

**Escola Superior de Saúde Egas Moniz**

**Mestrado em Biologia Molecular em Saúde**



**Implementação de um método de  
validação do controlo de qualidade em  
amostras de DNA armazenadas no  
Biobanco-IMM**

**Vanessa Gonçalves Silva**

**Tese de dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biologia  
Molecular em Saúde**

**Orientada por Doutora Joana Caetano-Lopes**

**Março 2014**

## **Agradecimentos**

" Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe." **CLARICE LISPECTOR**

Nesta fase da minha vida, que envolveu tantos esforços pessoais e profissionais, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que nunca desistiram de mim e nunca me deixaram desistir. Desde o início que o desenvolvimento deste trabalho se revelou complicado devido às limitações horárias que a minha situação profissional me impôs, pelo que tive que contar com apoio e esforço de várias pessoas. Assim, agradeço a todos aqueles que vou mencionar o papel fundamental que tiveram e que me permitiu realizar este trabalho.

À Doutora Joana-Caetano Lopes, agradeço a orientação e a oportunidade de conhecer o Biobanco-IMM. Reconheço com muita gratidão toda a disponibilidade e tempo que sempre me dedicou e a confiança que depositou em mim, apesar da distância geográfica. Agradeço ainda todo o conhecimento que me transmitiu e pela forma simpática com que sempre me tratou, desde o primeiro dia em que me recebeu.

Ao Director do Biobanco-IMM, Professor Doutor João Eurico Fonseca, por permitir o desenvolvimento deste trabalho e por toda a simpatia e disponibilidade em todas as situações em que foi necessária a sua intervenção.

À restante equipa do Biobanco-IMM, principalmente à Supervisora Técnica Ângela Afonso e Mestre Ana Sofia Zhao, pelo tempo que me dedicaram, mesmo quando era menos conveniente, e pelo conhecimento e procedimentos que partilharam comigo de forma a ser possível a realização deste projeto.

Por fim, expresso aqui o meu profundo agradecimento a outras pessoas menos envolvidas no trabalho em si, mas sempre as mais importantes para mim.

Um muito obrigado aos meus avós, a quem tive que retirar uma grande parte do tempo que dispndia para estar com eles, mas que sempre reconheceram e compreenderam o meu esforço e trabalho ao longo desta etapa.

Aos meus pais e ao meu namorado, pelo apoio e incentivo, tanto nos momentos calmos como nos momentos difíceis e de cansaço puro. Muito obrigado por acreditarem sempre em mim e nunca me deixarem desistir.

Aos meus irmãos, por me proporcionarem momentos de pura alegria e diversão que me fizeram descontraír e recarregar energias ao longo dos altos e baixos com que me deparei.

Às mestrandas, Marta Batista, pelos momentos bons e maus que partilhámos ao longo do mestrado e pelo apoio; e Andreia Casimiro, pela amizade que criámos, pelo apoio, ajuda e incentivo que sempre manifestou e que foi tão importante para mim.

E por fim, aos meus amigos que aceitaram e compreenderam o meu afastamento nesta fase mais preenchida mas sempre me dedicaram palavras de força e sempre se fizeram presentes da melhor forma possível.

## Resumo

No Biobanco-IMM as amostras são colhidas e armazenadas por longos períodos de tempo sendo de extrema importância que estas sejam de elevada qualidade. Para cumprir este requisito, os procedimentos do biobanco efetuam-se de acordo com diretrizes internacionais para a avaliação da qualidade das amostras que armazena.

No Biobanco-IMM, as amostras de DNA são extraídas e avaliadas em relação à sua concentração, pureza (razão A260/A280) e integridade. Por vezes, uma pequena percentagem das amostras pode não cumprir estes parâmetros de qualidade e uma vez que estas amostras são muitas vezes irrecuperáveis, surge a necessidade de testar a funcionalidade do DNA. O PCR é uma técnica largamente utilizada, pelo que outros biobancos internacionais, com os quais o Biobanco-IMM mantém estreita relação, aplicam esta técnica para complementar o procedimento de controlo de qualidade. Assim, este trabalho teve por objetivo implementar um método que comprove a funcionalidade das amostras de DNA armazenadas no Biobanco-IMM.

Foram selecionadas amostras de cinco coleções representativas do Biobanco-IMM e amostras que não cumpriam os parâmetros de qualidade atualmente implementados. Segundo os resultados, as amostras pertencentes às cinco coleções apresentam boa amplificação do gene ACVR2B por PCR. Foi também observado que mesmo as amostras que se situavam fora do controlo de qualidade (87,8%) apresentaram amplificação, o que sugere que, mesmo que algumas amostras não cumpram os parâmetros de controlo de qualidade já aplicado no biobanco, poderão ser utilizadas, desde que se revelem funcionais. Segundo estes resultados, sugere-se que a adaptação do procedimento de CQ das amostras de DNA passe por acrescentar a técnica de PCR quando as amostras traduzam uma razão A260/280  $< 1,7$  ou  $> 2,0$  e/ou não apresentem uma banda íntegra em gel de agarose.

**Palavras-Chave:** Biobanco-IMM; amostras de DNA; Controlo de Qualidade; ACVR2B.

## **Abstract**

Biobanco-IMM collects and stores human biological samples for long periods of time and it is of extreme importance that these samples are of high quality. To fulfill this requirement, Biobanco-IMM procedures comply with the international guidelines for assessing the quality of the samples stored.

DNA samples are extracted and evaluated for their concentration, purity ratio (A260/A280) and integrity. Sometimes, a small percentage of these samples do not satisfy the quality parameters implemented at Biobanco-IMM, therefore it is necessary to test the functionality of the DNA in these samples. PCR is a widely used technique by other international biobanks, with which the Biobanco-IMM has a close collaboration, to complement the procedure of quality control. Thus, the purpose of this study was to implement a method that demonstrates the functionality of the DNA samples stored at Biobanco-IMM.

Samples from five representative collections of Biobanco-IMM and samples that do not comply with the quality parameters currently implemented were selected. According to the results, the samples belonging to the five collections show good ACVR2B gene amplification by PCR. It was also observed that even the samples that were outside the quality control parameters (87,8%) showed amplification, suggesting that even the samples do not fit in the parameters of quality control parameters used at this moment may be used in downstream applications, as long as it is proved that they are functional. According to these results, it is suggested an adjustment of the QC procedure of DNA samples to include the PCR when samples show a A260/280 ratio  $< 1.7$  or  $> 2.0$  and / or does not show a band in agarose gel.

**Key-Words:** Biobanco-IMM; DNA samples; Quality Control; ACVR2B.

# Índice

<b>1. Introdução</b> .....	10
1.1. Biobanco-IMM .....	10
1.1.1. Aspectos Éticos e Legais .....	14
1.2. Amostras de DNA.....	16
1.3. Controlo de Qualidade das amostras de DNA .....	17
1.3.1. Gene ACVR2B .....	18
<b>2. Objetivo</b> .....	21
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	22
3.1 Material Biológico .....	22
3.2 Métodos .....	22
3.2.1. Extração de DNA.....	22
3.2.2. Quantificação e grau de pureza do DNA .....	25
3.2.3. Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do DNA.....	26
3.2.4. PCR.....	27
3.2.4.1 Amplificação do gene ACVR2B.....	31
<b>4. Resultados</b> .....	32
4.1 Caracterização das amostras .....	32
4.2 Optimização das condições de PCR .....	38
4.3. Visualização do produto amplificado em gel de agarose a 1% (p/v).....	39
<b>5. Discussão</b> .....	41
<b>6. Conclusão</b> .....	43
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	48

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Gráfico representativo das coleções que existem atualmente no Biobanco-IMM.....	11
<b>Figura 2</b> Esquema representativo do fluxo de amostras no Biobanco-IMM, desde o questionário clínico ao armazenamento da amostra nas instalações do biobanco. ....	12
<b>Figura 3</b> Diferentes tipos de amostras armazenadas atualmente no Biobanco-IMM .....	13
<b>Figura 4</b> Mecanismo intracelular de sinalização da activina .....	19
<b>Figura 5</b> Esquema da estrutura dos recetores iib da activina .....	20
<b>Figura 6</b> Resultado da homologia do gene ACVR2B na base de dados <i>national center for biotechnology information</i> (NCBI) .....	20
<b>Figura 7</b> Instrumento <i>Qiacube</i> da Qiagen. Vista dos compartimentos onde se processa a extração automática do dna . ....	23
<b>Figura 8</b> Esquema geral do procedimento de extração de DNA .....	24
<b>Figura 9</b> Reacção em cadeia da polimerase (PCR) .....	28
<b>Figura 10</b> Representação de espectros de absorção de ácidos nucleicos.. ....	34
<b>Figura 11</b> Exemplo de avaliação da integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) .....	35
<b>Figura 12</b> Gradiente de temperaturas em gel de agarose a 1%(p/v).....	38
<b>Figura 13</b> Visualização do gene ACVR2B amplificado por PCR em gel de agarose a 1%(p/v).....	39
<b>Figura 14</b> Visualização do gene ACVR2B amplificado por pcr em gel de agarose a 1% de amostras classificadas como fora dos parâmetros de integridade do DNA no controlo de qualidade. ....	40
<b>Figura 15</b> Sugestão do procedimento de CQ de amostras de dna a implementar no Biobanco-IMM.....	43

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Programa de PCR para realização do gradiente de temperatura .....	30
<b>Tabela 2</b>	Preparação da mix de PCR para amplificação do gene ACVR2B.. .....	31
<b>Tabela 3</b>	Descrição das coleções residentes no Biobanco-IMM utilizadas neste estudo .....	32
<b>Tabela 4</b>	Resultados da concentração média e grau de pureza avaliados pelo equipamento Nanodrop 1000 das amostras de DNA das diferentes coleções utilizadas neste estudo.....	33
<b>Tabela 5</b>	Resultados da quantificação, grau de pureza e integridade das amostras que se situavam fora do intervalo da razão A260/280 .....	36



## Lista de Siglas

ACVR – Recetor da Activina

ACVR2B – Recetor do tipo II da Activina

BBMRI - Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure

CQ – Controlo de Qualidade

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – *deoxyribonucleotide*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EUA – Estados Unidos da América

FSH – Hormona Foliulo-Estimulante

IMM – Instituto de Medicina Molecular

LIMS - *Laboratory Information Management System*

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

SOP – procedimento operacional

TBE – Tris/Borato/EDTA

TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor- $\beta$*

UNESCO – United Nations Educational Scientific and Cultural Organization

UV – Ultravioleta

# 1. Introdução

## 1.1. Biobanco-IMM

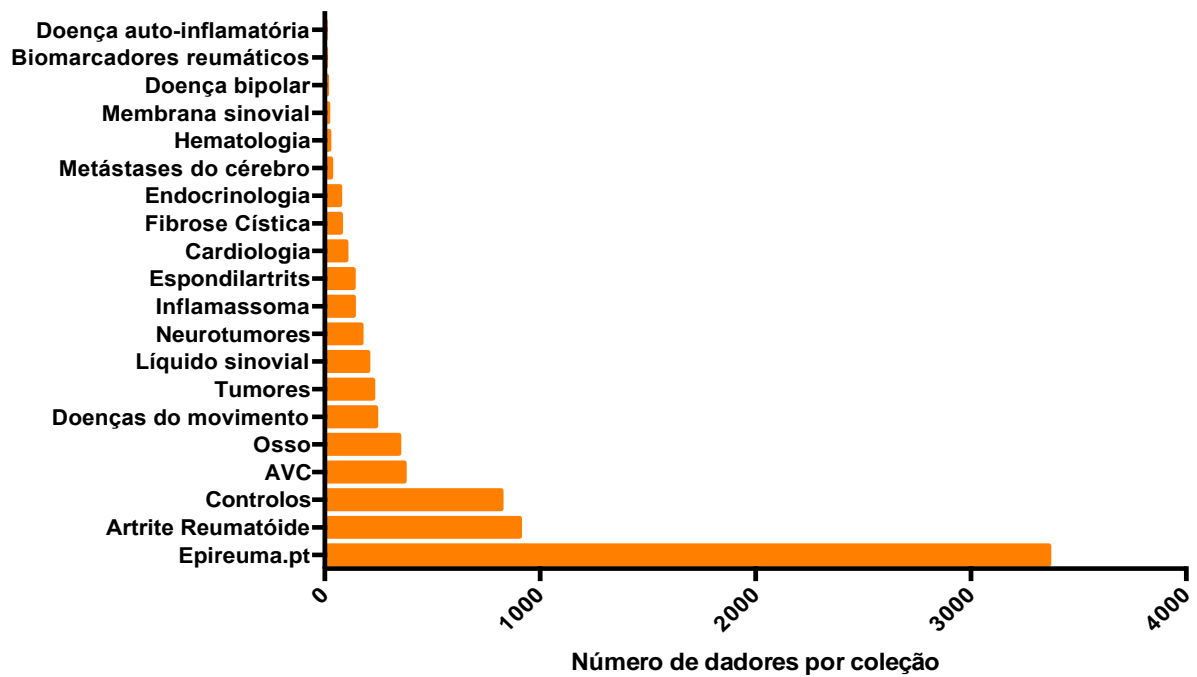
É fundamental o desenvolvimento da investigação para o conhecimento dos mecanismos etiopatogénicos de várias doenças bem como o desenvolvimento de novas terapêuticas, para que seja possível um diagnóstico precoce e um tratamento adequado, de forma a minimizar os gastos diretos e indiretos de saúde e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos. Para que este objetivo seja alcançável, torna-se imperativo o acesso facilitado a amostras biológicas humanas. Insere-se neste contexto o conceito de biobanco, que não é mais do que um conjunto de amostras biológicas associadas em coleções de acordo com características clínicas ou biológicas específicas dos doadores tornando-se importantes recursos para o estudo de causas e mecanismos de doenças que se encontram disseminadas na população, de forma a revelar a interação entre os factores genéticos e não-genéticos que conduzem à patologia. (Auray-Blais C. et al, 2006; Walts G., 2007) Nesta estrutura, as amostras são colhidas, processadas e armazenadas bem como registados os respetivos dados clínicos. A utilidade deste tipo de estruturas reside na diversidade de material biológico armazenado e depende da qualidade das amostras. (Biobanco-IMM, 2013).

O Biobanco-IMM é uma estrutura criada pelo Instituto de Medicina Molecular (IMM) com a missão de promover a investigação biomédica. No Biobanco-IMM, as amostras estão disponíveis para serem utilizadas por toda a comunidade científica, tornando-se um recurso valioso em investigação translacional. Apesar das amostras serem colhidas no contexto de projetos de investigação específicos, o material biológico e a respetiva informação são inseridos numa base de dados, com vista a serem utilizados futuramente noutros projetos (Lim, M. D., 2012).

Os objetivos do Biobanco-IMM passam por concentrar uma grande variedade de amostras biológicas humanas associada a informação clínica relevante e de alta qualidade, promover a utilização de um sistema de gestão de amostras baseado em critérios éticos e científicos e ainda garantir a qualidade das amostras armazenadas com recurso a testes desenvolvidos de acordo com recomendações internacionais. As amostras podem ser colhidas da população em geral ou de doentes com historial

relevante para determinado projeto, e são organizadas em coleções (Figura 1), que são da responsabilidade de investigadores principais. O tipo de amostras existentes no Biobanco-IMM inclui sangue, soro, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e tecido.

O Biobanco-IMM é, portanto, um recurso útil que disponibiliza amostras suficientes e representativas, utilizadas em diversos projetos, e que colabora com várias organizações de saúde e departamentos de investigação biomédica. O Biobanco-IMM integra ainda a rede europeia de biobancos, o *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* (BBMRI) (Biobanco-IMM, 2012).

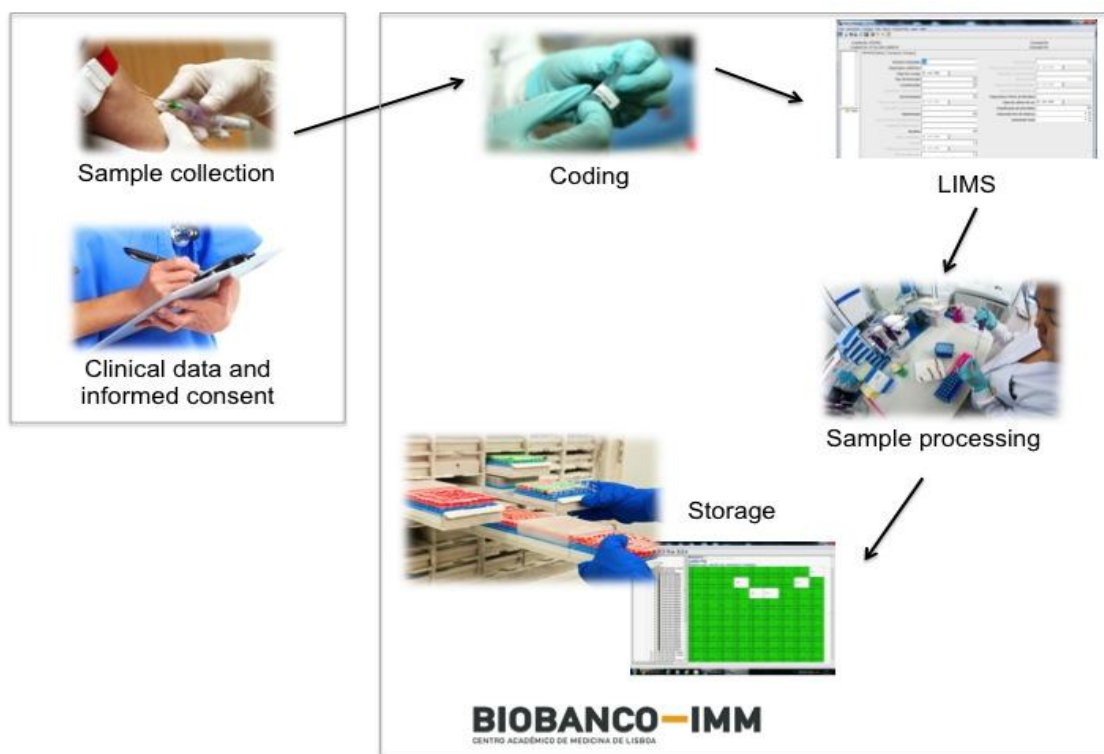


**Figura 1** Gráfico representativo das coleções que existem atualmente no Biobanco-IMM.

(Fonte: Biobanco IMM, Centro Académico de Medicina de Lisboa, 2013)

A colheita de amostras pelo Biobanco-IMM inicia-se com um acordo entre um investigador proponente de um estudo e o biobanco. Neste momento é criada uma coleção e inicia-se a colheita de amostras biológicas e respetiva informação clínica, quer nas instalações do biobanco, quer noutros locais previamente acordados. No momento da colheita, os dadores são dirigidos para uma consulta médica onde são informados pelo médico dos procedimentos e objetivos do estudo, e onde é recolhida toda a informação relevante. Neste momento o dador assina um consentimento informado (Anexo I), autorizando a colheita e armazenamento de uma amostra biológica e respetiva informação clínica para fins de investigação biomédica. Este documento comprova ainda que os indivíduos conhecem e concordam com os princípios e propósitos do Biobanco-IMM. A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração, sendo que nestas situações a amostra e informação associada é imediatamente destruída. (Biobanco-IMM, 2013)

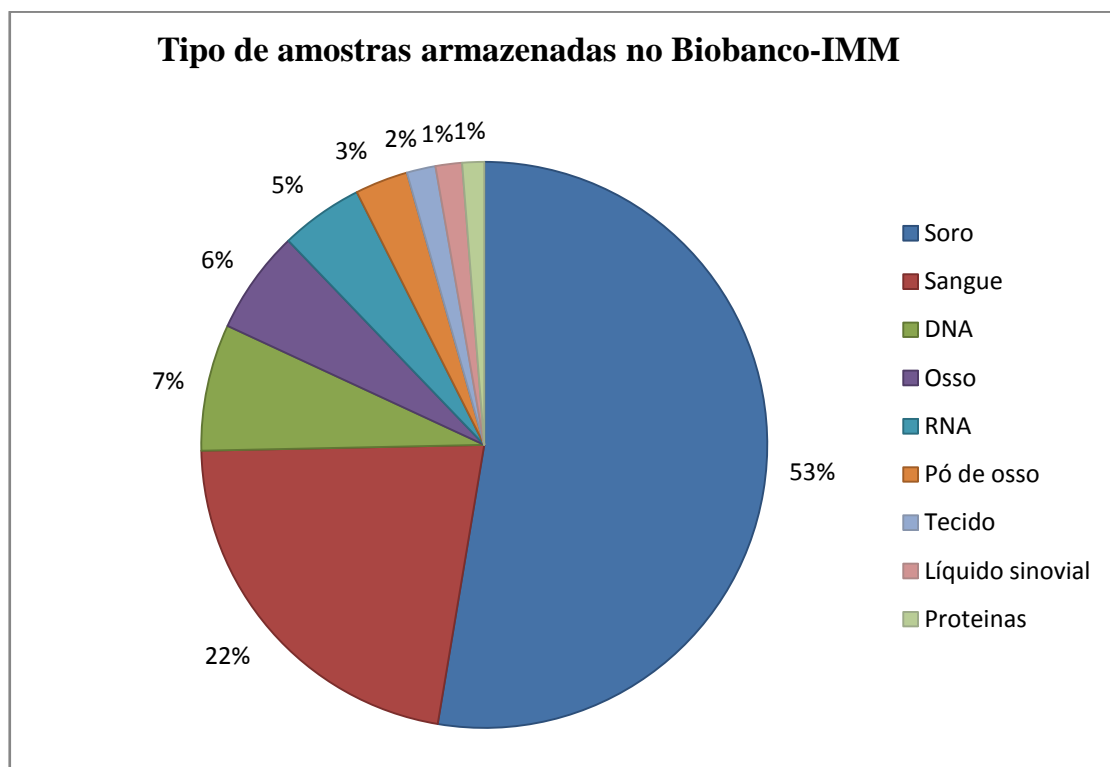
O Biobanco-IMM desenvolveu um grande esforço no sentido de proteger a privacidade dos dadores. Desta forma, após a colheita é atribuído um código ao dador e a identificação do indivíduo é guardada numa base de dados de acesso restrito. A informação clínica colhida é então introduzida numa base de dados.



**Figura 2** Esquema representativo do fluxo de amostras no Biobanco-IMM, desde o questionário clínico ao armazenamento da amostra nas instalações do biobanco. (Fonte: Biobanco IMM, Centro Académico de Medicina de Lisboa, 2013)

Após a colheita, as amostras são processadas de acordo com o tipo de amostra colhido e a sua finalidade (Figura 2). De forma a padronizar este processo, foram escritos procedimentos operacionais (SOPs) que são rigorosamente seguidos por todos os elementos da equipa. Nas SOPs estão descritos os procedimentos que devem ser seguidos para a realização da colheita, processamento e armazenamento das amostras. Quando a amostra chega ao laboratório é-lhe atribuído um código e esta é introduzida no sistema informático do Biobanco-IMM, o *Laboratory Information Management System* (LIMS), que permite ligação entre o código do dador e o código da amostra. As amostras são preservadas a temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$  e/ou  $-196^{\circ}\text{C}$ , de acordo com as especificações descritas nas SOPs, e o local específico de armazenamento é gravado no LIMS (Biobanco-IMM, 2012).

A partir da colheita de cada dador é possível obter amostras de diferentes tipos (Figura 3), de acordo com a necessidade de cada coleção. Atualmente, no Biobanco-IMM as amostras são predominantemente de soro (57%), seguido de sangue total (22%) e, por fim, DNA (10%).



**Figura 3** Diferentes tipos de amostras armazenadas atualmente no Biobanco-IMM (Fonte: Biobanco-IMM, Centro Académico de Medicina de Lisboa, 2013)

### 1.1.1. Aspectos Éticos e Legais

É essencial que toda a investigação que envolva seres humanos seja conduzida com integridade e de acordo com os mais elevados padrões éticos (Chalmers, D.,2011), respeitando a dignidade humana, os direitos humanos e a liberdade fundamental, como descrito na Declaração Universal de Bioética e Direitos Humanos (UNESCO, 2005).

Segundo a declaração Internacional de dados de genética humana, elaborada em 2003 pela UNESCO, os dados genéticos podem conter informação de relevância desconhecida no momento da colheita e a referida informação pode ser importante para os indivíduos ou para a comunidade. Este documento estabelece, também, os procedimentos éticos e legais a adoptar no caso da colheita de amostras, tais como um consentimento escrito, informado, prévio e livre do dador. (UNESCO, 2004; Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001). Contudo, e como se pretende que o biobanco seja um centro de amostras que têm como finalidade servir vários e diferentes projetos, o consentimento deverá ser suficientemente abrangente de forma a garantir a permissão do dador em estudos futuros, mas sem colocar em risco os seus direitos, especialmente o direito a abandonar o estudo (Walts G, 2007; Elger e Caplan, 2006). Desta forma, para que este consentimento geral seja aceite, pressupõe-se que duas condições são cumpridas: o projeto deverá ter a aprovação de uma Comissão de Ética e o dador mantém o direito de remover as suas amostras do estudo no momento em que o deseje fazê-lo (UNESCO, 2004; Recommendation Rec(2006)4 of the Committee of Ministers on Member States on Research on Biological Materials of Human Origin. *Council of Europe*. 2006; Elger e Caplan, 2006).

Tendo em conta que de um indivíduo podem ser extraídos vários tipos de dados e que importa relacionar os dados entre si, mas mantendo sempre a proteção do indivíduo, é sugerida a codificação das amostras de forma a impedir a identificação do dador durante o tratamento das amostras e dados (Auray-Blais e Patenaude, 2006). Contudo, a relação entre os dados do dador e a amostra será sempre mantida através do código atribuído à amostra e portanto protegido por anonimato durante todos os passos da investigação. Para que os poderes do dador sobre os seus dados se mantenham, este retém o direito de abandonar a investigação com garantia de que o

seu material biológico será destruído de forma apropriada (Decreto-Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro de 2005 (Anexo II); Uranga AM. et al, 2005).

Do ponto de vista legal, a natureza do material biológico é diferente dos dados que transporta, uma vez que a amostra é parte do corpo humano. O direito à integridade pessoal inclui o respeito pelas peças anatómicas, mesmo quando estas são removidas do corpo e enquanto é possível a identificação da sua origem; assim, o consentimento informado é o instrumento através do qual a utilização destas amostras é permitida de forma a garantir o respeito e proteção pelo material. Este documento é uma peça fundamental no biobanco, tanto do ponto de vista ético como legislativo, uma vez que abrange os direitos do dador para proteger os seus dados pessoais e serve os interesses da comunidade científica (Uranga AM. et al, 2005). No caso da existência de amostras biológicas anónimas cuja relação com o dador é impossível de restabelecer, estas podem ser utilizadas sem um consentimento prévio (Decreto-Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro de 2005; Kegley JA., 2004).

No Biobanco-IMM, a colheita e armazenamento de amostras com vista a investigação científica, está autorizada por parte da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte – Hospital de Santa Maria (aprovação de 17 de Setembro de 2008), bem como o tratamento de dados clínicos associados às amostras pela Comissão Nacional de Proteção de Dados (autorização número 7435/2011, de Julho de 2011) (Biobanco-IMM, 2012).

A utilização das amostras residentes no Biobanco-IMM pelos investigadores está também sujeita à avaliação por parte da Comissão Científica do Biobanco-IMM e do parecer de uma comissão de ética, garantindo o cumprimento das normas éticas aceites nacional e internacionalmente para o uso de material biológico para fins de investigação (Biobanco-IMM, 2012).

## 1.2. Amostras de DNA

A extração de DNA a partir de sangue total é considerada o *gold standard* para aplicação de técnicas de Biologia Molecular, pois permite a obtenção de DNA genômico, essencial para fins experimentais em estudos humanos, e a sua obtenção é rotineira, rápida e minimamente invasiva (Paltiel, L., 2012; Chacon-Cortes, D., 2012; Lim, M. D., 2012).

O DNA é uma macromolécula presente no núcleo das células que constitui o material genético dos organismos. A sua estrutura tridimensional consiste em duas cadeias em forma de hélice enroladas em torno de um eixo comum, formando uma dupla hélice. Cada cadeia de DNA é composta por monómeros chamados nucleótidos, formados por um açúcar (2'-desoxirribose), um ou mais grupos fosfato ligados ao carbono 5' do açúcar e uma base orgânica. Os nucleótidos presentes no DNA podem ser Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) e Citosina (C), que se ligam para formar uma cadeia de DNA, onde as partes básicas se projetam para o interior da hélice. O esqueleto de cada hélice é formado pelas ligações longitudinais entre o açúcar de um nucleótido e o fosfato do nucleótido seguinte. Por sua vez, as bases de uma hélice emparelham de modo complementar com as bases de outra hélice, de modo a que em frente de uma A fica sempre uma T e em frente de uma C fica sempre uma G. As bases ligam-se através de pontes de hidrogénio, sendo duas entre A e T e três entre C e G.

A informação genética que o DNA carrega reside na sua sequência de nucleótidos. Segmentos específicos de DNA, os genes, definem a estrutura biológica e mantêm íntegra a função celular uma vez que muitos deles contêm “instruções” para formar todas as proteínas de um organismo e, portanto, as células e tecidos do mesmo.

Desta forma, qualquer alteração na informação genética pode traduzir-se no funcionamento anormal de um órgão ou tecido, originando doença ou suscetibilidade para determinados acontecimentos (Lodish H. et al, 2008; Pierce B. et al, 2008).



### 1.3. Controlo de Qualidade das amostras de DNA

O material biológico que reside no Biobanco-IMM é uma ferramenta importante na investigação e é de extrema importância minimizar variações para fornecer aos investigadores amostras que permitam obter resultados fiáveis e reprodutíveis. Apesar dos procedimentos padronizados, as condições de colheita podem alterar significativamente as amostras e influenciar os resultados experimentais e a reprodutibilidade científica. (Moore, H. M., 2011). Os estudos que utilizam amostras residentes em biobancos dependem da qualidade tanto das amostras como dos dados associados. Assim, é essencial que todo o manuseamento seja efetuado com recurso a protocolos de controlo de qualidade (CQ) desenvolvidos de acordo com recomendações internacionais, garantindo que se encontram nas condições ideais. (Carter, A., 2011; Paltiel, L., 2012). Outro aspeto especialmente importante está relacionado com a interação com outras organizações, nacionais e internacionais, no que diz respeito à partilha de amostras, surgindo a necessidade de assegurar que as amostras utilizadas em projetos de colaboração passam por etapas pré-analíticas semelhantes. (Kiehintopf, M., 2011).

Os métodos atuais de avaliação de qualidade de ácidos nucleicos no Biobanco-IMM incluem a espectrofotometria ultravioleta (UV), usando o **Nanodrop-1000** (Thermo Scientific, EUA), de forma a determinar a concentração de DNA (ug/ul) e a razão A260/280, indicando o grau de pureza do DNA isolado. Após este passo, as amostras que obedecem aos critérios de qualidade são sujeitas a **eletroforese em gel de agarose**, permitindo avaliar a sua integridade. As amostras com qualidade são aquelas com concentrações acima de 10ng/μl, razão A260/280 entre 1,7 e 2,0 e bandas definidas no gel. De acordo com estes critérios, os dados dos primeiros dois anos de Biobanco-IMM indicam que apenas 4,6% das amostras de DNA não respeitaram o controle de qualidade. Apesar desta avaliação analítica das amostras, surge a necessidade de uma avaliação da funcionalidade do DNA para validar e completar o procedimento de controlo de qualidade, garantindo que as amostras que residem no Biobanco-IMM são viáveis e estão nas condições ótimas para serem utilizadas em técnicas de Biologia Molecular (Paltiel, L. 2012; Wahlberg, K. 2012).

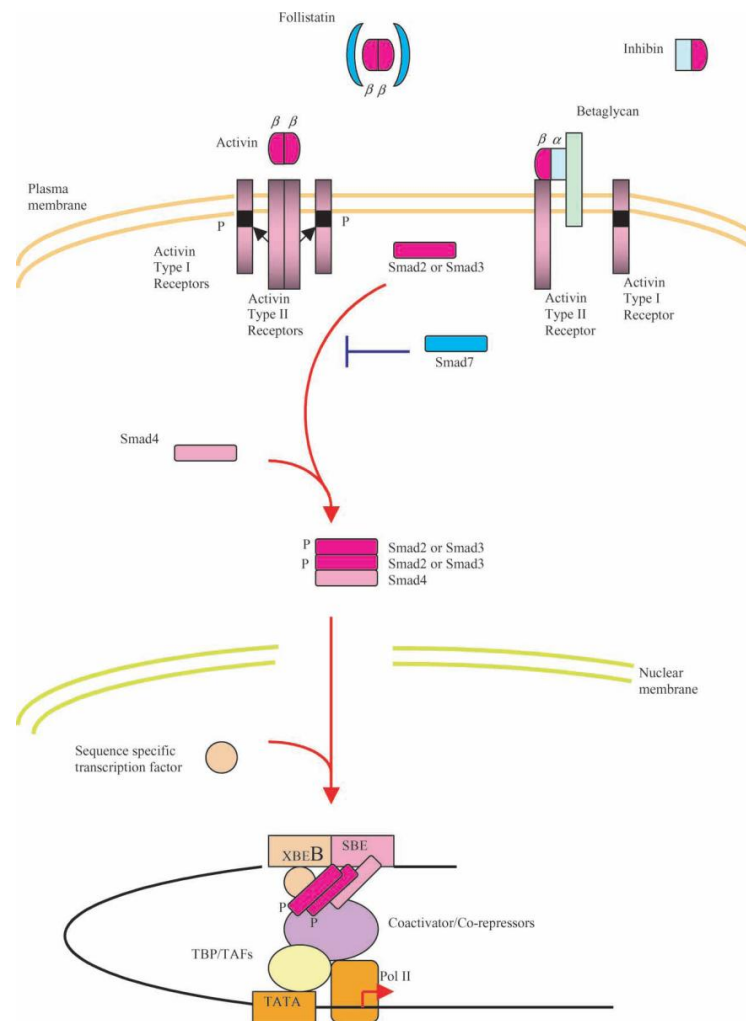
A interação do Biobanco-IMM com outras estruturas semelhantes permite a melhoria de procedimentos de forma a elevar a qualidade das amostras armazenadas. Para completar as diretrizes de controlo de qualidade, o Biobanco-IMM focou o seu interesse sobre o protocolo de avaliação de qualidade das amostras de DNA do Banco Nacional de ADN Espanhol, um dos maiores biobancos de DNA da Europa e do Mundo, com o qual foi estabelecida uma estreita colaboração. Neste biobanco, o controlo de qualidade passa pela mesma avaliação do grau de pureza e integridade das amostras de DNA, mas é também efetuada a análise da funcionalidade das amostras, validando o procedimento de controlo de qualidade, através da amplificação de 4 genes. No sentido de adaptar este protocolo à realidade do Biobanco-IMM, foram pesquisados os genes amplificados pelo biobanco espanhol e a seleção do gene a testar no presente estudo incidiu sobre o gene do recetor IIB da activina (ACVR2B), uma vez que é um gene presente em toda a população devido às funções que desempenha e, dos 4 genes presentes no protocolo espanhol, é o que está menos associado a patologias e permite desenhar um protocolo reprodutível.

### **1.3.1. Gene ACVR2B**

As activinas são proteínas que pertencem à superfamília de sinalização do *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) e que participam em vários processos biológicos como a síntese e secreção da hormona folículo-estimulante (FSH), eritropoiese, função dos ilhéus pancreáticos e inflamação, além da sua função direta no ovário e testículo (Xia, Y., 2009; Tuchida, K. et al, 2008).

As vias de sinalização do TGF- $\beta$  são centrais para os processos que controlam o crescimento, a diferenciação e o destino das células. A função de sinalização das activinas é mediada pela formação de um complexo com recetores transmembranares (ACVR), que podem ser do tipo I ou do tipo II. Os recetores do tipo I são essenciais para a transdução de sinal, e os recetores do tipo II são necessários para a ligação dos ligandos e para a expressão de recetores tipo I. A sinalização através de recetores TGF- $\beta$  envolve a ligação de um ligando extracelular a um recetor de tipo II. (Figura 4). O complexo recetor-ligando fosforila um recetor do tipo I, que por sua vez inicia

a cascata de sinalização intracelular por fosforilação das proteínas Smad2 e Smad3. Após a fosforilação, estas proteínas formam um complexo com a Smad4, que por sua vez se transloca para o núcleo, onde se liga ao DNA e, finalmente, modula transcrição de vários genes alvo. (Han, S. 2007; Funkenstein, B. 2012; Abe, Y. 2004).

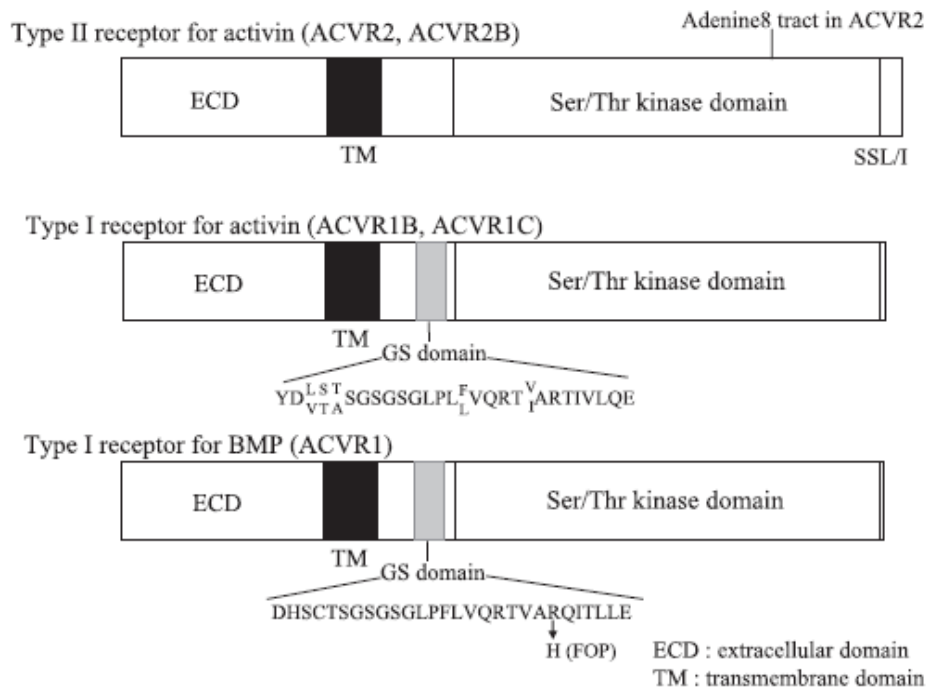


**Figura 4** Mecanismo intracelular de sinalização da activina. (Adaptado de Abe, Y. et al.2004).

O recetor de tipo II tem dois homólogos, ACVR-II e ACVR-IIB, sendo que este último tem uma afinidade para o ligando 3 a 4 vezes superior do que os recetores tipo II (Figura 5).

O recetor do tipo IIB da Activina (ACVR2B) é membro de uma família de recetores de sinalização que se ligam e são ativados por várias citocinas da família do

TGF- $\beta$ . O gene que codifica para o ACVR2B possui o mesmo nome e é composto por 11 exões, abrangendo cerca de 30 Kb de DNA genómico. A sua localização encontra-se no braço curto do cromossoma 3 e dá origem a uma proteína com 512 aminoácidos. (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q13705>; Ishikawa, S. et al. 1998). Estão relatadas semelhanças entre os genes ACVR2B de várias espécies, sugerindo uma relação evolucionária e que este é um gene conservado entre espécies (Figura 6).



**Figura 5** Esquema da estrutura dos recetores da activina (Adaptado de Tsuchida, et al, 2008).

Genes	Proteins
<i>Genes identified as putative homologs of one another during the construction of HomoloGene.</i>	<i>Proteins used in sequence comparisons and their conserved domain architectures.</i>
<a href="#">ACVR2B, <i>H.sapiens</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">NP_001097.2</a> 512 aa
<a href="#">ACVR2B, <i>P.trogodytes</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">XP_516369.2</a> 512 aa
<a href="#">ACVR2B, <i>M.mulatta</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">XP_001084713.1</a> 521 aa
<a href="#">ACVR2B, <i>C.lupus</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">XP_542709.1</a> 507 aa
<a href="#">ACVR2B, <i>B.taurus</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">NP_776920.1</a> 512 aa
<a href="#">Acvr2b, <i>M.musculus</i></a> activin receptor IIB	<a href="#">NP_031423.1</a> 536 aa
<a href="#">Acvr2b, <i>R.norvegicus</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">NP_113742.1</a> 512 aa
<a href="#">ACVR2B, <i>G.gallus</i></a> activin A receptor, type IIB	<a href="#">NP_989648.1</a> 512 aa
<a href="#">acvr2b, <i>D.reio</i></a> activin receptor IIB	<a href="#">NP_571285.1</a> 509 aa

**Figura 6** Resultado da homologia do gene ACVR2B na base de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

## **2. Objetivo**

Apesar de existir uma avaliação de qualidade das amostras de DNA residentes no Biobanco-IMM, impõe-se a necessidade de implementar de um método que valide e complemente este procedimento de controlo de qualidade.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular de base na investigação científica, que é bem conhecida e validada. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é implementar um método que comprove a funcionalidade das amostras de DNA armazenadas, utilizando a técnica PCR para amplificação do gene ACVR2B e, posteriormente, estabelecer o protocolo de controlo de qualidade interno no Biobanco-IMM.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1 Material Biológico**

Para a realização deste estudo foram selecionadas amostras de DNA extraído a partir de sangue periférico e armazenadas a -80°C no Biobanco-IMM.

Para a amplificação por PCR do gene ACVR2B, foram testadas 241 amostras, das quais 200 pertenciam a cinco coleções diferentes (controles, neurotumores, artrite reumatoide, fibrose cística e cardiologia) e 41 encontravam-se fora de, pelo menos, um dos parâmetros de controlo de qualidade.

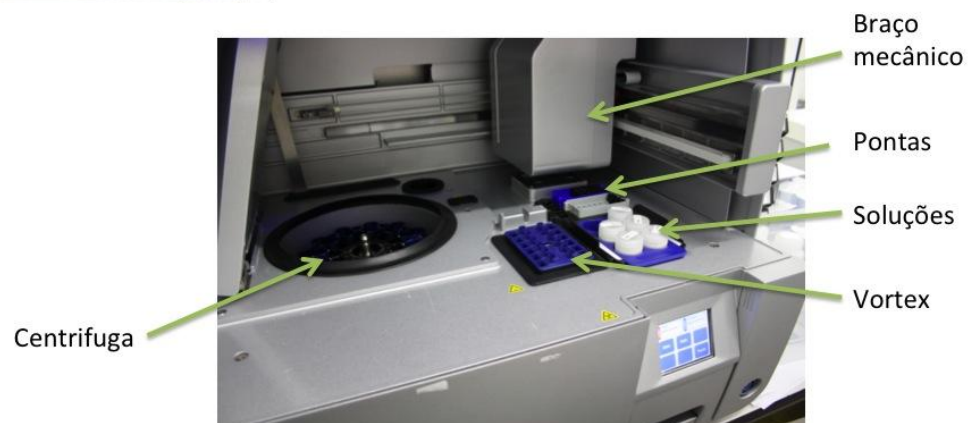
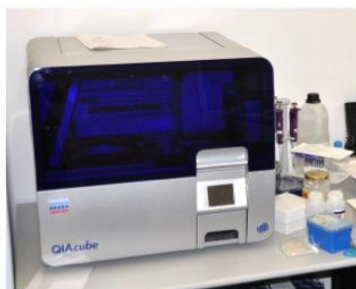
### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1. Extração de DNA**

A extração de DNA é o passo inicial dos procedimentos laboratoriais em estruturas como o Biobanco-IMM, e tem por objetivo obter DNA genómico de elevada qualidade e de concentração apropriada a partir de uma amostra biológica (Chacon-Cortes, D. 2012; Boesenberg-Smith, K. 2012) Este procedimento inicia-se com a libertação do material genético de sua fonte (fluido, tecido ou microrganismo), seguida da estabilização dos ácidos nucleicos, remoção de inibidores de amplificação e por último concentração do DNA num volume útil de solução aquosa compatível com as aplicações seguintes. A seleção de um método de extração deve basear-se em diversos aspetos como a pureza da amostra de ácidos nucleicos obtida, manuseamento, a relação custo-eficácia do procedimento ou a sua duração, podendo este passo ser realizado manualmente, com recurso a *kits* comerciais ou automaticamente. No Biobanco-IMM, a extração de DNA é automática, utilizando o *QIACube* (Qiagen, Alemanha) associado a kits de extração em coluna (Figura 7).

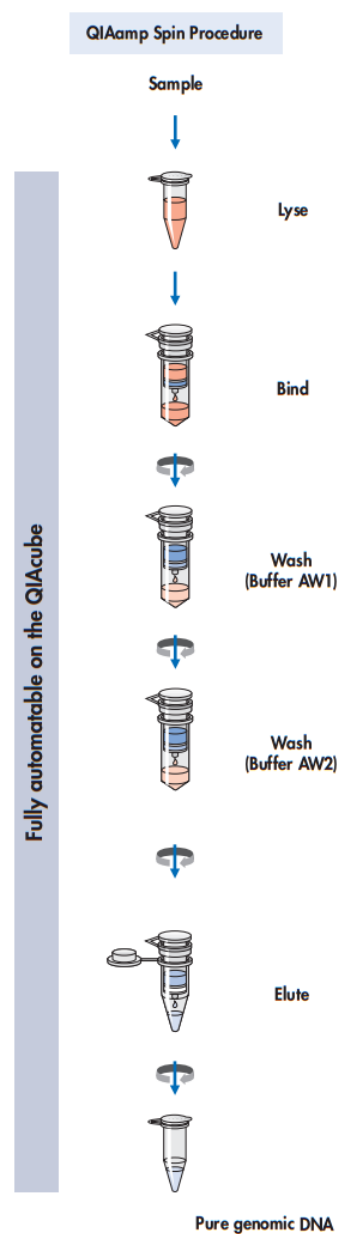
Estes kits fornecem métodos rápidos e fáceis para purificação de DNA a partir de diversos produtos como sangue total, plasma, soro, *buffy coat*, medula óssea e outros fluidos corporais, linfócitos, células de cultura, tecidos e amostras forenses. Os procedimentos envolvidos podem ser totalmente automatizados no *QIAcube*, aumentando a padronização e facilidade de uso, e são ideais para o processamento de várias amostras em simultâneo, produzindo DNA puro, pronto para amplificação direta. O procedimento *QIAamp* é adequado para utilização de sangue total fresco ou congelado, de sangue que tenha sido colhido em tubos com citrato, heparina ou EDTA.

O DNA é eluído em tampão ou água, permitindo a utilização direta em PCR ou outras metodologias. No Biobanco-IMM as amostras são congeladas de forma faseada, inicialmente a  $-20^{\circ}\text{C}$  e depois são armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  onde o DNA se mantém estável por mais tempo.



**Figura 7** Instrumento *QIAcube* da Qiagen. Vista dos compartimentos onde se processa a extração automática do DNA .

O DNA foi extraído com recurso ao kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen, Alemanha). Brevemente, adiciona-se proteinase K a 200 µl de sangue total e tampão de lise. Neste passo ocorre a lise celular e degradação de proteínas e restos membranares. Este tampão contém elevadas concentrações de sais (tiocianato de guanidina e isotiocianato de guanidina), que promovem a adsorção do DNA à membrana de sílica. Os passos seguintes incluem lavagem da membrana. As condições de pH e condições salinas asseguram que proteínas e outros contaminantes não são retidos na membrana de forma a eluir DNA em elevada concentração e bom grau de pureza (Figura 8) (Handbook Qiagen, 2012; Boesenberg-Smith, K. 2012).



**Figura 8** Esquema geral do procedimento de extração de DNA (Adaptado de Handbook Qiagen, 2012)



Por norma, uma amostra de 200µl de sangue total dá origem a 3–12 µg de DNA com uma razão de A260/A280 no intervalo 1,7–1,9 (Handbook Qiagen, 2012).

### 3.2.2. Quantificação e grau de pureza do DNA

Após extração de DNA, é importante a determinação da concentração e da pureza das amostra.

Para a quantificação de ácidos nucleicos, o método *standard* é a espectrofotometria. Nesta metodologia, a amostra de DNA é exposta a luz UV num comprimento de onda de 260nm e um foto-detetor mede a luz que atravessa a amostra. Quanto mais luz for absorvida, maior é a concentração de ácidos nucleicos na amostra. A lei de Lambert-Beer permite-nos relacionar a quantidade de luz absorvida com a concentração da molécula que a absorve. A um comprimento de onda de 260nm o coeficiente de extinção do DNA de cadeia dupla é 0.020 (µg/ml)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Assim, uma densidade ótica de 1 corresponde à concentração de 50ng/ml de DNA em cadeia dupla.

O *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific*, EUA) quantifica o DNA de cadeia dupla de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times \epsilon}{b}$$

Onde c é a concentração de DNA em ng/µl, Abs a absorvância, ε o coeficiente de extinção do DNA e b a altura da coluna criada no espectofotómetro (1cm).

É ainda importante medir a absorvância a 230nm e a 280nm uma vez que é comum as amostras de ácidos nucleicos estarem contaminadas com outras moléculas. Assim, ácidos nucleicos apresentam uma absorvância máxima a um comprimento de onda de 260nm, enquanto que as proteínas absorvem luz a 280nm e outros contaminantes orgânicos a 230nm. Com base nestas leituras, é calculada a razão A260/A280 é para indicar a pureza das amostras de DNA. O DNA puro deverá

apresentar uma razão A260/A280 que se situa entre 1,7 e 2,0 (Thermo Scientific, 2010).

Após a extração de DNA foi determinada a concentração e razão A260/A280 das amostras utilizando o *Nanodrop 1000*. A tecnologia deste aparelho segue um princípio semelhante à espectrofotometria convencional mas confere outras capacidades adicionais. O uso de uma pequena quantidade de amostra é a grande vantagem do instrumento, que requer apenas 1 a 2 µl de amostra. A amostra é retida entre duas fibras óticas que medem a absorvância de UV da amostra Para além de calcular a concentração da amostra e a sua razão A260/A280, este equipamento é acompanhado de um *software* que permite observar o espectro de absorvância da amostra em forma de gráfico permitindo que contaminações sejam detetadas mais facilmente com base no seu espectro de absorvância. (Boesenberg-Smith, K. 2012).

Uma vantagem adicional do *NanoDrop 1000* é o ciclo curto de medição do instrumento e facilidade geral de utilização aumenta grandemente a velocidade à qual as amostras podem ser processadas, o que torna possível a implementação de várias verificações de controlo de qualidade de amostras de ácidos nucleicos de forma rápida e fácil ao longo de um procedimento (Thermo Scientific, 2010).

### **3.2.3. Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do DNA**

A eletroforese é um método usado em biologia molecular para separar macromoléculas tais como proteínas ou ácidos nucleicos, baseado em propriedades físicas como o tamanho, forma e carga elétrica.

Na separação de DNA, é utilizada a eletroforese em gel de agarose que é sujeita à passagem de corrente elétrica. Devido aos grupos fosfatos dos nucleótidos, o DNA é carregado negativamente, migrando entre a malha de agarose para o polo positivo. O gel de agarose atua como um filtro seletivo para DNA de diferentes tamanhos moleculares, separando-os em bandas específicas à medida que o material genético se move de um elétrodo para outro. Assim, moléculas pequenas de DNA migram mais rapidamente que as maiores e a distância percorrida depende do seu tamanho. O DNA migrado é visualizado adicionando um agente intercalante

(tipicamente brometo de etídio ou semelhante) que é detetado quando irradiado com luz UV. O tamanho do fragmento gerado pode ser estimado por comparação com a mobilidade eletroforética (distância percorrida através do gel por unidade de tempo) de uma amostra de DNA com tamanhos conhecidos (Vinod, K.K., 2004; Lee, P, et al, 2012).

No caso do controlo de qualidade após extração, DNA de alto peso molecular íntegro surgirá como uma banda bem definida correspondente a um tamanho acima de 12kb, enquanto que o aparecimento de arrastamento indicará degradação do material genético. (Vinod, K K., 2004).

Na avaliação da integridade do DNA, foi preparado um gel de agarose a 1% (p/v) em Tris/Borato/EDTA (TBE) (Anexo III) a 1x e adicionados 5µl de *GelRed* (Biotium, EUA), para atingir uma concentração de 0,25x no gel. Foram aplicados 8µl de *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific, EUA) 1x, com 2µl de DNA em cada poço e usado o *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, EUA) como marcador de peso molecular (Anexo IV). Foi então aplicada uma corrente de 120 volts durante 20 minutos e após este tempo, o gel foi exposto à luz UV para detetar as bandas de DNA.

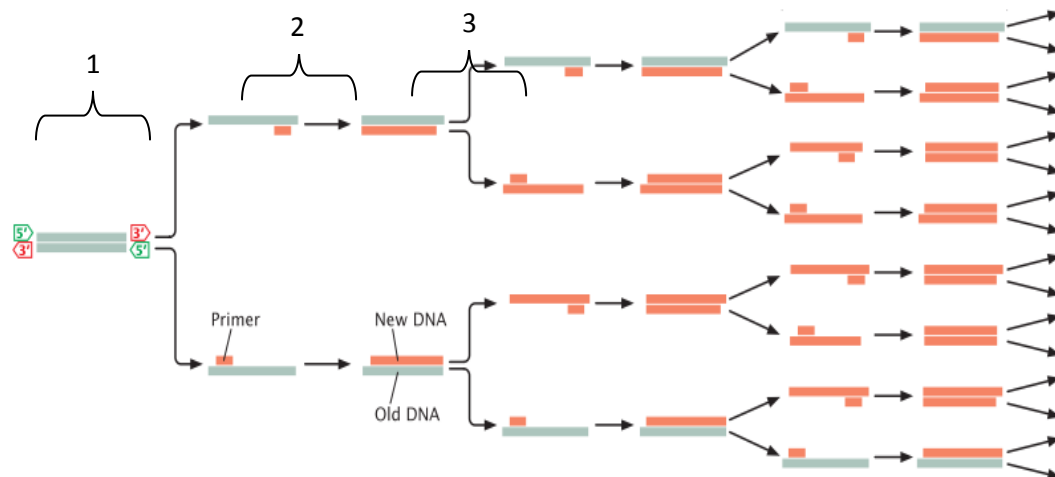
### 3.2.4. PCR

O PCR permite que fragmentos de DNA sejam amplificados de forma específica e exponencial em poucas horas. A base desta técnica consiste na replicação do DNA, catalizada pela DNA polimerase (Figura 9). Para que a DNA polimerase inicie o processo de replicação são utilizados dois pequenos fragmentos de DNA (18-28 nucleótidos), designados por *primers*, complementares à sequencia-alvo. Outros componentes necessários à reação são os nucleótidos (substrato da polimerase) e sais para permitir a ação da enzima. (Pelt-Verkuil, E. et al, 2008; Lodish, H. et al, 2008; Pierce, B. et al, 2008). Uma reação típica inclui 3 passos:

- Desnaturação: fase em que ocorre a separação da dupla cadeia de DNA.
- *Annealing*: os *primers* ligam-se à sequencia de DNA-alvo complementar. A temperatura utilizada neste passo é determinada pela temperatura de *melting* ( $T_m$ ,

definida como a temperatura de dissociação entre o *primer* e o molde) dos dois *primers*.

- Elongação: a DNA polimerase produz uma cópia das cadeias alvo de DNA.



**Figura 9** Reação em cadeia da Polimerase (PCR): a PCR permite a amplificação de fragmentos de DNA, tendo como base a replicação do DNA, catalizada pela enzima DNA polimerase, e que se divide em 3 passos: 1- ocorre a separação da dupla cadeia de DNA pelo aumento da temperatura (cerca de 90°C); 2- os *primers* se ligam à sequência complementar alvo quando a reação atinge a temperatura de *annealing*; 3- ocorre a síntese das novas cadeias de DNA, originando novas moléculas de DNA de dupla cadeia. Na PCR, a cada repetição deste ciclo, a quantidade de DNA duplica. (Adaptado de Pierce, B. et. Al, 2008)

Para a realização do PCR para amplificação do gene ACVR2B, foram desenhados *primers* específicos para o gene-alvo usando o software *Primer-BLAST* (Ye J. e al, 2012) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para esta etapa foram tidas em atenção as seguintes características dos primers:

- Tamanho entre 18–28 nucleótidos, o que confere uma boa especificidade a uma única sequência alvo, mesmo com um molde complexo como o DNA genómico humano;
- Conteúdo ideal em GC é de 40-60%, o que confere uma Tm mais elevada, aumentando a especificidade para o DNA molde;

- Ambos os *primers* devem ter  $T_m$  que diferem entre si apenas 2 a 5 ° C, assegurando que é atingida a temperatura de emparelhamento apropriada para os dois *primers* no passo de *annealing*.
- Devem ser evitadas sequências que sejam complementares no próprio *primer*, para evitar a formação de estruturas secundárias, nem com o outro *primer*, para evitar a formação de dímeros que podem competir com a amplificação do produto de PCR pretendido (McPherson, M. et al, 2006; (Grunenwald, H., 2003).

Após avaliação dos resultados obtidos, a sequência selecionada para o “*primer forward*” foi 5’- GCAGCCAACAACCTAACCATC – 3’, e para o “*primer reverse*” foi 5’- GCTGTGCTAATGGAAAAATCCC -3’, que após amplificação resultam num fragmento com o tamanho de 253pb.

Existem protocolos padrão para a amplificação por PCR. No entanto, um único protocolo não será apropriado para todas as situações, devendo cada nova reação de PCR ser sujeita a otimização, isto é, devem ser ajustados os parâmetros que influenciam a especificidade e eficiência da reação, evitando a amplificação de produtos inespecíficos ou a formação de dímeros de *primers*.

O parâmetro chave que determina o sucesso da reação de PCR é a temperatura à qual os *primers* se ligam à sequência-alvo - temperatura de *annealing*. Esta temperatura situa-se geralmente 5°C abaixo da temperatura de *melting* dos *primers*. Assim, uma das formas de otimização do PCR é realizar um gradiente que compreenda um intervalo que inclua estas temperaturas, a fim de determinar a mais específica ( Roux, K. H. 2009).

Neste trabalho, foi efetuada uma otimização da temperatura de *annealing* dos *primers* com um gradiente de temperaturas no intervalo de 53°C a 58°C. Para 20µl de volume de reação, foi utilizado tampão de PCR a 1x, 2mM de dNTP’S, MgCl<sub>2</sub> numa concentração de 1µM, 0,38µM de cada *primer* e 0,3 unidades de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA). Em conjunto com as amostras foi também testado um controlo negativo com água.

O programa de PCR para a realização do gradiente de temperaturas encontra-se descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** Programa de PCR para realização do gradiente de temperatura no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Holanda)

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C	3 min	
<b>Desnaturação</b>	94°C	60 seg	
<i>Annealing</i>	53°/54°/55°C/56°C/57°C/58°C	40 seg	40 ciclos
<b>Extensão</b>	72°C	60 seg	
<b>Extensão Final</b>	72°C	10 min	

Para visualizar o produto do PCR, foi utilizado *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific, EUA) a 3x. O *loading dye* contém glicerol de forma a conferir densidade à amostra permitindo que esta assente no fundo do poço quando é aplicada no gel. Para além disso, como contém xileno de cianol e *Orange G* permite a visualização da distância que os fragmentos de DNA migraram.

Foram aplicados 10µl da mistura de produto de PCR com *loading dye* em cada poço do gel de agarose a 1% em TBE 1x, com *GelRed* a 0,25X, e a eletroforese decorreu durante 60 minutos a uma voltagem constante de 80 volts, utilizando o marcador de peso molecular *GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific, EUA) (Anexo V). O resultado foi visualizado e analisado no sistema *ChemiDoc XRS+* (BioRad, EUA).

### 3.2.4.1. Amplificação do gene ACVR2B

Após determinação da temperatura ótima de *annealing*, a amplificação do gene ACVR2B foi realizada nas condições descritas na Tabela 2. As amostras foram testadas em conjunto com um controlo negativo, utilizando água, em cada reação. O programa de PCR foi o mesmo já descrito na Tabela 1, mas utilizando 56°C como temperatura de *annealing*.

**Tabela 2** Preparação da mix de PCR para amplificação do gene ACVR2B

Reagente	Concentração na reação	Volume
Tampão de PCR (10X)	1x	2 µl
DNTP'S (10µM)	0,2mM	2µL
MgCl <sub>2</sub> (50µM)	1 mM	0,4 µl
Primer VAN-F (10µM)	0,38µM	0,75µl
Primer VAN-R (10µM)	0,38µM	0,75µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	1,5U	0,3 µl
H <sub>2</sub> O		12,8 µl
	<b>Volume final de reação:</b>	<b>20µl</b>

Tal como anteriormente, para visualizar o produto do PCR foi efectuada uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em TBE 1x, e usando *GelRed* diluído a 0,25x. A corrida decorreu a uma voltagem constante de 90 volts durante 60 minutos e como marcador de peso molecular foi usado o *GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder*.

Sempre que não se tenha verificado a presença de banda no controlo da eficiência do produto de PCR, o protocolo foi repetido mais uma vez, de forma a evitar resultados falsamente negativos.

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterização das amostras

Para a realização do estudo da funcionalidade de amostras de DNA foram utilizadas amostras armazenadas no Biobanco-IMM que pertencem a diferentes coleções e que foram avaliadas segundo o procedimento de CQ acima referido, que engloba a determinação da concentração de DNA e grau de pureza bem como a avaliação da integridade do material genético.

**Tabela 3** Descrição das coleções residentes no Biobanco-IMM utilizadas neste estudo (Fonte: Biobanco IMM, 2013)

<b>Coleção</b>	<b>Descrição</b>	<b>Nº de amostras utilizadas</b>
<b>Controlos</b>	Coleção de amostras de controlos, baseada num questionário e entrevista por um médico.	100
<b>Neurotumores</b>	Coleção de amostras de doentes com tumores cerebrais.	25
<b>Artrite Reumatóide</b>	Coleção de amostras de doentes com Artrite Reumatóide.	25
<b>Fibrose Cística</b>	Coleção de amostras de doentes com Fibrose Cística.	25
<b>Cardiologia</b>	Coleção de amostras de doente com insuficiência cardíaca.	25



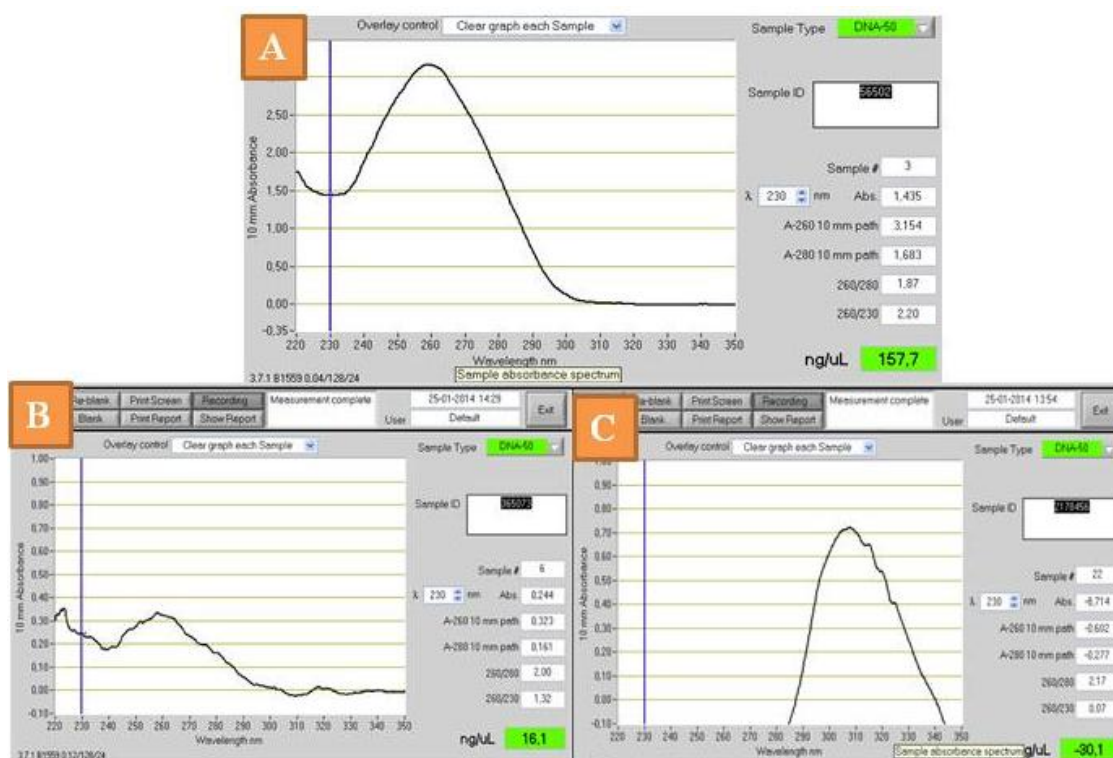
Relativamente aos parâmetros de concentração e grau de pureza, as amostras correspondentes às coleções acima referidas encontravam-se dentro do intervalo aceitável (Tabela 4).

**Tabela 4** Resultados da concentração média e grau de pureza avaliados pelo equipamento *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific) das amostras de DNA das diferentes coleções utilizadas neste estudo.

<b>Coleção</b>	<b>Género*</b>	<b>Idade (Anos)</b>	<b>Concentração de DNA (ng/ul)</b>	<b>Razão A260/280</b>
<b>Artrite Reumatóide</b>	20%F; 80%M	59 ±11	46,59±25,63	1,81±0,13
<b>Cardiologia</b>	44%F; 56%M	64±24	65,26±28,13	1,91±0,17
<b>Neurotumores</b>	36%F; 56%M;	50±20	87,62±55,46	1,86±0,10
<b>Fibrose Cística</b>	68%F; 32%M	39±15	48,79±19,99	1,92±0,12
<b>Controlos saudáveis</b>	50%F; 50%M	32±16	49,99±16,96	1,92±0,10

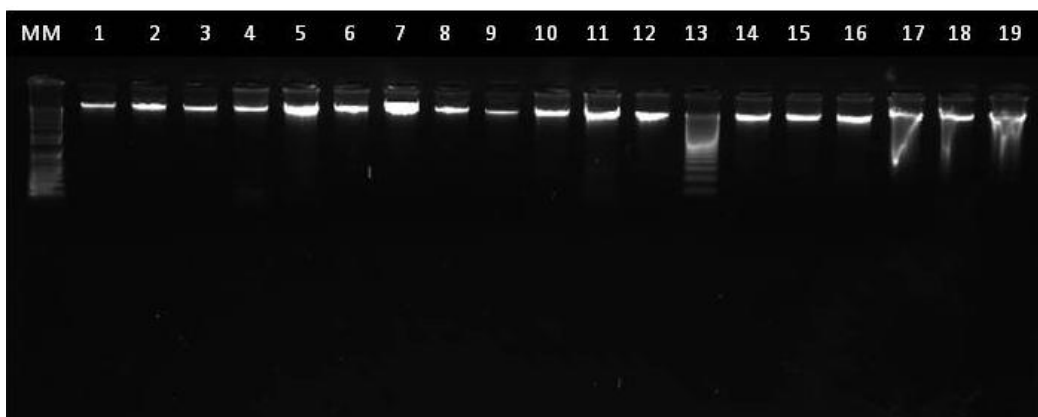
\*F-Feminino; M-Masculino;

Os resultados obtidos são observados através do *software* do equipamento *Nanodrop 1000*, que apresenta o espectro de absorção em forma de gráfico (Figura 10).



**Figura 10** Representação de espectros de absorção de ácidos nucleicos. O gráfico é desenhado pelo software associado ao equipamento *Nanodrop 1000* e traduz a absorvância das amostras a comprimentos de onda específicos. **A-** Espectro de absorção típico de uma amostra de DNA que se inclui no intervalo desejado de valores da razão A260/280 (1,7 - 2,0); **B,C-** Exemplos de perfis de absorção anormais resultantes de contaminações.

Após a determinação deste parâmetros, as amostras foram avaliadas quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), em que são comparadas com o marcador de peso molecular *1kb Plus DNA Ladder* que apresenta um padrão de bandas de referência de 250 pb a 10 000 pb. Desta forma é possível detetar a presença de uma banda de elevado peso molecular, resultado esperado uma vez que se tratam de amostras de DNA genómico (Figura 11).



**Figura 11** Exemplo de avaliação da integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) Legenda: MM- Marcador Molecular *1kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific); 1-12- DNA genómico íntegro; 13 – DNA genómico degradado; 14-16- DNA genómico íntegro; 17-19- DNA genómico degradado.

As amostras com parâmetros fora do controlo de qualidade não possuíam informações sobre o género e idade dos dadores. A concentração média de DNA destas amostras era de 667,7 ng/ $\mu$ l e a razão A260/A280 média situava-se no valor 1,80 (Tabela 5).

**Tabela 5** Resultados da quantificação, grau de pureza e integridade das amostras que se situavam fora do intervalo da razão A260/280

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/ul)</b>	<b>Razão A260/280</b>	<b>Integridade</b>
<b>1</b>	25,0	0,83	OK
<b>2</b>	1,8	2,06	SEM BANDAS
<b>3</b>	11,0	2,84	OK
<b>4*</b>	202,0	1,34	OK
<b>5</b>	8,3	2,24	OK
<b>6</b>	29,7	1,17	OK
<b>7</b>	22,3	1,63	OK
<b>8</b>	14,6	1,46	OK
<b>9</b>	42,5	1,68	OK
<b>10</b>	15,2	2,04	OK
<b>11*</b>	150,2	0,57	OK
<b>12</b>	11,6	2,94	OK
<b>13</b>	24,3	1,68	OK
<b>14*</b>	192,0	1,1	SEM BANDAS
<b>15*</b>	82,0	3,02	OK
<b>16*</b>	21,6	1,17	OK
<b>17</b>	1544,6	1,87	DNA DEGRADADO
<b>18</b>	312,2	1,86	DNA DEGRADADO
<b>19</b>	1342,1	1,86	DNA DEGRADADO
<b>20</b>	794,8	1,89	DNA DEGRADADO

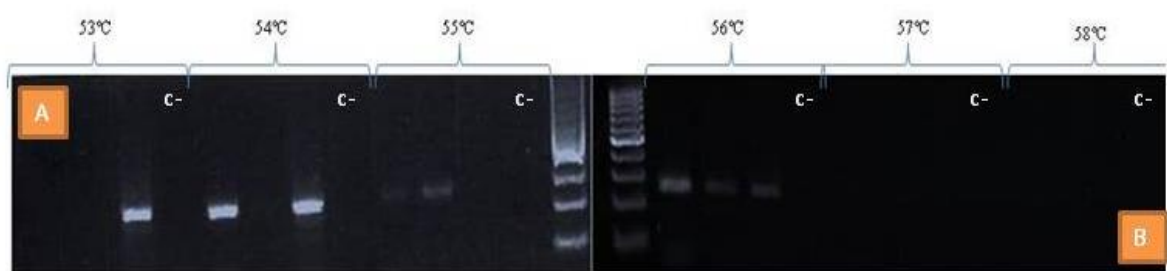
<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/ul)</b>	<b>Razão A260/280</b>	<b>Integridade</b>
<b>21</b>	350,2	1,86	DNA DEGRADADO
<b>22</b>	577,3	1,79	DNA DEGRADADO
<b>23</b>	1842,3	1,86	DNA DEGRADADO
<b>24</b>	415,4	1,85	DNA DEGRADADO
<b>25</b>	314,7	1,84	DNA DEGRADADO
<b>26</b>	591,3	1,80	DNA DEGRADADO
<b>27</b>	1455,6	1,86	DNA DEGRADADO
<b>28</b>	800,8	1,87	DNA DEGRADADO
<b>29</b>	1014,9	1,86	DNA DEGRADADO
<b>30</b>	2421,3	1,84	DNA DEGRADADO
<b>31</b>	1225,6	1,88	DNA DEGRADADO
<b>32</b>	908,6	1,89	DNA DEGRADADO
<b>33</b>	743,0	1,85	DNA DEGRADADO
<b>34</b>	756,4	1,83	DNA DEGRADADO
<b>35</b>	1042,2	1,84	DNA DEGRADADO
<b>36</b>	1026,3	1,84	DNA DEGRADADO
<b>37</b>	2656,8	1,81	DNA DEGRADADO
<b>38</b>	1437,4	1,84	DNA DEGRADADO
<b>39</b>	793,8	1,87	DNA DEGRADADO
<b>40</b>	723,1	1,86	DNA DEGRADADO
<b>41</b>	1431,3	1,85	DNA DEGRADADO

\*: amostras contaminadas após extração

Após avaliação das 241 amostras segundo o procedimento de CQ aplicado no Biobanco-IMM é possível determinar que, relativamente à pureza do DNA, 93,4% das amostras encontravam-se dentro do intervalo 1,7-2,0, e 6,6% não foram aceites neste parâmetro. Relativamente à integridade do DNA em gel de agarose, 11,2% das amostras não apresentaram bandas definidas ou nenhuma banda após extração, enquanto que 88,8% das amostras revelaram bandas de alto peso molecular no gel de CQ. Menos de 1% das amostras encontravam-se fora de ambos os parâmetros.

## 4.2 Optimização das condições de PCR

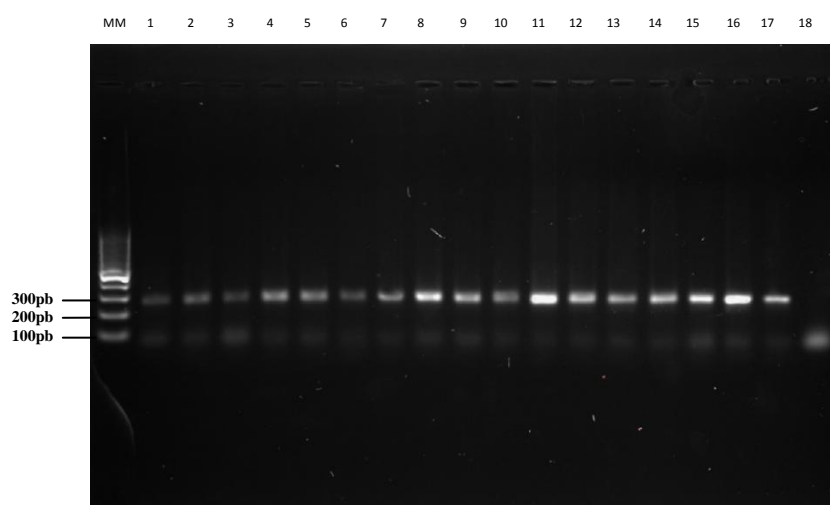
Para determinar a melhor temperatura de *annealing* dos *primers* foi feito um gradiente de seis temperaturas entre os 53°C e os 58°C. A amplificação mais específica ocorreu a uma temperatura de *annealing* de 56°C.



**Figura 12** Gradiente de temperaturas em gel de agarose a 1%(p/v); A- amplificação das amostras num intervalo de temperaturas entre 53°C e 55°C; B- amplificação das amostras num intervalo de temperaturas entre 56°C e 58°C. Para cada temperatura, estão representadas duas amostras e um controlo negativo. MM- Marcador Molecular *O'GeneRuler 100pb DNA Ladder* (ThermoScientific).

### 4.3. Visualização do produto amplificado em gel de agarose a 1% (p/v)

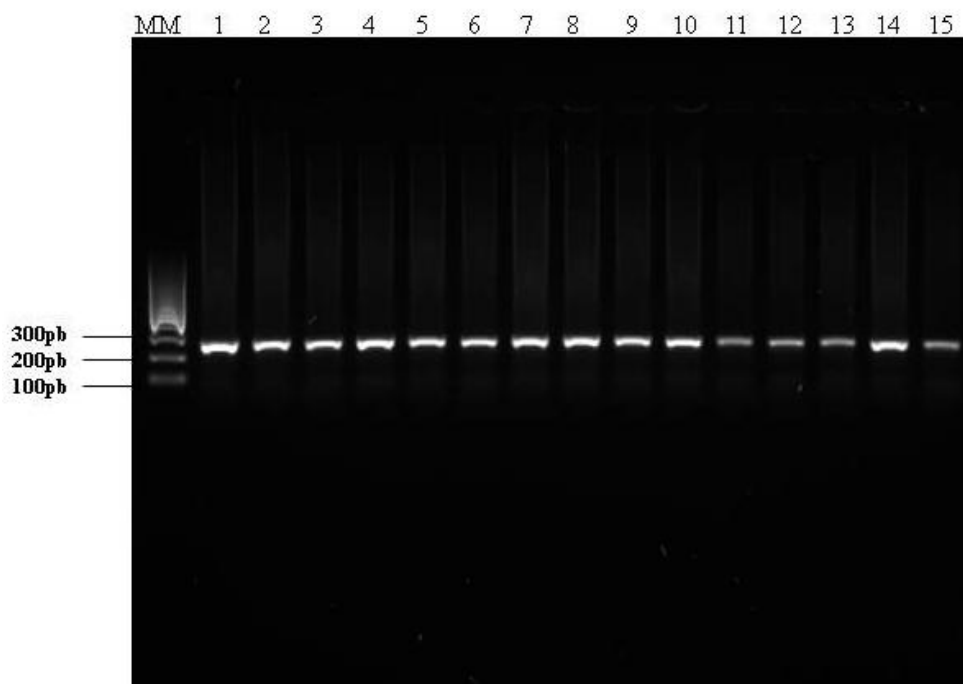
Todas as amostras das cinco coleções selecionadas amplificaram para o gene ACVR2B, podendo observar-se no gel de agarose um fragmento com cerca de 253pb (Figura 13), correspondente ao fragmento amplificado pelos *primers* desenhados.



**Figura 13** Visualização do gene ACVR2B amplificado por PCR em gel de agarose a 1%.  
Legenda: MM- Marcador molecular *O'GeneRuler 100pb DNA Ladder* (ThermoScientific); 1-9 – Amostras pertencentes à coleção Artrite Reumatóide; 10-17 – Amostras pertencentes à coleção Cardiologia; 18 – Controlo negativo.

Das amostras fora dos parâmetros do controlo de qualidade, podemos distinguir 3 grupos: amostras que apresentavam DNA degradado ou ausente na eletroforese em gel de agarose mas com razão A260/A280 aceitável (25 amostras); amostras cujo grau de pureza estava fora dos valores aceitáveis, mas apresentavam uma banda íntegra no gel de agarose (14 amostras); e ainda 2 amostras que não respeitavam nenhum dos parâmetros da qualidade. Há ainda a ter em conta que 5 destas amostras não se encontravam nas condições esperadas após extração, tendo sido observado a presença física de contaminantes resultantes do procedimento de extração no produto de DNA final, mas que foram sujeitas ao procedimento de controlo de qualidade e também foram avaliadas quanto à sua funcionalidade.

Desta forma, as 25 amostras do primeiro grupo todas apresentaram amplificação do gene ACVR2B. Das amostras do segundo grupo, observou-se amplificação do gene em 10 amostras de DNA. Das amostras que não respeitavam nenhum dos parâmetros da qualidade, apenas uma apresentou amplificação do gene. Foi determinado assim que 87,8% das amostras que se encontravam fora dos parâmetros aceitáveis do procedimento de CQ amplificaram para o gene ACVR2B (Figura 14).



**Figura 14** Visualização do gene ACVR2B amplificado por PCR em gel de agarose a 1% de amostras classificadas como fora dos parâmetros de integridade do DNA no controlo de qualidade. Legenda: MM - Marcador molecular *O'GeneRuler 100pb DNA Ladder* (ThermoScientific)



## 5. Discussão

No Biobanco-IMM as amostras são colhidas e armazenadas por longos períodos de tempo sendo de extrema importância que sejam de elevada qualidade. Para cumprir este requisito, os procedimentos do biobanco efetuam-se de acordo com diretrizes internacionais para a avaliação da qualidade das amostras que armazena.

No Biobanco-IMM, a maioria do DNA é obtido a partir de amostras de sangue. A extração de DNA é efetuada de forma automática e procede-se à quantificação do DNA e determinação do grau de pureza (A260/A280) usando o *Nanodrop 1000*. A integridade do DNA é avaliada pela observação de bandas definidas em eletroforese em gel de agarose. No entanto, é igualmente importante demonstrar a funcionalidade do DNA uma vez que no momento em que as amostras são armazenadas não são conhecidas as metodologias em que poderão ser utilizadas. (Ivarsson, M. 2011; Wahlberg, K., 2012) Assim, este trabalho teve por objetivo implementar um método que comprove a funcionalidade das amostras de DNA armazenadas pela amplificação do gene ACVR2B por PCR.

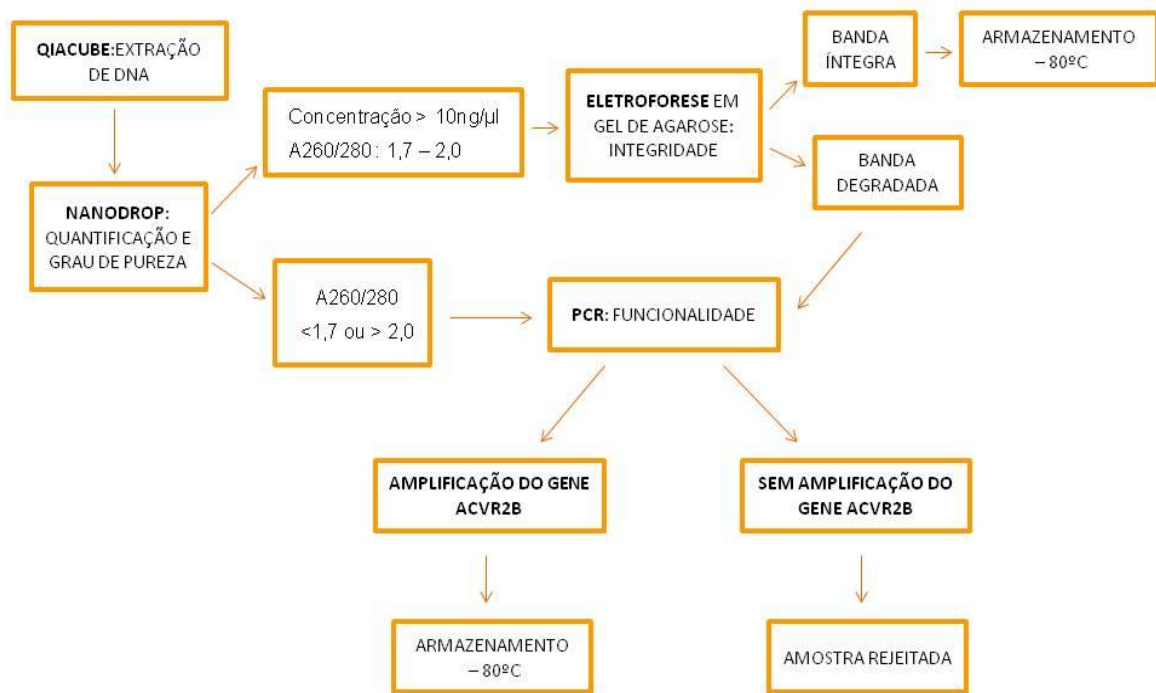
As amostras utilizadas neste estudo foram selecionadas de forma a representarem as diferentes coleções existentes no Biobanco-IMM. Por outro lado, e como algumas amostras são únicas e preciosas, pretendemos avaliar as amostras que falharam o controlo de qualidade de forma a determinar se estas poderão ou não ser utilizadas para determinados procedimentos. Assim, foram testadas 241 amostras, das quais 100 pertenciam à coleção controlos, 25 da coleção de Artrite Reumatóide, 25 da coleção de Cardiologia, 25 da coleção de Fibrose Cística, 25 da coleção de Neurotumores e 41 amostras sinalizadas como fora do CQ.

O gene ACVR2B, localizado no braço curto do cromossoma 3, dá origem a uma proteína transmembranar com 512 aminoácidos, o receptor IIB da activina, que intervém nas vias de sinalização da família do TGF- $\beta$ , sendo estes processos essenciais no crescimento e diferenciação celular. Através da amplificação deste gene, usando um protocolo de PCR clássico, foi possível determinar que as amostras pertencentes às cinco coleções utilizadas neste estudo apresentam boa funcionalidade, isto é, observou-se amplificação do fragmento esperado no controlo da eficiência do produto de PCR. Não foi ainda observada qualquer diferença entre amostras da coleção controlos e as amostras pertencentes a coleções de patologias,

ou entre dadores do sexo feminino e masculino ou de diferentes idades. Relativamente às amostras fora do controlo de qualidade, das 41 testadas foi observada amplificação em 36 amostras (87,8%). Nas 25 amostras que não apresentavam uma banda definida no CQ por eletroforese em gel de agarose foi observada amplificação do gene. Por outro lado, das amostras que não se enquadravam no intervalo 1,7-2,0, embora fossem aceites no parâmetro da integridade, apenas em 10 (71,4%) foi detetada amplificação. No entanto, este resultado não foi surpreendente uma vez que as restantes 4 amostras, bem como uma das amostras que não respeitava nenhum dos parâmetros de qualidade, não amplificaram mas correspondem às amostras que não se encontravam nas melhores condições após a extração, o que comprova que o DNA não se encontrava no grau de pureza mais indicado (tal como indica a razão A260/280). Por fim, é de notar que uma das amostras que se encontravam fora de ambos os parâmetros de controlo de qualidade apresentou amplificação para o gene ACVR2B.

## 6. Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos, sugere-se que a adaptação do procedimento de CQ das amostras de DNA passe por acrescentar a técnica de PCR quando as amostras traduzam uma razão  $A_{260}/280 < 1,7$  ou  $> 2,0$  e/ou não apresentem uma banda íntegra em gel de agarose. Caso não se observe amplificação, estas amostras deverão ser rejeitadas (Figura 15).



**Figura 15** Sugestão do procedimento de CQ de amostras de DNA a implementar no Biobanco-IMM. Após extração, o DNA é quantificado e avaliado o seu grau de pureza pela razão  $A_{260}/280$ , bem como observada a sua integridade por eletroforese em gel de agarose. As amostras que se encontrem fora do intervalo 1,7-2,0 e/ou que não apresentem uma banda íntegra no gel devem ser avaliadas quanto à sua funcionalidade por PCR. Se as amostras amplificarem o gene ACVR2B serão conservadas, caso contrário, as amostras devem ser rejeitadas.

Assim, é possível concluir que as amostras armazenadas no Biobanco-IMM, incluindo as que não cumprem nenhum dos parâmetros do controlo de qualidade aplicado no biobanco, podem ser utilizadas em técnicas de Biologia Molecular como o PCR, sendo esta última um método eficaz para determinar a funcionalidade das amostras.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Lim, M. D, Compton, C. C. (2012) “Before you analyze a human specimen, think quality, variability, and bias”, *Anal Chem*, 83(1), pp. 8–13.
2. Relatório Biobanco-IMM, Centro Académico da Faculdade de Medicina de Lisboa, 2013.
3. Kiehntopf, M., Krawczak, M. (2011) “Biobanking and international interoperability: samples”, *Human genetics*, 130(3), pp. 369–76.
4. Chalmers, D. (2011) “Genetics research and Biobanks”, in J. Dillner, (Ed.) *Methods in Biobanking, Methods in Molecular Biology*, Vol. 675. NJ:Humana Press, Totowa, EUA.
5. Paltiel, L., Aarem, J., Bækken, S., Stensrud, N. K., Harbak, K. (2012) “Biospecimen quality program in the biobank of the Norwegian Institute of Public Health”, *Norsk Epidemiologi* 21(2), pp. 225–229.
6. Auray-Blais C, Patenaude J. (2006) “A biobank management model applicable to biomedical research”, *BMC Medical Ethics*, 7. Pp. 4-15.
7. Walts G. (2007), “Genes on ice”, *BMJ*, 334, pp.662-663.
8. Chacon-Cortes, D., Haupt, L. M., Lea, R. a, Griffiths, L. R. (2012) “Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study”, *Molecular biology reports*, 39(5), pp. 5961–6.
9. Pierce, B. A (2008) “Genetics - A Conceptual Approach” (4th ed.), W. H. Freeman and Company, New York, EUA.
10. Moore, H. M., Kelly, A., Jewell, S. D., McShane, L. M., Clark, D. P., Greenspan, R., Vaught, J. (2011) “Biospecimen Reporting for Improved Study Quality”, *Biopreservation and biobanking*, 9(1), pp. 57–70.
11. Carter, A., Betsou, F. (2011) “Quality Assurance in Cancer Biobanking”, *Biopreservation and Biobanking*, 9(2),pp. 157–163.
12. Wahlberg, K., Huggett, J., Sanders, R., Whale, A. S., Bushell, C., Elaswarapu, R., Foy, C. (2012) “Quality Assessment of Biobanked Nucleic Acid Extracts for Downstream Molecular Analysis”, *Biopreservation and Biobanking*, 10(3), pp. 266–275.

13. Xia, Y., & Schneyer, A. L. (2009) “The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function”, *The Journal of Endocrinology*, 202(1), pp.1–12.
14. Abe, Y., Minegishi, T., Leung, P. C. K. (2004) “Mini Review Activin Receptor Signaling”, *Growth Factors*, 22(2), pp. 105–110.
15. Han, S., Loulakis, P. A. T., Griffor, M. (2007) “Crystal structure of activin receptor type IIB kinase ° resolution domain from human at 2 .0 Å”, *Protein Science*, pp. 2272–2277.
16. Funkenstein, B., Krol, E., Esterin, E., Kim, Y.-S. (2012) “ Structural and functional characterizations of activin type 2B receptor (acvr2b) ortholog from the marine fish, gilthead sea bream, Sparus aurata: evidence for gene duplication of acvr2b in fish”, *Molecular Endocrinology*, 49, pp. 175–192
17. Ishikawa, S., Kai, M., Murata, Y., Tamari, M., Daigo, Y., Murano, T., Nakamura, Y. (1998) “Genomic organization and mapping of the human activin receptor type IIB (hActR-IIB) gene”, *Journal of human genetics*, 43(2), pp. 132–4.
18. Boesenberg-Smith, K. a., Pessarakli, M. M., Wolk, D. M.(2012) “Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting”, *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), pp. 1–6.
19. Vinod K. K. (2004) “Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation. In: Proceedings of the training programme on “Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training”, pp. 109-121, *Tamil Nadu Agricultural University*, Coimbatore, India.
20. Ash, D. L., Page, A. F., (s.d) “Microvolume Quantification of Nucleic Acids in Molecular Diagnostics Sample Quality Control in Molecular Diagnostics”, Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, DE 19810.
21. Thermo Scientific, T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers (s.d) “Assessment of Nucleic Acid Purity”. [Consultado em 26.01.2014]. Disponível em <http://www.nanodrop.com>
22. Qiagen, (2012) “QIAmp DNA Mini and Blood Mini Handbook” [Consultado em 01.02.2014]. Disponível em <http://www.qiagen.com>
23. Grunenwald, H. (2003). PCR Protocols, in Bartlett, John, M. S. (Ed.) *Methods in Molecular Biology*, 226, Humana Press Inc., Totowa, EUA.

24. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. (2008) “*Molecular Cell Biology*” (7th ed.), W.H. Freeman and Company (Ed.), New York, EUA.
25. Kegley JA.(2004) “Challenges to informed consent”, *EMBO reports*, 5, pp. 832-836
26. [www.biobanco.pt](http://www.biobanco.pt)
27. Biobanco-IMM (2012) PROCEDIMENTO OPERATIVO NORMALIZADO SOP.BIO.001 “PROCEDIMENTO GERAL”. Disponível em [www.biobanco.pt](http://www.biobanco.pt)
28. Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, (4).
29. McPherson, M., Møller, S. (2006) “ PCR – The basics”(2th ed.), Owen, E. (Ed), Taylor & Francis Group, Abingdon, Reino Unido.
30. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13705>
31. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012) “Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments”, *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (62), 1–5.
32. Pelt-Verkuil, E. v., Belkum, A. v., Hays, J. P. (2008) “ Principles and Technical Aspects of PCR Amplification”, Springer (Ed.), Holanda.
33. Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos. *UNESCO*. 19 de Outubro de 2005.
34. Recommendation Rec(2006)4 of the Committee of Ministers on Member States on Research on Biological Materials of Human Origin. *Council of Europe*.
35. Elger BS, Caplan AL. (2006) “Consent and anonymization in research involving biobanks”, *EMBO reports*, 7:661-666
36. Decreto-Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro de 2005 - Informação genética pessoal e informação de saúde. *Diário da República – I série A*, nº18.
37. Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. *Official Journal of the European Communities* 2001, L121: 34-44.
38. Declaração Internacional Sobre os Dados Genéticos Humanos. *UNESCO*. 16 de Outubro de 2004.

39. Uranga, AM., Martín-Arribas, MC., Donato, JH., Paz, MP. (2005)  
“Outstanding legal and ethical issues on biobanks - an overview on the regulations  
of member states of the EuroBiobank project” [Consultado em 28.02.2014]  
Disponível em <http://www.eurobiobank.org>.

# ANEXOS

## Anexo I – Consentimento Informado



FORM

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

#### INFORMAÇÃO AO DADOR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

##### **Título do projecto de investigação**

*Biobanco* do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa - Banco de amostras biológicas Humanas para fins de investigação biomédica

##### **Objectivo do Estudo**

A criação de um banco de amostras biológicas humanas permitirá o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e investigação em múltiplas áreas da medicina, com especial impacto em doenças crónicas, como as doenças oncológicas, cardiovasculares, neurológicas, ósseas e imunológicas. Contudo, este objectivo só será cumprido com a colaboração dos doentes e de indivíduos saudáveis, através da doação de amostras biológicas que serão guardadas e preservadas em condições apropriadas de forma a serem utilizadas para futuros estudos. Caso o doente ou indivíduo saudável e/ou o seu representante legal decida participar, terá de fazer apenas os procedimentos habituais de uma consulta.

##### **Procedimentos**

No caso de concordar em participar neste projecto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica. A amostra habitualmente solicitada será aproveitada a partir da colheita de sangue e/ou urina que irá efetuar. Para os indivíduos que estejam a realizar exames diagnósticos ou que estejam a ser sujeitos a tratamentos cirúrgicos poderá ser pedida autorização para colheita de uma pequena amostra do material removido durante o procedimento (como por exemplo saliva, líquido cefalo-raquidiano, tecidos removidos para biópsias ou removidos no decurso de cirurgias). Estas colheitas serão efetuadas sem alterar os procedimentos médicos habituais e sem interferir com a rentabilidade diagnóstica do procedimento ou com o sucesso da cirurgia. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão introduzidas numa base de dados, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação e não podendo ser discriminado por isso. O dador ou o seu representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

O Biobanco do IMM propõe-se armazenar as amostras biológicas e seus possíveis derivados tais como, soro, plasma, DNA, RNA e células. No caso da colheita de sangue ou em qualquer outra circunstância de colheita para a qual seja necessário um acto médico invasivo será adoptada uma técnica de imortalização de células, evitando-se assim nova colheita de amostra.

O biobanco do IMM não divulgará resultados envolvendo o material biológico. No entanto, o dador poderá escolher se quer ser informado dos resultados com potencial relevância para a sua saúde. O pedido de resultados deverá ser feito por escrito para o Biobanco do IMM pelo dador ou representante legal e deve ser expresso no consentimento informado.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação. Todos os projetos que fizerem uso das amostras depositadas no Biobanco do IMM serão submetidos à Comissão de Ética competente para a sua avaliação.

##### **Identificação das amostras e Confidencialidade**

A existência de um biobanco pressupõe a existência de uma base de dados contendo informação clínica referente ao doente ou indivíduo saudável. Após a colheita, as amostras serão identificadas por um código de forma a preservar a privacidade.

Durante o desenvolvimento de um projecto de investigação, a equipa de investigação poderá ter necessidade de recolher informação do processo clínico para a execução do estudo. O anonimato será, contudo mantido, ou seja os dados constantes do seu processo clínico serão fornecidos ao investigador, mas sem qualquer identificação, ou qualquer informação que permita saber a quem pertencem.

A descodificação apenas poderá ser efectuada pelo médico (que será o responsável pela base de dados, de acordo com a informação fornecida à Comissão Nacional de Protecção de Dados - CNPD), em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador e a pedido deste, e sempre de acordo com as disposições legais em vigor.

Os dados serão tratados confidencialmente, de acordo com a Lei, com os regulamentos e de acordo com as normas éticas aprovadas pela Comissão de Ética do CHLN/FMUL e pela CNPD.

Os dados resultantes dos estudos realizados serão alvo de publicação de uma forma anónima e agregada, em termos de percentagens ou de dados numéricos, nunca individualmente.

##### **Tempo de conservação**

As amostras serão conservadas por um período de 20 anos no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, sob a responsabilidade da Equipa ligada ao projecto, enquanto este estiver devidamente credenciado pelas entidades competentes. As coleções de



## DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

---

amostras serão avaliadas periodicamente, nomeadamente para aferir da sua qualidade, podendo ser destruídas ou, findo o período da conservação, poder-se-á solicitar a prorrogação da conservação. Nestas condições excecionais o Biobanco do IMM poderá recontactar os dadores.

### Comunicação e divulgação de dados

Os dados genéticos e as amostras biológicas colhidas para fins de investigação científica podem ser transferidos para outras organizações ou centros de investigação, para fins de pesquisa e somente em projetos desenvolvidos conjuntamente com o IMM, mediante consentimento do participante expresso na declaração de consentimento informado.

### Possíveis Benefícios para os Participantes

Esta é uma doação altruísta, não havendo por isso qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios directos para o participante. Se algum dos estudos puder ser relevante para a saúde do dador, este será informado, se essa for a sua vontade expressa na declaração de consentimento informado. Contudo, a sua participação proporcionará a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro.

### Riscos físicos previsíveis

Na maioria dos casos, os riscos e o desconforto associados serão mínimos ou inexistentes. Nas colheitas associadas a procedimentos com fins diagnósticos ou terapêuticos, os riscos e o desconforto serão os inerentes ao procedimento em si. Em qualquer dos casos, o dador será sempre antecipadamente informado dos riscos e grau de desconforto associados aos procedimentos.

### Participação Voluntária e Direitos de Abandono

O presumível dador terá toda a liberdade para se recusar a participar no estudo ou retirar o seu consentimento, suspendendo a participação em qualquer momento e, conseqüentemente, as amostras serão destruídas. A participação é voluntária e a sua recusa em participar não envolverá qualquer penalização ou perda de benefícios. A recusa ou abandono não colocarão em risco o direito a receber tratamento ou assistência médica, presentemente ou no futuro.

O dador poderá retirar o seu consentimento nas modalidades **sem contacto futuro** (as amostras poderão ser usadas normalmente até se esgotarem, mas não serão estabelecidos futuros contactos para a obtenção de mais amostras) ou **sem uso futuro** (não serão estabelecidos futuros contactos e as amostras serão imediatamente destruídas e os registos eliminados).

**Se tiver qualquer dúvida, em qualquer momento, mesmo após a colheita, sobre este estudo poderá contactar o Director do Biobanco do IMM:**

Prof. Doutor João Eurico Fonseca, dirigindo-se a:  
Dr<sup>a</sup> Angela Maria Afonso  
Biobanco  
Instituto de Medicina Molecular  
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa  
Telefone: +351 217999437  
Ext: 47047/92903  
Email: [immbiobanco@fm.ul.pt](mailto:immbiobanco@fm.ul.pt)

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Banco de amostras biológicas para fins de investigação biomédica

Investigador: \_\_\_\_\_ Hospital: \_\_\_\_\_  
Nome do doente: \_\_\_\_\_  
Número de estudo do doente: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do bilhete de identidade/cartão do cidadão n.º [ \_\_\_\_\_ ], declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projecto, de forma a contribuir para a criação de um banco de amostras biológicas com informação clínica associada, para fins de investigação biomédica.

Aceito que a minha amostra biológica seja utilizada em projectos de investigação de mecanismos das doenças, diagnóstico precoce, fatores de prognóstico e novos alvos terapêuticos em múltiplas áreas da medicina, nomeadamente nas doenças oncológicas, cardiovasculares, neurológicas, ósseas e imunológicas. Poderei revogar a autorização para utilização da minha amostra biológica e informação clínica em qualquer altura. O objectivo do banco de amostras biológicas foi-me claramente explicado e foi-me dada a oportunidade de colocar questões sobre o seu funcionamento, bem como os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo. Especificamente concordo com os seguintes pontos:

- Consinto a colheita de material biológico (sangue / ..... / ..... ) e autorizo a conservação de amostras no Biobanco, de modo a que possam ser usados para pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos e cultura de linhas celulares por investigadores portugueses e estrangeiros, sem fins lucrativos;

Sim  Não

- **Esta opção é para ser respondida apenas por participantes que já cederam amostras biológicas colhidas no âmbito de outros projetos.** Nestas circunstâncias, autorizo a transferência para o Biobanco as minhas amostras biológicas, previamente colhidas no âmbito de outros projectos, de modo que elas possam ser utilizadas em pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos e cultura de linhas celulares por investigadores portugueses e estrangeiros, mas sem fins lucrativos;

Sim  Não

- Estou consciente de que minha participação é voluntária e que posso em qualquer altura solicitar a destruição das minhas amostras biológicas, invalidando assim o consentimento informado prévio, sem justificar, tendo recebido a garantia de que o meu pedido não desenvolverá discriminação;

Sim  Não

- Declaro que quero conhecer resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.

Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

---

- Autorizo ser contactado novamente pelo Biobanco do IMM para pedido de atualização sobre a minha situação clínica;

Sim  Não

- Autorizo o contactado do Biobanco do IMM a familiares meus para pedido autorização de colheita de amostras biológicas e/ou informação clínica;

Sim  Não

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Assinatura do Doente/Representante Legal

Em caso de representante legal, este actua na qualidade de:

- Titular do poder paternal, quando o dador é menor
- Tutor, quando o dador foi declarado interdito
- Herdeiro, quando o dador faleceu

Discuti este estudo de investigação com o participante e/ou o seu representante legal, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente o participante sobre a natureza deste estudo e sobre os seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Nome do Médico

\_\_\_\_\_

Assinatura do Médico

Foi entregue um duplicado deste documento ao doente/representante legal.

**Anexo II** – Decreto-Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro de 2005 - Informação genética pessoal e informação de saúde. *Diário da República* – I série A, nº18.

606

DIÁRIO DA REPÚBLICA — I SÉRIE-A

N.º 18 — 26 de Janeiro de 2005

**Lei n.º 8/2005**

de 26 de Janeiro

**Elevação de Sabugal à categoria de cidade**

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, a lei seguinte:

Artigo único

A vila de Sabugal, no município de Sabugal, é elevada à categoria de cidade.

Aprovada em 9 de Dezembro de 2004.

O Presidente da Assembleia da República, *João Bosco Mota Amaral*.

Promulgada em 7 de Janeiro de 2005.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendada em 13 de Janeiro de 2005.

O Primeiro-Ministro, *Pedro Miguel de Santana Lopes*.

**Lei n.º 9/2005**

de 26 de Janeiro

**Elevação de Valbom à categoria de cidade**

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, a lei seguinte:

Artigo único

A vila de Valbom, no município de Gondomar, é elevada à categoria de cidade.

Aprovada em 9 de Dezembro de 2004.

O Presidente da Assembleia da República, *João Bosco Mota Amaral*.

Promulgada em 7 de Janeiro de 2005.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendada em 13 de Janeiro de 2005.

O Primeiro-Ministro, *Pedro Miguel de Santana Lopes*.

**Lei n.º 10/2005**

de 26 de Janeiro

**Elevação de Costa da Caparica à categoria de cidade**

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, a lei seguinte:

Artigo único

A vila de Costa da Caparica, no município de Almada, é elevada à categoria de cidade.

Aprovada em 9 de Dezembro de 2004.

O Presidente da Assembleia da República, *João Bosco Mota Amaral*.

Promulgada em 7 de Janeiro de 2005.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendada em 13 de Janeiro de 2005.

O Primeiro-Ministro, *Pedro Miguel de Santana Lopes*.

**Lei n.º 11/2005**

de 26 de Janeiro

**Elevação de Tarouca à categoria de cidade**

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, a lei seguinte:

Artigo único

A vila de Tarouca, no município de Tarouca, é elevada à categoria de cidade.

Aprovada em 9 de Dezembro de 2004.

O Presidente da Assembleia da República, *João Bosco Mota Amaral*.

Promulgada em 7 de Janeiro de 2005.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendada em 13 de Janeiro de 2005.

O Primeiro-Ministro, *Pedro Miguel de Santana Lopes*.

**Lei n.º 12/2005**

de 26 de Janeiro

**Informação genética pessoal e informação de saúde**

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, a lei seguinte:

Artigo 1.º

Objecto

A presente lei define o conceito de informação de saúde e de informação genética, a circulação de informação e a intervenção sobre o genoma humano no sistema de saúde, bem como as regras para a colheita e conservação de produtos biológicos para efeitos de testes genéticos ou de investigação.

Artigo 2.º

Informação de saúde

Para os efeitos desta lei, a informação de saúde abrange todo o tipo de informação directa ou indirecta



tamente ligada à saúde, presente ou futura, de uma pessoa, quer se encontre com vida ou tenha falecido, e a sua história clínica e familiar.

### Artigo 3.º

#### Propriedade da informação de saúde

1 — A informação de saúde, incluindo os dados clínicos registados, resultados de análises e outros exames subsidiários, intervenções e diagnósticos, é propriedade da pessoa, sendo as unidades do sistema de saúde os depositários da informação, a qual não pode ser utilizada para outros fins que não os da prestação de cuidados e a investigação em saúde e outros estabelecidos pela lei.

2 — O titular da informação de saúde tem o direito de, querendo, tomar conhecimento de todo o processo clínico que lhe diga respeito, salvo circunstâncias excepcionais devidamente justificadas e em que seja inequivocamente demonstrado que isso lhe possa ser prejudicial, ou de o fazer comunicar a quem seja por si indicado.

3 — O acesso à informação de saúde por parte do seu titular, ou de terceiros com o seu consentimento, é feito através de médico, com habilitação própria, escolhido pelo titular da informação.

### Artigo 4.º

#### Tratamento da informação de saúde

1 — Os responsáveis pelo tratamento da informação de saúde de vem tomar as providências adequadas à protecção da sua confidencialidade, garantindo a segurança das instalações e equipamentos, o controlo no acesso à informação, bem como o reforço do dever de sigilo e da educação deontológica de todos os profissionais.

2 — As unidades do sistema de saúde devem impedir o acesso indevido de terceiros aos processos clínicos e aos sistemas informáticos que contenham informação de saúde, incluindo as respectivas cópias de segurança, assegurando os níveis de segurança apropriados e cumprindo as exigências estabelecidas pela legislação que regula a protecção de dados pessoais, nomeadamente para evitar a sua destruição, accidental ou ilícita, a alteração, difusão ou acesso não autorizado ou qualquer outra forma de tratamento ilícito da informação.

3 — A informação de saúde só pode ser utilizada pelo sistema de saúde nas condições expressas em autorização escrita do seu titular ou de quem o represente.

4 — O acesso a informação de saúde pode, desde que anonimizada, ser facultado para fins de investigação.

5 — A gestão dos sistemas que organizam a informação de saúde deve garantir a separação entre a informação de saúde e genética e a restante informação pessoal, designadamente através da definição de diversos níveis de acesso.

6 — A gestão dos sistemas de informação deve garantir o processamento regular e frequente de cópias de segurança da informação de saúde, salvaguardadas as garantias de confidencialidade estabelecidas por lei.

### Artigo 5.º

#### Informação médica

1 — Para os efeitos desta lei, a informação médica é a informação de saúde destinada a ser utilizada em prestações de cuidados ou tratamentos de saúde.

2 — Entende-se por «processo clínico» qualquer registo, informatizado ou não, que conte informação de saúde sobre doentes ou seus familiares.

3 — Cada processo clínico deve conter toda a informação médica disponível que diga respeito à pessoa, ressalvada a restrição imposta pelo artigo seguinte.

4 — A informação médica é inscrita no processo clínico pelo médico que tenha assistido a pessoa ou, sob a supervisão daquele, informatizada por outro profissional igualmente sujeito ao dever de sigilo, no âmbito das competências específicas de cada profissão e dentro do respeito pelas respectivas normas deontológicas.

5 — O processo clínico só pode ser consultado por médico incumbido da realização de prestações de saúde a favor da pessoa a que respeita ou, sob a supervisão daquele, por outro profissional de saúde obrigado a sigilo e na medida do estritamente necessário à realização das mesmas, sem prejuízo da investigação epidemiológica, clínica ou genética que possa ser feita sobre os mesmos, ressalvando-se o que fica definido no artigo 16.º

### Artigo 6.º

#### Informação genética

1 — A informação genética é a informação de saúde que verse as características hereditárias de uma ou de várias pessoas, aparentadas entre si ou com características comuns daquele tipo, excluindo-se desta definição a informação derivada de testes de parentesco ou estudos de zigotia em gémeos, dos estudos de identificação genética para fins criminais, bem como do estudo das mutações genéticas somáticas no cancro.

2 — A informação genética pode ser resultado da realização de testes genéticos por meios de biologia molecular, mas também de testes citogenéticos, bioquímicos, fisiológicos ou imagiológicos, ou da simples recolha de informação familiar, registada sob a forma de uma árvore familiar ou outra, cada um dos quais pode, por si só, enunciar o estatuto genético de uma pessoa e seus familiares.

3 — A informação genética reveste natureza médica apenas quando se destina a ser utilizada nas prestações de cuidados ou tratamentos de saúde, no contexto da confirmação ou exclusão de um diagnóstico clínico, no contexto de diagnóstico pré-natal ou diagnóstico pré-implantatório ou no da farmacogenética, excluindo-se, pois, a informação de testes preditivos para predisposições a doenças comuns e pré-sintomáticos para doenças monogénicas.

4 — A informação genética que não tenha implicações imediatas para o estado de saúde actual, tal como a resultante de testes de paternidade, de estudos de zigotia em gémeos, e a de testes preditivos — com a excepção de testes genéticos para resposta a medicamentos —, de heterozigotia, pré-sintomáticos, pré-natais ou pré-implantatórios não pode ser incluída no processo clínico, salvo no caso de consultas ou serviços de genética médica com arquivos próprios e separados.

5 — Os processos clínicos de consultas ou serviços de genética médica não podem ser acedidos, facultados ou consultados por médicos, outros profissionais de saúde ou funcionários de outros serviços da mesma instituição ou outras instituições do sistema de saúde no caso de conterem informação genética sobre pessoas saudáveis.

6 — A informação genética deve ser objecto de medidas legislativas e administrativas de protecção reforçada em termos de acesso, segurança e confidencialidade.



7 — A utilização de informação genética é um acto entre o seu titular e o médico, que é sujeito às regras deontológicas de sigilo profissional dos médicos e dos restantes profissionais de saúde.

8 — A existência de vínculo laboral ou outro entre o médico ou outro profissional de saúde e qualquer actividade, incluindo companhias de seguros, entidades profissionais ou fornecedores de quaisquer bens ou serviços, não justifica qualquer diminuição aos deveres de segredo que sobre aqueles impendem.

9 — Os cidadãos têm o direito de saber se um processo clínico, ficheiro ou registo médico ou de investigação contém informação genética sobre eles próprios e a sua família e de conhecer as finalidades e usos dessa informação, a forma como é armazenada e os prazos da sua conservação.

#### Artigo 7.º

##### Bases de dados genéticos

1 — Entende-se por «base de dados genéticos» qualquer registo, informatizado ou não, que contenha informação genética sobre um conjunto de pessoas ou famílias.

2 — As regras de criação, manutenção, gestão e segurança das bases de dados genéticos para prestação de cuidados de saúde e relativas à investigação em saúde são regulamentadas nos termos da legislação que regula a protecção de dados pessoais.

3 — As bases de dados genéticos que contenham informação familiar e os registos genéticos que permitam a identificação de familiares devem ser mantidas e supervisionadas por um médico com especialidade em genética ou, na sua falta, por outro médico.

4 — Qualquer pessoa pode pedir e ter acesso à informação sobre si própria contida em ficheiros com dados pessoais, nos termos da lei.

#### Artigo 8.º

##### Terapia génica

1 — A intervenção médica que tenha como objecto modificar intencionalmente o genoma humano só pode ser levada a cabo, verificadas as condições estabelecidas nesta lei, por razões preventivas ou terapêuticas.

2 — É proibida qualquer intervenção médica que tenha por objectivo a manipulação genética de características consideradas normais, bem como a alteração da linha germinativa de uma pessoa.

#### Artigo 9.º

##### Testes genéticos

1 — A realização de testes genéticos diagnósticos ou de farmacogenética obedece aos princípios que regem a prestação de qualquer cuidado de saúde.

2 — A detecção do estado de heterozigotia para doenças recessivas, o diagnóstico pré-sintomático de doenças monogénicas e os testes de susceptibilidades genéticas em pessoas saudáveis só podem ser executados com autorização do próprio, a pedido de um médico com a especialidade de genética e na sequência da realização de consulta de aconselhamento genético, após consentimento informado, expresso por escrito.

3 — A comunicação dos resultados de testes genéticos deve ser feita exclusivamente ao próprio, ou, no caso de testes diagnósticos, a quem legalmente o represente

ou seja indicado pelo próprio, e em consulta médica apropriada.

4 — No caso de testes de estado de heterozigotia, pré-sintomáticos e preditivos, os resultados devem ser comunicados ao próprio e não podem nunca ser comunicados a terceiros sem a sua autorização expressa por escrito, incluindo a médicos ou outros profissionais de saúde de outros serviços ou instituições ou da mesma consulta ou serviço mas não envolvidos no processo de teste dessa pessoa ou da sua família.

5 — No caso de testes pré-natais e pré-implantatórios, os resultados devem ser comunicados exclusivamente à progenitora, aos progenitores ou aos respectivos representantes legais.

6 — Não devem ser realizados testes pré-sintomáticos, preditivos ou pré-implantatórios em pessoas com incapacidade mental que possam não compreender as implicações deste tipo de testes e dar o seu consentimento.

7 — Em situações de risco para doenças de início na vida adulta e sem cura nem tratamento comprovadamente eficaz, a realização do teste pré-sintomático ou preditivo tem ainda como condição uma avaliação psicológica e social prévia e o seu seguimento após a entrega dos resultados do teste.

8 — A frequência das consultas de aconselhamento genético e a forma do seguimento psicológico e social são determinadas considerando a gravidade da doença, a idade mais habitual de manifestação dos primeiros sintomas e a existência ou não de tratamento comprovado.

#### Artigo 10.º

##### Testes de heterozigotia, pré-sintomáticos, preditivos e pré-natais

1 — Para efeitos do artigo anterior, consideram-se testes para detecção do estado de heterozigotia os que permitam a detecção de pessoas saudáveis portadoras heterozigóticas para doenças recessivas.

2 — Consideram-se testes pré-sintomáticos os que permitam a identificação da pessoa como portadora, ainda assintomática, do genótipo inequivocamente responsável por uma dada doença monogénica.

3 — Consideram-se testes genéticos preditivos os que permitam a detecção de genes de susceptibilidade, entendida como uma predisposição genética para uma dada doença com hereditariedade complexa e com início habitualmente na vida adulta.

4 — Consideram-se testes de farmacogenética os testes preditivos que permitem a detecção de predisposições para respostas diferenciais no tratamento com um dado medicamento ou a susceptibilidade para reacções adversas derivadas da toxicidade da droga.

5 — Consideram-se testes pré-natais todos aqueles executados antes ou durante uma gravidez, com a finalidade de obtenção de informação genética sobre o embrião ou o feto, considerando-se assim como caso particular destes o diagnóstico pré-implantatório.

6 — Consideram-se testes de rastreio todos os testes diagnósticos, de heterozigotia, pré-sintomáticos, preditivos ou pré-natais que são aplicados a toda a população ou grupos populacionais de risco aumentado, nomeadamente por género, idade, origem étnica, em qualquer altura da vida.

#### Artigo 11.º

##### Princípio da não discriminação

1 — Ninguém pode ser prejudicado, sob qualquer forma, em função da presença de doença genética ou em função do seu património genético.



2 — Ninguém pode ser discriminado, sob qualquer forma, em função dos resultados de um teste genético diagnóstico, de heterozigotia, pré-sintomático ou preditivo, incluindo para efeitos de obtenção ou manutenção de emprego, obtenção de seguros de vida e de saúde, acesso ao ensino e, para efeitos de adopção, no que respeita quer aos adoptantes quer aos adoptandos.

3 — Ninguém pode ser discriminado, sob qualquer forma, nomeadamente no seu direito a seguimento médico e psicossocial e a aconselhamento genético, por se recusar a efectuar um teste genético.

4 — É garantido a todos o acesso equitativo ao aconselhamento genético e aos testes genéticos, salvaguardando-se devidamente as necessidades das populações mais fortemente atingidas por uma dada doença ou doenças genéticas.

#### Artigo 12.º

##### Testes genéticos e seguros

1 — As companhias de seguros não podem pedir nem utilizar qualquer tipo de informação genética para recusar um seguro de vida ou estabelecer prémios mais elevados.

2 — As companhias de seguros não podem pedir a realização de testes genéticos aos seus potenciais segurados para efeitos de seguros de vida ou de saúde ou para outros efeitos.

3 — As companhias de seguros não podem utilizar a informação genética obtida de testes genéticos previamente realizados nos seus clientes actuais ou potenciais para efeitos de seguros de vida e de saúde ou para outros efeitos.

4 — As seguradoras não podem exigir nem podem utilizar a informação genética resultante da colheita e registo dos antecedentes familiares para recusar um seguro ou estabelecer prémios aumentados ou para outros efeitos.

#### Artigo 13.º

##### Testes genéticos no emprego

1 — A contratação de novos trabalhadores não pode depender de selecção assente no pedido, realização ou resultados prévios de testes genéticos.

2 — Às empresas e outras entidades patronais não é permitido exigir aos seus trabalhadores, mesmo que com o seu consentimento, a realização de testes genéticos ou a divulgação de resultados previamente obtidos.

3 — Nos casos em que o ambiente de trabalho possa colocar riscos específicos para um trabalhador com uma dada doença ou susceptibilidade, ou afectar a sua capacidade de desempenhar com segurança uma dada tarefa, pode ser usada a informação genética relevante para benefício do trabalhador e nunca em seu prejuízo, desde que tenha em vista a protecção da saúde da pessoa, a sua segurança e a dos restantes trabalhadores, que o teste genético seja efectuado após consentimento informado e no seguimento do aconselhamento genético apropriado, que os resultados sejam entregues exclusivamente ao próprio e ainda desde que não seja nunca posta em causa a sua situação laboral.

4 — As situações particulares que impliquem riscos graves para a segurança ou a saúde pública podem constituir uma excepção ao anteriormente estipulado, observando-se no entanto a restrição imposta no número seguinte.

5 — Nas situações previstas nos números anteriores os testes genéticos, dirigidos apenas a riscos muito graves

e se relevantes para a saúde actual do trabalhador, devem ser seleccionados, oferecidos e supervisionados por uma agência ou entidade independente e não pelo empregador.

6 — Os encargos da realização de testes genéticos a pedido ou por interesse directo de entidades patronais são por estas suportados.

#### Artigo 14.º

##### Testes genéticos e adopção

1 — Não podem ser pedidos testes genéticos, nem usada informação genética já disponível, para efeitos de adopção.

2 — Os serviços de adopção ou os pais prospectivos não podem pedir testes genéticos ou usar informação de testes anteriores nas crianças adoptandas.

3 — Os serviços de adopção não podem exigir aos pais adoptantes a realização de testes genéticos, nem usar informação já disponível sobre os mesmos.

#### Artigo 15.º

##### Laboratórios que procedem ou que oferecem testes genéticos

1 — Compete ao Governo regulamentar as condições da oferta e da realização de testes genéticos do estado de heterozigotia, pré-sintomáticos, preditivos ou pré-natais e pré-implantatórios, de modo a evitar, nomeadamente, a sua realização por laboratórios, nacionais ou estrangeiros, sem apoio de equipa médica e multidisciplinar necessária, assim como a eventual venda livre dos mesmos.

2 — Nos termos da lei e das recomendações éticas, de qualidade e de segurança dos organismos reguladores nacionais e internacionais, o Governo determina medidas de acreditação e de certificação dos laboratórios públicos ou privados que realizem testes genéticos e procede ao seu licenciamento.

#### Artigo 16.º

##### Investigação sobre o genoma humano

1 — A investigação sobre o genoma humano segue as regras gerais da investigação científica no campo da saúde, estando obrigada a confidencialidade reforçada sobre a identidade e as características das pessoas individualmente estudadas.

2 — Deve ser garantido o livre acesso da comunidade científica aos dados emergentes da investigação sobre o genoma humano.

3 — A investigação sobre o genoma humano está sujeita à aprovação pelos *comités* de ética da instituição hospitalar, universitária ou de investigação.

4 — A investigação sobre o genoma humano em pessoas não pode ser realizada sem o consentimento informado dessas pessoas, expresso por escrito, após a explicação dos seus direitos, da natureza e finalidades da investigação, dos procedimentos utilizados e dos riscos potenciais envolvidos para si próprios e para terceiros.

#### Artigo 17.º

##### Dever de protecção

1 — É ilícita a criação de qualquer lista de doenças ou características genéticas que possa fundamentar pedidos de testes de diagnóstico, de heterozigotia, pré-sin-



tomáticos, preditivos ou pré-natais ou de qualquer tipo de rastreio genético.

2 — Todo o cidadão tem direito a recusar-se a efectuar um teste genético do estado de heterozigotia, pré-sintomático, preditivo ou pré-natal.

3 — Todo o cidadão tem direito a receber aconselhamento genético e, se indicado, acompanhamento psicossocial, antes e depois da realização de testes de heterozigotia, pré-sintomáticos, preditivos e pré-natais.

4 — Só podem ser pedidos testes genéticos a menores desde que sejam efectuados em seu benefício e nunca em seu prejuízo, com o consentimento informado dos seus pais ou tutores, mas procurando-se sempre o seu próprio consentimento.

5 — Nomeadamente, não podem ser pedidos testes preditivos em menores para doenças de início habitual na vida adulta, sem prevenção ou cura comprovadamente eficaz.

6 — Do mesmo modo, o diagnóstico pré-natal para doenças de início habitual na vida adulta e sem cura não pode ser efectuado para mera informação dos pais, mas apenas para prevenção da doença ou deficiência, dentro dos prazos previstos na lei.

7 — Os médicos têm o dever de informar as pessoas que os consultam sobre os mecanismos de transmissão e os riscos que estes implicam para os seus familiares e de os orientar para uma consulta de genética médica, a qual deve ser assegurada nos termos da legislação regulamentar da presente lei.

8 — No caso dos testes de rastreio genético, deve sempre proteger-se, além dos direitos individuais, os direitos das populações ou grupos populacionais a rastrear, evitando-se a sua estigmatização.

9 — Os cidadãos com necessidades especiais, bem como os que são portadores de deficiências ou doenças crónicas, incluindo os doentes com patologias genéticas e seus familiares, gozam do direito à protecção do Estado em matéria de informação sobre os cuidados de saúde de que necessitam.

#### Artigo 18.º

##### Obtenção e conservação de material biológico

1 — A colheita de sangue e outros produtos biológicos e a obtenção de amostras de DNA para testes genéticos devem ser objecto de consentimento informado separado para efeitos de testes assistenciais e para fins de investigação em que conste a finalidade da colheita e o tempo de conservação das amostras e produtos deles derivados.

2 — O material armazenado é propriedade das pessoas em quem foi obtido e, depois da sua morte ou incapacidade, dos seus familiares.

3 — O consentimento pode ser retirado a qualquer altura pela pessoa a quem o material biológico pertence ou, depois da sua morte ou incapacidade, pelos seus familiares, devendo nesse caso as amostras biológicas e derivados armazenados ser definitivamente destruídos.

4 — Não devem ser utilizadas para efeitos assistenciais ou de investigação amostras biológicas cuja obtenção se destinou a uma finalidade diferente, a não ser com nova autorização por parte da pessoa a quem pertence ou, depois da sua morte ou incapacidade, dos seus familiares, ou após a sua anonimização irreversível.

5 — Amostras colhidas para um propósito médico ou científico específico só podem ser utilizadas com a auto-

rização expressa das pessoas envolvidas ou seus representantes legais.

6 — Em circunstâncias especiais, em que a informação possa ter relevância para o tratamento ou a prevenção da recorrência de uma doença na família, essa informação pode ser processada e utilizada no contexto de aconselhamento genético, mesmo que já não seja possível obter o consentimento informado da pessoa a quem pertence.

7 — Todos os parentes em linha directa e do segundo grau da linha colateral podem ter acesso a uma amostra armazenada, desde que necessário para conhecer melhor o seu próprio estatuto genético, mas não para conhecer o estatuto da pessoa a quem a amostra pertence ou de outros familiares.

8 — É proibida a utilização comercial, o patenteamento ou qualquer ganho financeiro de amostras biológicas enquanto tais.

#### Artigo 19.º

##### Bancos de DNA e de outros produtos biológicos

1 — Para efeitos desta lei, entende-se por «banco de produtos biológicos» qualquer repositório de amostras biológicas ou seus derivados, com ou sem tempo delimitado de armazenamento, quer utilize colheita prospectiva ou material previamente colhido, quer tenha sido obtido como componente da prestação de cuidados de saúde de rotina, quer em programas de rastreio, quer para investigação, e que inclua amostras que sejam identificadas, identificáveis, anonimizadas ou anónimas.

2 — Ninguém pode colher ou usar amostras biológicas humanas já colhidas ou seus derivados, com vista à constituição de um banco de produtos biológicos, se não tiver obtido autorização prévia de entidade credenciada pelo departamento responsável pela tutela da saúde, assim como da Comissão Nacional de Protecção de Dados se o banco estiver associado a informação pessoal.

3 — Os bancos de produtos biológicos devem ser constituídos apenas com a finalidade da prestação de cuidados de saúde, incluindo o diagnóstico e a prevenção de doenças, ou de investigação básica ou aplicada à saúde.

4 — Um banco de produtos biológicos só deve aceitar amostras em resposta a pedidos de médicos e não das próprias pessoas ou seus familiares.

5 — O consentimento informado escrito é necessário para a obtenção e utilização de material para um banco de produtos biológicos, devendo o termo de consentimento incluir informação sobre as finalidades do banco, o seu responsável, os tipos de investigação a desenvolver, os seus riscos e benefícios potenciais, as condições e a duração do armazenamento, as medidas tomadas para garantir a privacidade e a confidencialidade das pessoas participantes e a previsão quanto à possibilidade de comunicação ou não de resultados obtidos com esse material.

6 — No caso de uso retrospectivo de amostras ou em situações especiais em que o consentimento das pessoas envolvidas não possa ser obtido devido à quantidade de dados ou de sujeitos, à sua idade ou outra razão comparável, o material e os dados podem ser processados, mas apenas para fins de investigação científica ou obtenção de dados epidemiológicos ou estatísticos.

7 — A conservação de amostras de sangue seco em papel obtidas em rastreios neonatais ou outros deve



ser considerada à luz dos potenciais benefícios e perigos para os indivíduos e a sociedade, podendo, no entanto, essas coleções ser utilizadas para estudos familiares no contexto do aconselhamento genético ou então para investigação genética, desde que previamente anonimizadas de forma irreversível.

8 — Deve ser sempre garantida a privacidade e a confidencialidade, evitando-se o armazenamento de material identificado, controlando-se o acesso às coleções de material biológico, limitando-se o número de pessoas autorizadas a fazê-lo e garantindo-se a sua segurança quanto a perdas, alteração ou destruição.

9 — Só podem ser usadas amostras anónimas ou irreversivelmente anonimizadas, devendo as amostras identificadas ou identificáveis ficar limitadas a estudos que não possam ser feitos de outro modo.

10 — Não é permitido o armazenamento de material biológico humano não anonimizado por parte de entidades com fins comerciais.

11 — Havendo absoluta necessidade de se usarem amostras identificadas ou identificáveis, estas devem ser codificadas, ficando os códigos armazenados separadamente, mas sempre em instituições públicas.

12 — Se o banco envolver amostras identificadas ou identificáveis e estiver prevista a possibilidade de comunicação de resultados dos estudos efectuados, deve ser envolvido nesse processo um médico especialista em genética.

13 — O material biológico armazenado é considerado propriedade da pessoa de quem foi obtido ou, depois da sua morte ou incapacidade, dos seus familiares, devendo ser armazenado enquanto for de comprovada utilidade para os familiares actuais e futuros.

14 — Os investigadores responsáveis por estudos em amostras armazenadas em bancos de produtos biológicos devem sempre verificar que os direitos e os interesses das pessoas a quem o material biológico pertence são devidamente protegidos, incluindo a sua privacidade e confidencialidade, mas também no que respeita à preservação das amostras, que podem mais tarde vir a ser necessárias para diagnóstico de doença familiar, no contexto de testes genéticos nessas pessoas ou seus familiares.

15 — Compete aos investigadores responsáveis pela coleção e manutenção de bancos de produtos biológicos zelar pela sua conservação e integridade e informar as pessoas de quem foi obtido consentimento de qualquer perda, alteração ou destruição, assim como da sua decisão de abandonar um tipo de investigação ou de fechar o banco.

16 — A lei define as regras para o licenciamento e a promoção de processos de garantia de qualidade dos bancos de produtos biológicos.

17 — A transferência de um grande número de amostras ou coleções de material biológico para outras entidades nacionais ou estrangeiras deve sempre respeitar o propósito da criação do banco para o qual foi obtido o consentimento e ser aprovada pelas comissões de ética responsáveis.

18 — A constituição de bancos de dados que descrevam uma determinada população e a eventual transferência dos seus dados devem ser aprovadas pelo Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida e, no caso de serem representativos da população nacional, pela Assembleia da República.

19 — Os bancos de produtos biológicos constituídos para fins forenses de identificação criminal ou outros devem ser objecto de regulamentação específica.

#### Artigo 20.º

##### Património genético humano

O património genético humano não é susceptível de qualquer patenteamento.

#### Artigo 21.º

##### Relatório sobre a aplicação da lei

O Governo, ouvido o Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida, apresenta à Assembleia da República, no prazo de dois anos após a entrada em vigor desta lei, e a cada dois anos subsequentes, um relatório que inventarie as condições e as consequências da sua aplicação, considerando a evolução da discussão pública acerca dos seus fundamentos éticos e os progressos científicos entretanto obtidos.

#### Artigo 22.º

##### Regulamentação

1 — Compete ao Governo a regulamentação desta lei no prazo de 180 dias.

2 — É objecto de regulamentação própria a definição de medidas de promoção da investigação e de protecção da identidade genética pessoal, de validação clínica e analítica dos testes genéticos, particularmente dos testes preditivos para genes de susceptibilidade e da resposta a tratamentos medicamentosos, bem como dos testes de rastreio genético.

Aprovada em 9 de Dezembro de 2004.

O Presidente da Assembleia da República, *João Bosco Mota Amaral*.

Promulgada em 7 de Janeiro de 2005.

Publique-se.

O Presidente da República, **JORGE SAMPAIO**.

Referendada em 13 de Janeiro de 2005.

O Primeiro-Ministro, *Pedro Miguel de Santana Lopes*.

#### Lei n.º 13/2005

de 26 de Janeiro

Primeira alteração ao Decreto-Lei n.º 108/2004, de 11 de Maio (altera o Decreto-Lei n.º 83/2000, de 11 de Maio, que aprova o regime legal da concessão e emissão de passaportes).

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, a lei seguinte:

#### Artigo único

Os artigos 30.º e 31.º do Decreto-Lei n.º 108/2004, de 11 de Maio (altera o Decreto-Lei n.º 83/2000, de 11 de Maio, que aprova o regime legal da concessão e emissão de passaportes), passam a ter a seguinte redacção:

#### «Artigo 30.º

[...]

1 — .....

### **Anexo III** - Composição de Tris/Bortao/EDTA (TBE)

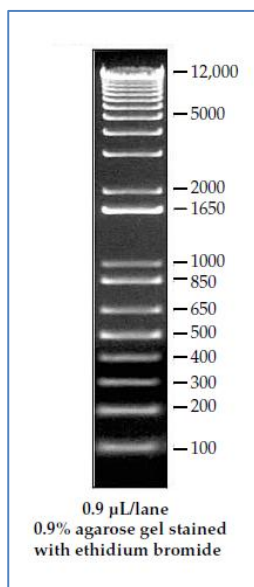
TBE concentrado a 10x:

0,89M Tris

0,89M Ácido Bórico

0,020M EDTA

### **Anexo IV** - Marcador de peso Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA)



**Anexo V – Marcador de peso Molecular O'GeneRuler 100bp DNA Ladder**  
 (Invitrogen, EUA)

