válidos e comparáveis, antes de serem adotados em sua rotina.

Segundo Butler, validação é a demonstração de que a metodologia utilizada é robusta, reprodutível e confiável (BUTLER, 2009). O SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* - Grupo de Trabalho Científico sobre Métodos de Análise de DNA), em seu Guia de Validação para Métodos de Análise em DNA (Validation Guideline for DNA Analysis Methods), define validação como "o processo pelo qual um procedimento é avaliado para se determinar eficácia e confiabilidade dos seus resultados para análises de casuística ou banco de dados" (SWGDAM, 2016). A validação de métodos, portanto, é um importante instrumento para garantir a confiabilidade e a validade dos resultados emitidos pelo laboratório forense (GONZALEZ; BENETTI, 2022).

Dessa forma, o presente trabalho buscou realizar a validação interna da extração de DNA utilizando a resina Chelex® 100 a partir de amostras de referência de sangue coletadas por suabe, visando atestar os resultados dessa metodologia nas condições ambientais do SEPGEF.

## 2. Metodologia

### 2.1. Amostras

Amostras de cerca de 4 mL de sangue total foram coletadas, em veia periférica, de seis doadores voluntários, sendo três homens e três mulheres, Peritos Criminais Federais externos ao SEP-GEF. As amostras foram transferidas para tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A partir dos seis tubos de EDTA contendo sangue coletado dos doadores, foram embebidos o algodão de 54 suabes estéreis (Olen®, K41-0201B, Jiangsu Rongye Technology, China), sendo nove suabes de cada doador, deixando secar à temperatura ambiente por sete dias. Três peritos foram responsáveis pela etapa de extração de DNA por Chelex® 100, em dias distintos, que foi realizada em três suabes de cada um dos seis doadores.

Ressalta-se que os voluntários não receberam transfusão de sangue nas duas últimas semanas ou transfusão medular no último semestre anteriores à coleta, que não estavam em uso de medicamentos imunossupressores e que se encontravam em bom estado de saúde, não possuindo doença imunossupressora. Adicionalmente, os doadores foram informados, por meio de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que as regiões do DNA utilizadas nos exames não revelavam características físicas ou comportamentais de indivíduos, exceto determinação de gênero (feminino ou masculino), e que os perfis genéticos obtidos das amostras coletadas nessa pesquisa não seriam incluídos em Bancos de Perfis Genéticos, seguindo os preceitos éticos e legais para pesquisas envolvendo seres humanos.

### 2.2. Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Pesquisa em Ciências da Saúde – FEPECS/SES/DF – (CAAE 61749922.8.0000.5553) e, após sua aprovação, foram realizadas as análises no Laboratório de Genética Forense da Polícia Federal.

### 2.3. Extração manual de DNA por Chelex

Foi utilizado o protocolo de extração manual de DNA por Chelex® 100 descrito anteriormente por Walsh e colaboradores, com modificações (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991). O procedimento consistiu em imergir o suabe de interesse em 1 mL de água MilliQ e realizar movimentos rotacionais por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 4838 força centrífuga relativa (RCF) por 2 minutos em uma minicentrífuga de bancada (L1202 Spin, Locus, Brasil). O sobrenadante foi cuidadosamente removido, deixando cerca de 25 µL e o pellet ressuscitado nesse líquido. Em cada amostra, foram adicionados 200 µL de Chelex® 100 a 5% (Chelex 100 Resin, 100–200 mesh, Na-form, BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA), atentando-se para manter a resina homogênea previamente à pipetagem, e 2 µL de proteinase K a 20 mg/mL

(Ludwig Biotec Ltda). Após isso, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 56°C por 30 minutos em termobloco (IT-2002, Bioplus Ltda). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 10 segundos em vortex IKA® MS3 (IKA Works, Inc., Wilmington, NC), centrifugadas a 4838 RFC por 10 segundos e incubadas em banho de água fervente por 8 minutos. Por fim, as amostras extraídas foram novamente homogeneizadas em vortex por 10 segundos, centrifugadas a 4838 RFC por 2 minutos e armazenadas em freezer a -20°C.

### 2.4. Quantificação

Os produtos de extração foram quantificados no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), utilizando-se o kit Investigator® Quantiplex® Pro (Qiagen®), de acordo com protocolo validado no SEPGEF. O volume total da reação foi de 20 µL, incluindo 2 µL de extrato do DNA molde.

Após a etapa de quantificação, foi calculada a média das concentrações obtidas para as amostras. A partir da concentração média encontrada, foi calculado o volume médio, de forma a se obter quantidade próxima a 1 ng de DNA, visando à realização da etapa seguinte de amplificação. Foi retirado um volume pré-definido (volume médio calculado) de cada uma das amostras para a realização da etapa subsequente.

### 2.5. Amplificação

As amostras, após quantificação e determinação do volume médio a ser utilizado na reação, foram submetidas à amplificação utilizando o sistema comercial PowerPlex® Fusion 6C System (Promega®) realizada em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Dessa forma, o volume total da reação foi de 25 µL, incluindo 1 µL de extrato do DNA molde.

### 2.6. Genotipagem

Para a realização da genotipagem das amostras, foi realizada eletroforese capilar de fluorescência multicolorida de perfis de microssatélites amplificados (ou Short Tandem Repeats – STR) em Analisador Genético Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), segundo as instruções do fabricante. O volume total utilizado por amostra foi de 11 µL, sendo 9,5 µL de formamida Hi-Di, 0,5 µL de padrão interno de peso molecular (WEN Internal Lane Standard 500) e 1 µL de extrato do DNA molde. Os dados foram coletados por meio do software Data Collection® v3.1 (Applied Biosystems®) e, posteriormente, analisados com o programa GeneMapper® ID-X v1.6 (Applied Biosystems®).

### 2.7. Análise estatística

O cálculo das médias e desvios-padrão foram feitos por meio do Microsoft Office Excel 365. A comparação estatística entre as médias das amostras foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA).

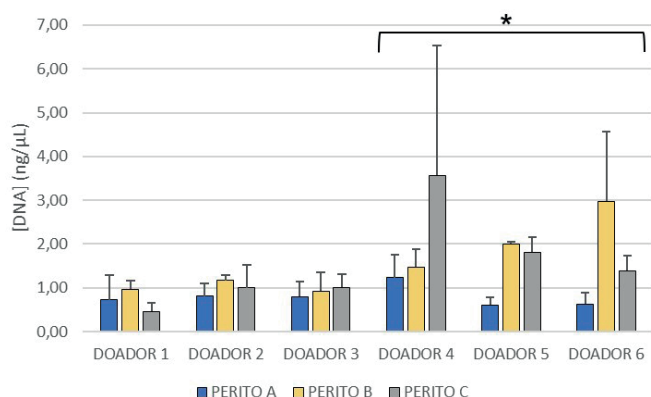


### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Quantificação das amostras extraídas com Chelex

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos na quantificação dos suabes (em triplicata) extraídos com Chelex dos seis doadores, totalizando 54 suabes analisados.

Com o objetivo de analisar a repetibilidade da metodologia, cada perito procedeu à extração de DNA de três suabes de cada doador. Para a avaliação de reprodutibilidade, três peritos realizaram os procedimentos de extração, em dias diferentes, totalizando 9 suabes analisados de cada doador. A análise das médias das concentrações obtidas a partir da extração das amostras de cada um dos seis doadores demonstrou que a metodologia de extração por Chelex exibiu repetibilidade e reprodutibilidade adequadas, visto que não houve diferença estatisticamente significativa entre cada um dos doadores masculinos (doadores 1, 2 e 3), nem entre cada um dos doadores femininos (doadores 4, 5 e 6).



**Figura 01:** Quantificação do DNA (ng/μL) extraído dos suabes com sangue de seis doadores. Três peritos (A, B e C) realizaram a extração, em triplicata, de suabes coletados dos doadores. Cada barra representa a média (ng/μL) ± desvio padrão das três extrações realizadas por perito, para as amostras provenientes de cada um dos 6 doadores. \*  $p < 0,05$  versus média dos doadores 1, 2 e 3.

Apesar de não ser o objetivo do trabalho, a partir dos resultados obtidos foi possível observar (Figura 1), utilizando o teste ANOVA com fator único, que houve diferença estatística entre as médias das concentrações dos doadores homens (doadores 1, 2 e 3; média 0,8746 ng/μL; desvio-padrão 0,3587; variância 0,1286) e as médias das concentrações das doadoras mulheres (doadores 4, 5 e 6; média 1,7450 ng/μL; desvio-padrão 1,3561; variância 1,8390), corroborando com evidências encontradas em trabalhos anteriores (BAIN, 1996; ROSENFELD et al., 2019). Não obstante, ressalta-se que fatores relacionados à etapa de amostragem do sangue com o suabe ou variações na quantidade de algodão dos suabes podem ocorrer,

gerando diferenças nas quantidades de DNA extraído entre os doadores. Dessa forma, exames mais detalhados, assim como a utilização de um universo amostral mais amplo, seriam necessários para confirmar a diferença na quantidade de DNA recuperada entre as amostras masculinas e femininas.

A partir da média das concentrações obtidas na quantificação de DNA em todos os suabes avaliados, chegou-se à concentração de 1,3098 ng/μL. Considerando-se que a quantidade ótima para a amplificação utilizando o kit *PowerPlex® Fusion 6C* é de 1 ng, seria necessário utilizar aproximadamente 0,76 μL dos extratos na etapa de amplificação. No entanto, buscando maior adequação à rotina do laboratório, foram examinados volumes inteiros dos extratos.

#### 3.2. Perfis genéticos obtidos das amostras extraídas com Chelex

Para avaliar se a utilização de um volume fixo e inteiro dos extratos obtidos dos suabes com sangue gerariam perfis genéticos com qualidade para análise, baixa taxa de retrabalho e melhor operacionalização desse procedimento no SEPGF, foram realizadas amplificações utilizando 1 μL dos extratos obtidos e 1 μL dos extratos com diluição 1:2.

As amostras foram codificadas de acordo com a ausência ou presença de diluição, sendo "1" para as amostras não diluídas e "0.5" para as amostras diluídas 1:2; além disso, "D" corresponde ao doador (total de 6 doadores); "S" corresponde ao suabe analisado (cada perito analisou 3 suabes de cada doador) e "A, B ou C" indica o perito responsável pela extração da amostra (total de 3 peritos). Adicionalmente, em verde estão indicados os marcadores aprovados pelo software *GeneMapper*; em amarelo tem-se os marcadores com picos em desbalanço (D) ou picos com sinais de fluorescência acima de 8000 RFUs – picos estourados (E); e em vermelho, os marcadores com a presença de alelos *Out of Ladder* (OL)<sup>1</sup>, *stutter* (ST)<sup>2</sup> ou outros artefatos (A). Ademais, "CPOS" representa os controles positivos utilizados na reação de amplificação. As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos na genotipagem dos extratos obtidos sem diluição (Tabela 1) e com diluição 1:2 (Tabela 2). Ressalta-se que os controles negativos da extração não apresentaram alelos em nenhum marcador molecular (dados não mostrados).

Em todos os 54 suabes de referência analisados, presentes nas amostras com ou sem diluição, foi possível a obtenção de perfis genéticos individuais e completos. Por conseguinte, a taxa de retrabalho foi de 0%, tanto para as amostras não diluídas quanto para as amostras diluídas (Tabela 3).

Conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2, foi possível a determinação de todos os alelos das 23 regiões autossômicas alvo do kit de amplificação utilizado, independentemente da quantidade de DNA utilizada (1 μL do extrato sem ou com diluição). No entanto, houve diferença na quantidade de marcadores apresentando desbalanço ou picos estourados (em amarelo); bem como presença de OLs, *stutters* ou outros artefatos (em vermelho), quando

<sup>1</sup> Pico do eletroferograma gerado por artefato da reação de amplificação caracterizado por apresentar posicionamento fora da escada alélica.

<sup>2</sup> Pico do eletroferograma gerado por artefato da reação de amplificação caracterizado, geralmente, pela deleção de uma unidade de repetição do alelo em questão.



|           | D3S1358 | D1S1656 | D2S441 | D10S1248 | D13S317 | Penta E | D16S539 | D18S51 | D2S1338 | CSF1PO | Penta D | TH01 | VWA | D21S11 | D7S820 | D5S818 | TPOX | D8S1179 | D12S391 | D19S433 | SE33 | D22S1045 | DY3S91 | FGA | DYS576 | DYS570 | médias das alturas (RFUs) | DP das alturas (RFUs) | Média (RFUs) |
|-----------|---------|---------|--------|----------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|------|-----|--------|--------|--------|------|---------|---------|---------|------|----------|--------|-----|--------|--------|---------------------------|-----------------------|--------------|
| 1_D1.S1_A |         |         | D      |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3496                      | 992                   | 3669         |
| 1_D1.S2_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     | D      |        |        | D    |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2175                      | 736                   |              |
| 1_D1.S3_A |         |         |        |          | E       | D       |         |        |         |        |         |      |     |        |        | E      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 5549                      | 1533                  |              |
| 1_D1.S1_B |         |         |        |          | E       |         |         |        |         |        |         | E    |     |        |        |        | E    |         | E       |         |      | ST       |        |     |        |        | 7558                      | 2044                  |              |
| 1_D1.S2_B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | D   |        | ST     |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2158                      | 644                   |              |
| 1_D1.S3_B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3270                      | 910                   |              |
| 1_D1.S1_C |         |         |        |          |         |         | D       |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 3680                      | 971                   |              |
| 1_D1.S2_C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 3155                      | 995                   |              |
| 1_D1.S3_C |         |         |        |          |         |         |         |        | D       |        |         |      |     | D      | ST     |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 1977                      | 508                   |              |
| 1_D2.S1_A |         |         |        |          |         | OL      |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3734                      | 1353                  | 6580         |
| 1_D2.S2_A |         |         |        | E        | E       | OL      |         |        |         | E      | E       |      |     |        |        |        | E    | E       | E       |         |      |          |        | E   |        |        | 8169                      | 2852                  |              |
| 1_D2.S3_A |         |         |        | E        |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        | E    | E       |         |         |      |          |        | E   |        |        | 5434                      | 1752                  |              |
| 1_D2.S1_B |         |         |        | E        | E       | OL      |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        | E    |         | E       |         |      | E        |        | E   |        |        | 5614                      | 2078                  |              |
| 1_D2.S2_B |         |         |        | E        | E       | OL      |         |        |         | E      | E       |      |     |        |        |        | E    | E       | E       |         |      | E        |        | E   |        |        | 8077                      | 3028                  |              |
| 1_D2.S3_B |         |         |        | E        | E       | OL      |         |        |         | E      | E       |      |     |        |        |        | E    | E       | E       |         |      | E        |        | E   |        |        | 7070                      | 2678                  |              |
| 1_D2.S1_C | E       | E       | E      | E        | E       | OL      |         | E      |         | E      | E       | E    | E   | E      | E      | E      | E    | E       | E       | E       | E    | E        | E      | E   | E      | E      | 12120                     | 4574                  |              |
| 1_D2.S2_C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4467                      | 1620                  |              |
| 1_D2.S3_C |         |         |        |          |         | OL      |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4539                      | 1535                  |              |
| 1_D3.S1_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        | D      |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2001                      | 546                   | 3817         |
| 1_D3.S2_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4106                      | 886                   |              |
| 1_D3.S3_A | E       |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        | ST     |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 4687                      | 1137                  |              |
| 1_D3.S1_B | E       |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 5414                      | 1342                  |              |
| 1_D3.S2_B |         | D       |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          | D      |     |        |        | 1606                      | 643                   |              |
| 1_D3.S3_B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3149                      | 855                   |              |
| 1_D3.S1_C | E       |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          | ST     |     |        |        | 3988                      | 1007                  |              |
| 1_D3.S2_C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 2472                      | 585                   |              |
| 1_D3.S3_C | E       |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 6931                      | 1440                  |              |
| 1_D4.S1_A |         | E       |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        | E      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 6253                      | 1988                  | 8315         |
| 1_D4.S2_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3812                      | 1236                  |              |
| 1_D4.S3_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 982                       | 297                   |              |
| 1_D4.S1_B |         | E       |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        | E      |      |         | ST      | D       |      |          |        |     |        |        | 6244                      | 2638                  |              |
| 1_D4.S2_B |         | E       |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        | E      |      |         | A       |         | A    |          |        |     |        |        | 6867                      | 1944                  |              |
| 1_D4.S3_B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        | E      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4777                      | 1611                  |              |
| 1_D4.S1_C |         | E       |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | E   |        |        | E      |      |         | ST      |         | A    |          |        |     |        |        | 7434                      | 2312                  |              |
| 1_D4.S2_C | OL      | OL      | OL     | A        | OL      | OL      | OL      | OL     | OL      | A      | OL      | A    | A   | A      | A      | OL     | OL   | OL      | A       | A       | A    | OL       | A      | A   | OL     | A      | 27097                     | 4810                  |              |
| 1_D4.S3_C | OL      | E       | E      | E        | OL      | A       | E       | E      |         | E      | E       | E    | E   | E      | E      | E      | E    | E       | A       | E       | A    | E        |        | E   |        |        | 11365                     | 3674                  |              |
| 1_D5.S1_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     | D      |        |        |      |         |         |         | ST   |          |        |     |        |        | 3571                      | 1184                  | 8360         |
| 1_D5.S2_A | E       |         |        | ST       | E       |         |         |        | E       | E      |         |      |     |        |        |        | E    |         |         |         |      |          | E      |     |        |        | 5450                      | 1992                  |              |
| 1_D5.S3_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         | E       |         |      |          |        |     |        |        | 2556                      | 886                   |              |
| 1_D5.S1_B | E       | E       | E      | E        | E       | OL      |         | E      | E       | E      |         |      | E   | OL     | E      | E      | E    | E       | E       | E       | A    | E        |        | E   |        |        | 11743                     | 4238                  |              |
| 1_D5.S2_B | E       |         | E      |          | E       | OL      |         |        | E       | E      |         |      | E   | E      | E      | E      |      |         |         |         | ST   | E        |        | E   |        |        | 9419                      | 3583                  |              |
| 1_D5.S3_B | E       |         |        |          |         | OL      |         |        | E       | E      |         |      |     |        |        | E      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 7259                      | 2479                  |              |
| 1_D5.S1_C | E       | E       | E      | E        | E       | OL      | E       | E      | E       | E      | E       |      | E   | OL     | E      | E      | E    |         | E       | E       | A    | E        |        | E   |        |        | 11453                     | 4353                  |              |
| 1_D5.S2_C | E       |         |        |          | E       | OL      |         |        | E       | E      |         |      |     |        | E      | E      | E    |         | E       |         | A    | E        |        | E   |        |        | 8924                      | 3308                  |              |
| 1_D5.S3_C | E       | E       | E      | E        | E       | OL      | E       | E      | E       | E      | E       | E    | E   | E      | E      | OL     | E    | E       | E       | A       | E    |          | E      |     |        |        | 14863                     | 4988                  |              |
| 1_D6.S1_A | E       |         |        | E        |         |         |         |        |         | E      |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 5608                      | 1755                  | 7823         |
| 1_D6.S2_A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | A        |        |     |        |        | 3729                      | 1034                  |              |
| 1_D6.S3_A |         |         |        | E        |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | A        |        |     |        |        | 2677                      | 876                   |              |
| 1_D6.S1_B | E       | E       | E      | E        | ST      | OL      | E       | E      |         | E      |         | OL   | E   | E      | E      | OL     | E    | E       | OL      | E       | OL   | E        |        | E   |        |        | 12809                     | 3597                  |              |
| 1_D6.S2_B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         | E       |         |      | A        |        |     |        |        | 6925                      | 2143                  |              |
| 1_D6.S3_B | OL      | A       | E      | OL       | E       | OL      | E       | E      | E       | E      | E       | OL   | OL  | E      | A      | OL     | E    | E       | OL      | E       | OL   | E        | OL     | E   |        |        | 16990                     | 5249                  |              |
| 1_D6.S1_C | E       |         |        | E        |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 6001                      | 1568                  |              |
| 1_D6.S2_C | E       | E       | E      | E        | E       |         |         |        | E       |        |         |      |     |        |        | E      |      | E       | E       |         |      |          |        |     |        |        | 9244                      | 2868                  |              |
| 1_D6.S3_C | E       |         |        | E        |         |         |         |        |         | E      |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 6426                      | 1650                  |              |
| CPOS 1    |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        | E      |      |         |         |         | A    |          |        |     |        |        | 4186                      | 1305                  | 2827         |
| CPOS 2    |         |         |        |          | D       |         |         |        |         |        | D       |      |     |        |        |        |      | ST      | D       |         | A    |          | ST     |     |        |        | 2860                      | 1009                  |              |
| CPOS 3    |         |         |        |          |         | D       |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         | D       |      |          |        |     |        |        | 2378                      | 821                   |              |
| CPOS 4    |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        | D       |      |     |        | D      |        |      |         |         |         | D    |          |        |     |        |        |                           | 1886                  | 654          |

|    |                                                  |
|----|--------------------------------------------------|
|    | Aprovado                                         |
| D  | Desbalanço                                       |
| E  | Estourado                                        |
| ST | Stutter                                          |
| OL | Out of Ladder                                    |
| A  | Artefato (outros)                                |
|    | Ausência já esperada de alelo (perfis femininos) |

**Tabela 01:** Genotipagem das amostras a partir de 1 µL dos extratos obtidos (sem diluição) na extração realizada nos suabes com sangue pelo método Chelex.

|             | D3S1358 | D1S1656 | D2S441 | D10S1248 | D13S317 | Penta E | D16S539 | D18S51 | D2S1338 | CSF1PO | Penta D | TH01 | VWA | D21S11 | D7S820 | D5S818 | TPOX | D8S1179 | D12S391 | D19S433 | SE33 | D22S1045 | DYS391 | FGA | DYS576 | DYS570 | médias das alturas (RFUs) | DP das alturas (RFUs) | Média (RFUs) |
|-------------|---------|---------|--------|----------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|------|-----|--------|--------|--------|------|---------|---------|---------|------|----------|--------|-----|--------|--------|---------------------------|-----------------------|--------------|
| 0.5 D1.S1 A |         |         |        |          |         |         |         |        | D       |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         | ST   |          |        |     |        |        | 1686                      | 489                   | 1874         |
| 0.5 D1.S2 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         | D      |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         | ST   |          |        |     |        |        | 1326                      | 342                   |              |
| 0.5 D1.S3 A |         |         |        |          |         | D       |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        | ST  |        |        | 3238                      | 949                   |              |
| 0.5 D1.S1 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | D   |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2947                      | 714                   |              |
| 0.5 D1.S2 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 2158                      | 588                   |              |
| 0.5 D1.S3 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1491                      | 422                   |              |
| 0.5 D1.S1 C |         |         |        | D        |         |         | D       |        |         | D      |         |      |     |        | D      |        |      |         |         |         | D    |          |        | ST  |        |        | 1597                      | 482                   |              |
| 0.5 D1.S2 C |         |         |        |          |         |         |         |        | D       |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | D        |        |     |        |        | 1685                      | 477                   |              |
| 0.5 D1.S3 C |         | D       |        |          |         | D       |         | D      | D       |        |         |      |     |        |        |        | D    |         |         |         | D    |          |        |     |        |        | 734                       | 263                   |              |
| 0.5 D2.S1 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | D        |        |     |        |        | 1517                      | 554                   | 2735         |
| 0.5 D2.S2 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3376                      | 1326                  |              |
| 0.5 D2.S3 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2378                      | 863                   |              |
| 0.5 D2.S1 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2291                      | 921                   |              |
| 0.5 D2.S2 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         | D    |          |        |     |        |        | 2835                      | 1051                  |              |
| 0.5 D2.S3 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3014                      | 1077                  |              |
| 0.5 D2.S1 C |         |         |        | D        |         | OL      |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        | E    |         | E       |         | E    |          |        | E   |        |        | 5004                      | 2263                  |              |
| 0.5 D2.S2 C |         |         |        |          |         | D       |         | D      |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1814                      | 713                   |              |
| 0.5 D2.S3 C |         | D       |        |          |         | ST      |         | D      |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2382                      | 857                   |              |
| 0.5 D3.S1 A |         | D       |        | D        |         |         |         |        |         |        |         |      |     | D      |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1374                      | 416                   | 1867         |
| 0.5 D3.S2 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        | ST  |        |        | 2107                      | 523                   |              |
| 0.5 D3.S3 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        | D      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2633                      | 691                   |              |
| 0.5 D3.S1 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          | D      |     |        |        | 2103                      | 541                   |              |
| 0.5 D3.S2 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        | D       |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 993                       | 328                   |              |
| 0.5 D3.S3 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1262                      | 415                   |              |
| 0.5 D3.S1 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        | D       |      |     | D      |        |        |      |         |         |         |      |          | ST     |     |        |        | 2293                      | 516                   |              |
| 0.5 D3.S2 C |         |         |        | D        |         |         |         |        | D       | D      |         |      |     |        |        | D      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1321                      | 352                   |              |
| 0.5 D3.S3 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2720                      | 618                   |              |
| 0.5 D4.S1 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2520                      | 730                   | 4238         |
| 0.5 D4.S2 A | D       |         |        |          | D       |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      | D       |         |         |      |          |        |     |        |        | 1659                      | 479                   |              |
| 0.5 D4.S3 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 656                       | 242                   |              |
| 0.5 D4.S1 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3218                      | 997                   |              |
| 0.5 D4.S2 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2678                      | 776                   |              |
| 0.5 D4.S3 B |         |         |        |          |         |         |         |        | D       |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1939                      | 557                   |              |
| 0.5 D4.S1 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4214                      | 1260                  |              |
| 0.5 D4.S2 C | OL      | E       | E      | OL       | OL      | OL      | E       | E      | E       | ST     | E       | OL   | A   | E      | E      | E      | E    | E       | ST      | E       | OL   | E        |        | E   |        |        | 16883                     | 4417                  |              |
| 0.5 D4.S3 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4376                      | 1149                  |              |
| 0.5 D5.S1 A |         | D       |        |          |         |         | D       |        |         |        |         |      | D   |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1684                      | 589                   | 3613         |
| 0.5 D5.S2 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         | D    |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2465                      | 809                   |              |
| 0.5 D5.S3 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1081                      | 380                   |              |
| 0.5 D5.S1 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4306                      | 1412                  |              |
| 0.5 D5.S2 B | E       |         |        |          | E       |         |         |        | E       | E      |         |      |     |        |        |        | E    |         |         |         |      |          | E      |     |        |        | 6326                      | 2169                  |              |
| 0.5 D5.S3 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3551                      | 1313                  |              |
| 0.5 D5.S1 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        | E    |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 4543                      | 1593                  |              |
| 0.5 D5.S2 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 3191                      | 1171                  |              |
| 0.5 D5.S3 C | E       |         |        |          | E       |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        | E    |         |         |         |      |          | E      |     |        |        | 5372                      | 1773                  |              |
| 0.5 D6.S1 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      | D   |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2674                      | 772                   | 3614         |
| 0.5 D6.S2 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        | D      |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 1808                      | 506                   |              |
| 0.5 D6.S3 A |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     | D      |        |        |      |         |         |         |      |          |        | D   |        |        | 1091                      | 354                   |              |
| 0.5 D6.S1 B | E       |         |        | E        |         |         |         |        |         | E      |         |      |     |        |        |        |      |         | E       |         |      |          |        |     |        |        | 6370                      | 1799                  |              |
| 0.5 D6.S2 B |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 2617                      | 739                   |              |
| 0.5 D6.S3 B | E       | D       | D      | E        | D       | D       |         | D      |         | D      |         |      |     |        | D      | OL     | D    | E       | D       | D       | D    | D        | D      | D   | D      |        | 10242                     | 3011                  |              |
| 0.5 D6.S1 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2340                      | 714                   |              |
| 0.5 D6.S2 C |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      | ST       |        |     |        |        | 3022                      | 829                   |              |
| 0.5 D6.S3 C |         |         |        |          |         |         |         | D      |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         |         |      |          |        |     |        |        | 2361                      | 778                   |              |
| CPOS 1      |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        |         |      |     |        |        | E      |      |         |         |         |      | A        |        |     |        |        | 4186                      | 1305                  | 2827         |
| CPOS 2      |         |         |        |          | D       |         |         |        |         |        | D       |      |     |        |        |        |      |         | ST      | D       |      | A        |        | ST  |        |        | 2860                      | 1009                  |              |
| CPOS 3      |         |         |        |          |         | D       |         |        |         |        |         |      |     |        |        |        |      |         |         | D       |      |          |        |     |        |        | 2378                      | 821                   |              |
| CPOS 4      |         |         |        |          |         |         |         |        |         |        | D       |      |     |        | D      |        |      |         |         |         | D    |          |        |     |        |        | 1886                      | 654                   |              |

|    |                                                  |
|----|--------------------------------------------------|
|    | Aprovado                                         |
| D  | Desbalanço                                       |
| E  | Estourado                                        |
| ST | Stutter                                          |
| OL | Out of Ladder                                    |
| A  | Artefato (outros)                                |
|    | Ausência já esperada de alelo (perfis femininos) |

**Tabela 02:** Genotipagem das amostras a partir de 1 µL dos extratos obtidos (com diluição 1:2) na extração realizada nos suabes com sangue pelo método Chelex

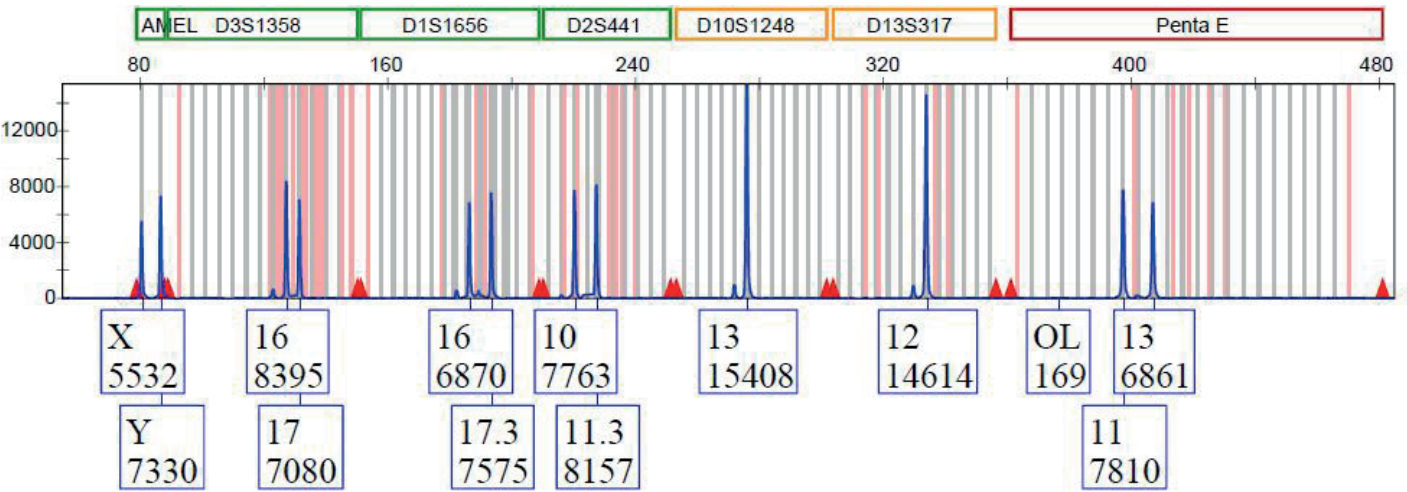


comparadas as amplificações das amostras diluídas e sem diluição. As amostras com diluição 1:2 apresentaram 22 artefatos (OL, ST e A), contra 91 apresentados pelas amostras não diluídas, ou seja, as amostras diluídas apresentaram 76% menos artefatos que as amostras não diluídas. Além disso, as amostras com diluição apresentaram uma média das alturas dos picos de 2990 RFUs (*Reference Fluorescence Unit* - Unidade de Fluorescência de Referência), contra 6427 RFUs das amostras sem diluição, conforme Tabela 3; enquanto os controles positivos apresentaram uma média das alturas dos picos de 2827 RFUs. Em média, a diluição 1:2 do extrato obtido parece ter disponibilizado uma quantidade de DNA mais adequada para as reações de amplificação, de acordo com as especificações técnicas do kit utilizado.

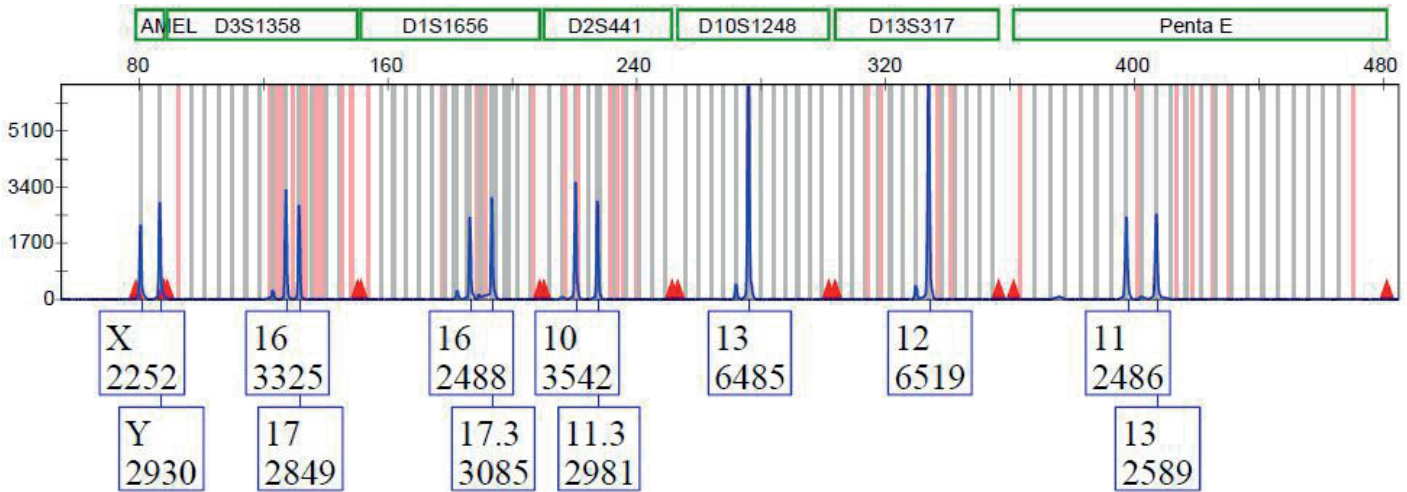
As Figuras 2 e 3 ilustram, de forma representativa, parte do eletroferograma de perfis avaliados nas amostras amplificadas sem diluição e com diluição 1:2, respectivamente, demonstrando a altura dos

|                             | Extratos sem diluição | Extratos com diluição 1:2 |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Taxa de retrabalho          | 0%                    | 0%                        |
| Artefatos                   | 91                    | 22                        |
| Média das alturas dos picos | 6427 RFUs             | 2990 RFUs                 |

**Tabela 03:** Taxa de retrabalho, quantidade de artefatos e média das alturas dos picos encontrados na genotipagem dos extratos sem diluição e com diluição 1:2.



**Figura 02:** Parte do eletroferograma de um dos perfis avaliados (1\_D2.S2\_A) a partir de 1 µL do extrato obtido (sem diluição) na extração realizada em suabe com sangue pelo método Chelex.



**Figura 03:** Parte do eletroferograma de um dos perfis avaliados (0.5\_D2.S2\_A) a partir de 1 µL do extrato obtido (com diluição 1:2) na extração realizada em suabe com sangue pelo método Chelex.



picos, balanceamento entre os alelos nos marcadores moleculares analisados, além da presença ou não de artefatos. A Figura 2 evidencia os marcadores D10S1248 e D13S317 com picos exibindo sinais de fluorescência elevados, além do marcador Penta E apresentando um artefato (OL). Já a Figura 3 mostra os respectivos marcadores com picos de altura adequada, balanceados e sem a presença de artefatos. Apesar dessas diferenças, a identificação dos perfis genéticos obtidos não foi prejudicada em nenhum dos casos.

Ressalta-se que pode haver problemas com o armazenamento por longo prazo de amostras extraídas com Chelex, tendo em vista a possibilidade de os extratos conterem impurezas (SINGH; KUMARI; IYENGAR, 2018). No entanto, estudos de nosso Laboratório mostraram que o armazenamento a -20°C das amostras de DNA de referência em suabe oral extraídas com Chelex, não impediu que a grande maioria delas (aproximadamente 95%) fosse novamente amplificada e genotipada, mesmo após 10 anos de armazenamento, independentemente das eventuais alterações que possam ter ocorrido em suas características originais (dados não mostrados). De fato, a metodologia de armazenamento empregada pelo SEPGF é considerada eficaz para manter a viabilidade do DNA em muitas situações (BAUST, 2008; HARA et al., 2015). Entre outras vantagens, baixas temperaturas impedem a proliferação de microrganismos e diminuem a velocidade de reações químicas que podem levar à degradação do DNA, auxiliando na sua preservação (OOSTING et al., 2020). Quando se deseja armazenar amostras de DNA por períodos muito longos de tempo – séculos, por exemplo – abordagens alternativas como a criopreservação a uma temperatura de -196°C ou armazenagem em uma matriz sólida seca parecem ser mais adequadas (BAUST, 2008). Entretanto, tendo em vista a necessidade da manutenção de contraprovas em laboratórios forenses, estudos de estabilidade em longo prazo das amostras de referência em suabe de sangue extraídas por Chelex no SEPGF serão necessárias, haja vista que o grupo heme da hemoglobina pode apresentar atividade inibitória da PCR (SIDSTEDT et al., 2018), aliado às limitações apresentadas por essa metodologia na remoção de inibidores da PCR presentes na amostra (WILLARD; LEE; HOLLAND, 1998).

Ao final, os resultados foram registrados em relatório de estudo do SEPGF, de acordo com normativos internos deste Serviço de Perícias, para a adequação da nova metodologia a ser utilizada no laboratório.

## Conclusões

O presente estudo demonstrou que a extração de DNA de amostras de referência de sangue humano por meio da resina Chelex® 100 foi capaz de extrair DNA autossômico humano de modo a obter perfis genéticos elegíveis para inserção em banco de dados, sem a necessidade de quantificação do DNA na amostra. Isso traz grandes implicações em termos de custo, uma vez que se trata de uma metodologia barata, além de otimizar o tempo de obtenção de perfis genéticos, já que elimina a necessidade da etapa de quantificação.

A média das concentrações de DNA de todos os suabes avaliados foi de 1,3098 ng/μL, o que implicaria o uso de 0,76 μL dos extratos na amplificação pelo kit *PowerPlex® Fusion 6C*. Por esse motivo, foram realizadas amplificações utilizando 1 μL dos extratos obtidos ou 1 μL dos extratos com diluição 1:2, tendo sido encontrados resultados satisfatórios em ambas as análises. Uma vez que já há um protocolo validado pelo SEPGF para a extração de DNA de suabes orais de referência por Chelex e buscando excluir a etapa de diluição, sugere-se a utilização de 1 μL do DNA (sem diluição) extraído dos suabes com sangue para ser utilizado na etapa seguinte de amplificação.

Os resultados dos estudos realizados neste trabalho permitem concluir que extração de DNA de amostras de referência de sangue humano por meio da resina Chelex® 100 é adequada para uso forense e encontra-se com a etapa experimental da validação concluída no SEPGF.

## Conflito de interesse

O autor Alexandro Mangueira Lima de Assis é membro da Comissão Editorial da revista *Perícia Federal* e não participou do processo de revisão por pares e das decisões editoriais relacionadas à publicação do presente artigo científico.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Perito Criminal Federal Carlos Benigno Vieira de Carvalho pelas discussões e revisão textual do trabalho, à Polícia Federal, em especial ao Instituto Nacional de Criminalística (INC/DITEC/PF) pelo apoio institucional, bem como aos colegas doadores das amostras de sangue utilizadas no estudo.

## Referências

- BAIN, B. J. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 8, p. 664–666, 1996.
- BAUST, J. Strategies for the Storage of DNA. **Biopreservation and Biobanking**, v. 6, n. 4, p. 251–252, 2008.
- BIO-RAD LABORATORIES. Chelex 100 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual. **Bio-Rad Laboratories**, p. 1–24, 2017.
- BUTLER, J. M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. Academic Press, 2009.
- DIAS FILHO, C. R. et al. **Introdução à Genética Forense**. 1a ed. Campinas, SP: Editora Millenium, 2020.

GONZALEZ, T. P.; BENETTI, M. R. N. Validação em genética forense: da necessidade à prática. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 11, n. 1, p. 65–72, 2022.

HARA, M. et al. Effects of storage method on DNA degradation in old bloodstain samples. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 5, p. e39–e41, 2015.

LEE, S. B.; MCCORD, B.; BUEL, E. Advances in forensic DNA quantification: A review. **Electrophoresis**, v. 35, n. 21–22, p. 3044–3052, 2014.

OOSTING, T. et al. DNA degradation in fish: Practical solutions and guidelines to improve DNA preservation for genomic research. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 16, p. 8643–8651, 2020.

PHILLIPS, K.; MCCALLUM, N.; WELCH, L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 2, p. 282–285, 2012.

RIBPG. **Resolução no 11 - Inserção, manutenção e exclusão dos perfis genéticos de restos mortais de identidade conhecida na RIBPG**. Brasília: Comitê Gestor RIBPG, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg/resolucoes/resolucao11-RMI.pdf>. Acesso em: 21/03/2023.

RIBPG. **Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (versão 5)**. Brasília:

Comitê Gestor RIBPG, 2022. Disponível em: [https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg/manual/manual\\_ribpg\\_v5\\_res\\_17.pdf](https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg/manual/manual_ribpg_v5_res_17.pdf). Acesso em 21/03/2023.

ROSENFELD, L. G. et al. Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, n. suppl 2, p. 1–13, 2019.

SIDSTEDT, M. et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 10, p. 2569–2583, 2018.

SINGH, U. A.; KUMARI, M.; IYENGAR, S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. **Biological Procedures Online**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2018.

SWGDM. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. p. 1–13, 2016.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, n. 4, p. 506–13, 1991.

WILLARD, J. M.; LEE, D. A.; HOLLAND, M. M. Recovery of DNA for PCR Amplification from Blood and Forensic Samples Using a Chelating Resin. **Methods in Molecular Biology**, v. 98, p. 9–18, 1998.

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

COSTA, M. A. D. et al. Internal validation of DNA extraction from human blood reference samples using Chelex 100 resin. *Perícia Federal*, v. 1, n. 52, p. 67–76, 2023. <https://doi.org/10.29327/266815.1.52-2>

