

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ARTHUR ESTIVALET SVIDZINSKI

ESTUDO DE PERFIS GENÉTICOS OBTIDOS A PARTIR DE
AMOSTRAS DE DNA PRODUZIDAS POR CONTATO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: **Silviene Fabiana de Oliveira**

Brasília, outubro de 2014

ARTHUR ESTIVALET SVIDZINSKI

ESTUDO DE PERFIS GENÉTICOS OBTIDOS A PARTIR DE
AMOSTRAS DE DNA PRODUZIDAS POR CONTATO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 20 de outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Silviene Fabiana de Oliveira
Universidade de Brasília

Neide Maria de Oliveira Godinho
Secretaria de Segurança Pública do Estado de Goiás

Celso Teixeira Mendes Junior
Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho à minha família, uma longa caminhada sempre começa pelo primeiro passo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, Silviene Fabiana de Oliveira, por ter acreditado desde o início que tudo daria certo, por todo o conhecimento e aprendizado proporcionado, e pela paciência durante o período que convivemos juntos.

Agradeço também a todos os componentes da banca, por participarem deste trabalho e proporcionarem valiosas contribuições, que com certeza enriqueceram este trabalho e ajudarão em outros futuros.

Gostaria de agradecer a todos os amigos da UNB por terem ajudado com tantas coisas sem as quais com certeza não teria chegado até aqui. Mas acima de tudo gostaria de agradecer por todas as experiências compartilhadas nos últimos anos, por todos os momentos vividos juntos, por terem feito parte da minha vida e feito tudo valer a pena.

Agradeço também aos amigos do trabalho, por todo o apoio durante este período, e por todo o conhecimento e experiência proporcionados que permitiram me tornar o profissional que sou.

A minha família faço um agradecimento especial, por todos os motivos descritos até agora e muito mais. Por terem me tornado a pessoa que sou. Por serem os exemplos da pessoa serei. E por tudo o que não tem como ser escrito, que apenas pode ser sentido.

Agradeço, enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

“Returning home is the most difficult part of a long journey; You have grown outside the puzzle and your piece no longer fits.”

(Cindy Ross)

RESUMO

Genotipagem obtidas da análise da sequência de DNA pelas mais diversas metodologias, os perfis de DNA, tem sido utilizadas frequentemente como ferramentas de investigação criminal e produção de provas periciais. Esses perfis tem sido cada vez mais solicitados as pericias, mesmo em situações onde a quantidade de DNA presentes nas amostras é muito pequena. Este é o caso de amostras produzidas por contato, o *touch* DNA, onde objetos manipulados ou que entraram em contato com a pele humana apresentam pequenas quantidades de células depositadas em sua superfície, que podem ser alvos de pesquisa de material genético. Neste tipo de amostra, uma grande dificuldade é identificar as melhores regiões para coleta, uma vez que o material depositado por contato não é visualmente destacado. A pesquisa de impressões digitais utiliza pós reveladores com a finalidade de revelar impressões digitais latentes, ou seja, possibilitam identificar as áreas de um objeto que entraram em contato com a pele humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de pós reveladores como ferramentas de triagem para coleta de material biológico deixado por contato com a finalidade de obtenção de perfis genéticos. Em primeiro lugar foi avaliada a quantidade de pó aderido a impressões deixadas por diferentes partes das mãos e a correlação entre a quantidade de pó aderido e a quantidade de DNA recuperado em uma amostra produzida por contato. A seguir foi avaliada a influência do pó revelador nos procedimentos laboratoriais envolvidos em uma análise de DNA. Para tanto, foi observado o efeito inibidor dos pós reveladores sobre a reação de PCR, a capacidade de diferentes métodos de extração em diminuir essa inibição e o resultado de um procedimento de purificação sobre o efeito inibitório. Finalmente, foi feita a pesquisa de DNA em cinco objetos relacionados a ocorrências criminais: arma de fogo, cartucho de munição, faca de cozinha, volante de veículo e alavanca de câmbio. Os resultados mostraram que a quantidade de pó aderido variou conforme a região da mão que produziu a impressão e que foi diretamente relacionada com a quantidade de DNA presente na amostra. O pó revelador apresentou um importante efeito inibidor sobre a reação de PCR. Os métodos de extração de DNA diminuem o efeito inibitório, porém este continua relevante. O procedimento de purificação não eliminou totalmente o efeito inibitório, porém o reduz a uma intensidade em que não comprometeu totalmente a obtenção de perfis genéticos. Nos cinco objetos testados foi possível coletar DNA em grande quantidade no volante de veículo e em quantidades razoáveis na arma de fogo, alavanca de câmbio e faca de cozinha. O cartucho de munição apresentou uma quantidade de DNA recuperada muito baixa, insuficiente para a produção de perfis genéticos

de qualidade. Portanto, podemos concluir que pós reveladores podem ser utilizados como ferramentas para a eleição das regiões de coleta de material biológico produzido por contato. Mesmo considerando o seu efeito inibitório sobre a reação de PCR, amostras coletadas juntamente com pós reveladores são capazes de produzir perfis genéticos com qualidade suficiente para análise genética.

Palavras-chave: Ciências forenses; Genética forense; Perfis genéticos; Touch DNA.

ABSTRACT

DNA analysis has been used as a tool of criminal investigation and for producing forensic evidence. This kind of exam has been increasingly requested, even in situations where the amount of DNA present in the samples is very small. For example, samples of touch DNA, which consists of objects manipulated or touched by human skin that have small amounts of cells deposited on its surface, potential targets to DNA analysis. In this kind of sample, a great challenge is to identify the best locations for sample collection, since the biological material is not easy to identify. The fingerprint revelation technique uses fingerprint powders to reveal latent fingerprints allowing the identification surfaces touched by human skin. The aim of this study was to evaluate the possibility of using the fingerprint powders as screening tools for collecting biological material in touch DNA samples, obtaining good quality genetic profiles. The first step was to study the amount of powder adhered to the impressions produced by the different parts of the hands and the correlation between the amount of powder and the amount of DNA recovered. Next, the influence of fingerprint powder on laboratory procedures involved in DNA analysis was evaluated. The inhibitory effect of fingerprint powder in the PCR reaction was tested followed by the effect of different extraction methods on the inhibition. One DNA purification step was even included to improve the results. Finally, five different objects related to crimes: firearms, ammunition cartridge, kitchen knife, steering wheel and gear shift were proceeded to DNA analysis. The results showed that the amount of fingerprint powder recovered differed according the region of the hand which produced the fingerprint and the amount of adhered powder was directly related to the amount of DNA obtained. The fingerprint powder had a significant inhibitory effect on the PCR reaction. The methods of DNA extraction decreases the inhibitory effect, but it remains relevant. The purification procedure does not completely eliminate the inhibitory effect, but reduces an intensity that does not completely compromise the obtaining genetic profiles. In the five tested objects, it was possible to collect good amounts of DNA in the steering wheel, and in reasonable quantities in the firearms, gear shift and kitchen knife. The cartridge ammunition was the only object which was not possible to recover DNA in sufficient amount to produce quality genetic profiles. Therefore, we conclude that fingerprint powders can be used as tools for choosing the right regions to collect biological material in touch DNA samples. Even considering its inhibitory effect on the PCR reaction, samples collected along with fingerprint powders are able to produce genetic profiles with sufficient quality for genetic analysis.

Keywords: Forensic science, Forensic genetics; Genetic profile; Touch DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Quantidade de pó recuperado, em miligramas, a partir das diferentes impressões latentes reveladas, realizadas em triplicatas.....	37
Figura 02: Área das superfícies dos três tipos de impressões latentes reveladas.....	38
Figura 03: Quantidade de pó revelador recuperado, em miligramas, por mm ² de impressão revelada.....	38
Figura 04: Quantidade de pó revelador recuperado, em miligramas, por área de impressão coletada, em milímetros quadrados.....	41
Figura 05: Quantidade de pó revelador recuperado, em miligramas, em relação à quantidade de DNA extraído da amostra, em ng.....	41
Figura 06: Área da impressão coletada, em milímetros quadrados, em relação à quantidade de DNA extraído da amostra, em ng.....	41
Figura 07: Quantidade de DNA recuperado de cada amostra com as diferentes concentrações de pós reveladores.....	42
Figura 08: Quantidade de DNA recuperado de cada amostra com as diferentes concentrações de pós reveladores após a extração fenol-clorofórmio.....	43
Figura 09: Quantidade de DNA recuperado de cada amostra com as diferentes concentrações de pó reveladores após a purificação com resina Purelink®.....	45
Figura 10: Quantidade de DNA extraído para cada método de coleta utilizado. Análise realizada em triplicata.....	46
Figura 11: Quantidade de DNA recuperado em amostras com pó revelador utilizando três diferentes metodologias de extração.....	47
Figura 12: Quantidade de DNA extraído a partir de cada um dos diferentes objetos testados.....	49
Figura 13: Quantidade de DNA extraído a partir de cada um dos diferentes objetos testados agrupados conforme os doadores.....	49
Figura 14: Quantidade de DNA extraído a partir de cada um dos diferentes objetos testados agrupados conforme dias de coleta.....	49
Figura 15: Eletroferograma (A) da amostra 01, 0,430ng de DNA e perfil completo com todos os 23 marcadores; (B) amostra 15, 0,001ng de DNA e perfil parcial composto por sete dos 23 marcadores analisados.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- STR** – *Short Tandem Repeats*
- CODIS** – *Combined DNA Index System*
- S&W** – *Smith and Wesson*
- EDTA** - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- DTT** - *Dithiothreitol*
- qPCR** – Reação de PCR Quantitativa
- CCD** – *Charge Coupled Device*
- RFU** – *Relative Fluorescence Units*
- SNP** – *Single Nucleotide Polymorphisms*
- NGS** – *Next Generation Sequencing*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DNA E GENÉTICA FORENSE.....	14
1.2 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS.....	15
1.3 APLICAÇÕES DE DNA FORENSE.....	17
1.4 O DNA A SERVIÇO DA JUSTIÇA.....	18
1.5 BASES DE DADOS DE DNA.....	20
1.6 HISTOLOGIA DO EPITÉLIO DAS MÃOS.....	21
1.7 TOUCH DNA.....	22
1.8 REVELAÇÕES DE IMPRESSÕES DIGITAIS LATENTES.....	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS.....	27
3.2 REVELAÇÃO DAS IMPRESSÕES LATENTES.....	28
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS.....	29
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PÓ REVELADOR.....	30
3.5 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO E A QUANTIDADE DE DNA EXTRAÍDO.....	31
3.6 MEDIDA DA ÁREA DAS REGIÕES DE CONTATO.....	31
3.7 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO.....	32
3.8 EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
3.8.1 Extração Orgânica Fenol-Clorfórmio.....	33
3.8.2 Extração utilizando os kits comerciais.....	33
3.9 PURIFICAÇÃO DE DNA.....	34
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR qPCR.....	34
3.11 AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES GENÉTICOS.....	35
3.12 GENOTIPAGEM DOS PERFIS GENÉTICOS.....	35
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO A PARTIR DAS IMPRESSÕES LATENTES.....	37
4.2 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO E A QUANTIDADE DE DNA EXTRAÍDO.....	39
4.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO.....	42
4.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS A ETAPA DE EXTRAÇÃO.....	43
4.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS UMA ETAPA DE PURIFICAÇÃO.....	44
4.6 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COLETA NA QUANTIDADE DE DNA RECUPERADO DE IMPRESSÕES LATENTES.....	45
4.7 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	46
4.8 PESQUISA DE MATERIAL GENÉTICO EM CINCO OBJETOS DIFERENTES.....	47
4.9 OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE AMOSTRAS COLETADAS.....	50
5 DISCUSSÃO	53
5.1 QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO A PARTIR DAS IMPRESSÕES LATENTES.....	53
5.2 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO E A QUANTIDADE	

DE DNA EXTRAÍDO.....	54
5.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO.....	55
5.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS A ETAPA DE EXTRAÇÃO.....	56
5.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS UMA ETAPA DE PURIFICAÇÃO.....	58
5.6 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COLETA NA QUANTIDADE DE DNA RECUPERADO DE IMPRESSÕES LATENTES.....	59
5.7 AVALIAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM RELAÇÃO A QUANTIDADE DE DNA RECUPERADA.....	61
5.8 PESQUISA DE MATERIAL GENÉTICO EM CINCO OBJETOS DIFERENTES.....	62
5.9 PERFIS GENÉTICOS DE AMOSTRAS DE TOUCH DNA.....	64
5.10 CONSIDERAÇÕES EM RELAÇÃO À ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	66
5.11 PERSPECTIVAS FUTURAS EM RELAÇÃO A NOVAS TECNOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA.....	67
5.11.1 Utilização de SNPs.....	68
5.11.2 Sequenciamento de Nova Geração.....	68
6 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 DNA E GENÉTICA FORENSE

A genética forense é um ramo das ciências forenses que utiliza ferramentas de genética e biologia molecular no estudo de materiais biológicos com a finalidade de resolver conflitos legais. O alvo desses estudos são as moléculas de ácidos nucleicos, presentes em quase todos os seres vivos, que apresentam variabilidade tanto entre as diversas espécies quanto entre os diferentes indivíduos da mesma espécie. A variabilidade dessa molécula associada a hereditariedade da mesma faz com que a análise de DNA seja propícia para a resolução de disputas na área legal (1).

A molécula de DNA é formada por duas longas cadeias de polinucleotídeos, as quais são compostas pela combinação de quatro nucleotídeos diferentes. A sequência e combinação desses nucleotídeos ao longo das moléculas de DNA armazena as instruções genéticas básicas para o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos, que são transmitidas ao longo das suas gerações (2).

Em células humanas, o DNA encontrado dentro dos núcleos celulares é organizado em estrutura conhecidas como cromossomos, que consistem em uma associação de DNA e proteínas histônicas e não histônicas. O genoma nuclear humano é formado por 22 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais. A maioria dos exames de DNA relacionados à identificação humana é realizada com marcadores genéticos localizados nos cromossomos autossômicos e a determinação de gênero utiliza marcadores genéticos presentes nos cromossomos sexuais (3). Os marcadores genéticos são regiões genômicas em que se observa variação quando se compara indivíduos de uma mesma espécie e que essas regiões sejam polimórficas ao menos em parte das populações da espécie. Uma região genômica é considerada polimórfica quando existem ao menos dois alelos, sendo que um deles apresente uma frequência populacional de no máximo 99%.

Grande parte do genoma humano, é composto por sequências não codificantes (2). Embora ainda não se compreenda inteiramente as funções dessas regiões não codificantes, elas possuem uma utilidade muito grande para a genética forense. São

nessas regiões que se localizam grande parte da variabilidade genética entre os indivíduos, e a partir das suas análises que se iniciaram as técnicas de identificação humana (4).

Nas regiões não codificantes do genoma humano são encontradas diversas sequências de repetições em *tandem*, chamadas de minissatélites. Os marcadores microssatélites possuem um motivo de até seis pares de base que se repetem em sequência. Esses marcadores geralmente apresentam um alto número de alelos, denominado na literatura como alto grau de polimorfismo. Através da identificação e análise das diferenças nos números de repetições, é possível identificar e diferenciar o material genético pertencente a indivíduos distintos (5).

O perfil genético relativo a diversas regiões polimórficas do DNA, obtido com a finalidade de identificação, foi inicialmente chamado de “Impressão digital de DNA”. Esse nome relaciona a singularidade da informação genética de um indivíduo com a das suas impressões digitais, o método mais tradicional e estabelecido de identificação (6). Em 1985, Alec Jeffreys iniciou a efetiva aplicação das técnicas de genética molecular na identificação de polimorfismos em regiões hipervariáveis do genoma humano. As técnicas desenvolvidas por esse autor se mostraram eficientes na resolução de um caso de imigração, em que foi realizada a análise de vínculo genético, e em um caso criminal envolvendo violência sexual (5). A partir da resolução desses casos a genética forense passou a ser largamente empregada na rotina de investigação de diversos crimes (7).

1.2 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS

Para se obter a informação presente no DNA proveniente de qualquer tipo de material biológico são necessárias várias etapas laboratoriais. Na maioria das vezes, é necessário extrair o DNA do interior dos núcleos das células que compõem o material analisado. Para tanto, é necessário tratar o vestígio bruto coletado em um local de crime, retirando o material biológico presente no suporte coletado, como por exemplo, o sangue presente em uma faca ou o sêmen em uma roupa íntima. A seguir as membranas celulares devem ser submetidas a uma lise de membrana plasmática, liberando o seu conteúdo plasmático em solução. Todo o material composto por restos celulares,

proteínas, lipídeos e outras macromoléculas são retirados e as moléculas de DNA são isoladas e recuperadas (8).

A seguir os fragmentos de interesse onde estão os marcadores de interesse são amplificados através de reação de PCR. Essa reação visa produzir diversas cópias de um fragmento específico de DNA originalmente presente na amostra, as sequências que são do interesse para a identificação humana, descartando a possível influência de moléculas de DNA exógenas, como de outros seres. Após a amplificação do DNA, o perfil genético é obtido a partir da genotipagem, que tem sido realizada, na maioria dos laboratórios, por eletroforese capilar. Neste tipo de eletroforese, os fragmentos de DNA amplificados são submetidos a uma diferença de potencial elétrico e migram através de um fino capilar metálico. Os fragmentos maiores tem mais dificuldade para percorrer o trajeto no capilar e demoram mais tempo, que os fragmentos menores. Através dessa diferença de tempo é possível identificar o tamanho dos fragmentos amplificados na amostra e, conseqüentemente, identificar os diferentes alelos presentes em uma população (9).

Atualmente, o tipo de marcadores genéticos mais utilizado em identificação forense é o STRs (*short tandem repeats*). Esses marcadores são constituídos de pequenas sequencias de DNA, variando de duas até seis pares de bases, que se repetem um determinado número de vezes em sequência em uma determinada região do genoma. Nessas regiões, que apresentam um alto grau de polimorfismo, indivíduos distintos apresentam diferentes números de cópias nas sequências repetitivas do material genético. Esse polimorfismo produz um grande poder de discriminação entre indivíduos não relacionados e possibilita até mesmo a diferenciação de parentes próximos (10).

A grande vantagem dos marcadores do tipo STR em relação aos minissatélites anteriormente utilizados em genética forense está na sua combinação com a reação de PCR. A associação entre uma técnica de amplificação e essa característica do genoma permite a detecção de DNA em quantidades muito pequenas ou em alto estado de degradação, duas condições muito frequentes quando da análise de amostras forenses. Além disso, a possibilidade de aplicação de métodos de automação e detecção por fluorescência, acrescentam sensibilidade e escala à genotipagem de DNA. O resultado reportado na forma de alelos discretos ainda torna os resultados da genotipagem de STRs mais fáceis de serem analisados e torna viável o desenvolvimento de bancos de dados de perfis genéticos de uma forma simples e em grande escala (3).

1.3 APLICAÇÕES DE DNA FORENSE

Dentre as diversas aplicações da utilização do DNA como ferramenta forense podemos citar (3):

- Obtenção de perfis genéticos a partir de material biológico encontrado em vestígios;
- Confronto de perfis genéticos de suspeitos com o obtido de vestígios;
- Identificação de cadáveres e restos humanos
- Identificação de pessoas desaparecidas;
- Exames de vínculos genéticos entre pessoas suspeitas de serem relacionadas;
- Identificação de vítimas de desastres de massa;
- Investigações de caráter histórico.

Todas essas aplicações são possíveis devido às características inerentes à molécula de DNA, como a hereditariedade e ubiquidade. O fato do DNA estar presente em todas as células nucleadas de um organismo, e de que ele é idêntico em todas elas, proporciona um leque de aplicações muito variado para a genética forense (8).

Virtualmente qualquer célula deixada por um indivíduo pode ser utilizada para a obtenção do seu perfil genético. Amostras biológicas como sangue, sêmen e secreção vaginal, por exemplo, são comuns na rotina forense, uma vez que a sua presença está diretamente relacionada com diversas ocorrências de natureza criminal. Contudo, outras fontes de material biológico também podem ser utilizadas com essa finalidade, desde que apresentem células humanas cujo material genético possa ser extraído (11). Encontra-se relatos dos seguintes materiais biológicos como boas fontes de material genético: sangue e manchas de sangue, sêmen e manchas de sêmen, ossos, dentes, fios de cabelo com raiz, fios de cabelo sem raiz, saliva, urina, fezes, raspado subungueal, tecido muscular, cera de ouvido, descamação do couro cabeludo (“caspa”), impressões digitais, além dos materiais biológicos encontrados em objetos diversos como lâminas de barbear, chicletes, relógio de pulso, pontas de cigarro, selos de postagens, abas de envelopes e escovas de dente, dentre outros (3).

Portanto, o universo de materiais biológicos possíveis de serem analisados na área de genética forense é virtualmente inesgotável. Porém, para tanto, é necessário que técnicas e procedimentos de extração de DNA e obtenção de perfis genéticos sejam

pesquisados e desenvolvidos para que todo esse potencial seja empregado em sua plenitude.

1.4 O DNA A SERVIÇO DA JUSTIÇA

Atualmente, os índices de criminalidade tem atingido patamares muito altos na nossa sociedade (11). Parte importante das políticas de segurança pública no combate à criminalidade é a produção de provas periciais. Caminhando sempre ao lado da ciência, as provas periciais são ferramentas fundamentais para diminuir a impunidade e ajudar no combate a criminalidade. Os avanços na ciência e tecnologia dos últimos anos tem contribuído em grande parte com o desenvolvimento das ciências forenses como um todo. Dentre as áreas da criminalística que tem mais se desenvolvido e mais sendo utilizada nos últimos anos, estão as análises de materiais biológicos, principalmente as análises relacionadas ao DNA (12).

A análise de DNA é mundialmente utilizada no âmbito forense como ferramenta para auxiliar a justiça criminal a cumprir as suas funções. Através do DNA é possível obter um perfil genético único, que individualiza uma pessoa, possibilitando a identificação de autores e o estabelecimento de dinâmicas de eventos relacionados à ocorrências de natureza criminal, com uma grande confiabilidade e robustez nos resultados (13).

Uma das grandes vantagens do DNA sobre outros meios de produção de provas periciais está relacionada com os seus mecanismos de transmissão hereditários. O material genético de um indivíduo guarda relação direta com o material dos seus ascendentes e descendentes, e essa relação pode ser estabelecida no momento da análise de um caso. Ou seja, se na ocasião de um confronto de material genético proveniente de vestígios o suspeito não estiver disponível ou não autorizar a coleta de material biológico, o exame pode ser realizado com material biológico fornecido por um ou mais de seus parentes. Da mesma forma, um suspeito encaminhado para um confronto pode ser excluído de ter produzido determinada amostra biológica, mas pode-se descobrir que o verdadeiro autor é um indivíduo relacionado a ele. Essas possibilidades ampliam de grande forma o leque de possibilidades onde a análise do DNA forense pode ser utilizada (3).

O uso do DNA como prova em processos criminais tem sido cada vez mais valorizado e desejado pela justiça. Algumas características específicas dos exames periciais de DNA como a sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade, validação dos resultados e rigor científico, tornam os seus resultados muito confiáveis, elevando as provas de DNA a uma categoria muitas vezes superior em relação a outros vestígios normalmente utilizados. Isso faz com que cada vez mais a justiça deseje que provas envolvendo DNA estejam presentes nos processos, mesmo nos casos em que classicamente elas não eram utilizadas (14).

Ao mesmo tempo, a ampla divulgação que os exames de DNA tem ganhado na imprensa e nos meios de comunicação, principalmente em relação ao exames de paternidade, levou o conhecimento dessa ferramenta à população em geral. Esse efeito foi potencializado pelos filmes, seriados e programas de televisão, onde o DNA tem recebido grande destaque. Hoje em dia, não apenas as partes integrantes dos processos criminais tem expectativas em relação aos exames de DNA como também o público em geral. Esse fato tem transferido muita responsabilidade aos laboratórios de DNA forense, uma vez que questionamentos que há pouco tempo soariam improváveis de serem feitos por quaisquer das partes envolvidas no processo legal, hoje são comumente recebidos pedidos de esclarecimentos e questionamentos sobre aspectos cada vez mais técnicos e aprofundados (15).

Em locais de crimes contra o patrimônio (roubos, furtos, apropriações indébitas), dificilmente é deixado algum tipo de material biológico, como sangue, por exemplo, para que a produção de prova pericial de DNA possa contribuir com a investigação e o processo penal. Muitos dos autores desse tipo de crime não são punidos, ou até mesmo descobertos devido à falta de vestígios deixados nos locais onde os crimes são cometidos. (16).

Embora os crimes contra patrimônio sejam em geral classificados como de “menor potencial ofensivo”, muitas das teorias de criminologia modernas tem associado a ocorrência de crimes graves, como homicídios, estupro e latrocínios, com um passado de crimes mais simples. Dessa forma, criminosos iniciariam cometendo crimes menos graves e entrariam em uma progressão para crimes cada vez mais violentos. Levando essas teorias em consideração, é de vital importância para uma política de segurança pública que esses criminosos tenham a sua carreira criminosa impedida quando ainda estão cometendo crimes menos graves, como os contra o patrimônio, por exemplo. Ferramentas que auxiliem na resolução desse tipo de crime são fundamentais na

prevenção dos crimes mais graves e violentos (17).

1.5 BASES DE DADOS DE DNA

Atualmente encontra-se em implantação no Brasil a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos, que consiste em uma base de dados nacional de perfis genéticos, utilizando o software CODIS (*Combined DNA Index System*). Essa rede possibilitará a troca de informações sobre perfis genéticos obtidos em investigações, facilitando o compartilhamento de dados e comparações em nível local e nacional. Quanto maior a quantidade de perfis genéticos extraídos de vestígios relacionados à ocorrências criminais inseridos no banco de dados, maior será a probabilidade de se encontrar um perfil coincidente com um autor de um crime (18).

Além disso, o desenvolvimento de novas ferramentas de processamento de dados proporcionou uma nova perspectiva nas buscas por perfis genéticos em base de dados, que é a busca por familiares. Ao invés de procurar apenas uma coincidência perfeita entre dois perfis genéticos, a busca familiar analisa o grau de similaridade entre um perfil questionado e a base de dados, procurando por um perfil genético parecido porém não idêntico, que pode ser atribuído a um parente próximo do indivíduo inicialmente pesquisado (19).

Essa nova forma de busca de perfis genéticos em uma base de dados proporciona um aumento muito grande no potencial em que a genética forense pode contribuir com as investigações criminais e os processos legais. Em países que possuem uma base de dados robusta e consolidada, o alcance de uma busca nesse nível pode atingir uma parcela muito grande da população. Cada vez mais, é necessário alimentar as bases de dados com o maior número possível de perfis genéticos relacionados a ocorrências criminais (20).

Além da busca por parentes próximos através de marcadores autossômicos, as principais bases de dados estão considerando incluir marcadores de linhagem nos seus perfis armazenados, como marcadores do cromossomos Y, por exemplo. A inclusão de marcadores de linhagem possibilitará uma expansão ainda maior das buscas em base de dados, e aumentará a importância da adição do maior número de perfis genéticos

possíveis (21).

Os bancos de dados de DNA forense foram inicialmente utilizados como ferramenta em casos de crimes de grande potencial ofensivo, como por exemplo homicídios, latrocínios e estupros. Com o passar do tempo, foi observado a utilidade dos bancos de dados também em casos de menor potencial lesivo como furtos, roubos e arrombamentos. Enquanto que nos casos de crimes violentos é muito comum a presença de material biológico em grande quantidade, como sangue e sêmen, por exemplo, nos crimes menos violentos praticamente a única forma de se obter DNA do autor é através do contato desse indivíduo com superfícies e objetos do local. Portanto, otimizar as técnicas de obtenção de DNA a partir desses vestígios é fundamental para aumentar a quantidade de perfis recuperados em locais de crimes (22).

1.6 HISTOLOGIA DO EPITÉLIO DAS MÃOS

O epitélio humano recobre o corpo e tem a função de proteger contra o atrito, infecção de microrganismos, perda de água e radiação ultravioleta. É formado pela pele (tegumento) e seus anexos, os pelos, unhas, glândulas sebáceas, sudoríparas e sebáceas. A pele é composta pela derme, de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e pela derme, de tecido conjuntivo (12).

A pele apresenta diferenças na sua composição conforme a sua localização. A palma das mãos, adaptada para resistir a uma força de atrito maior, possui uma epiderme com mais do que 5mm de espessura, constituída por várias camadas celulares e por uma camada superficial de queratina bastante espessa. Não possui pelos e glândulas sebáceas, mas é abundante em glândulas sudoríparas (12).

A camada superficial de queratinócitos sofre uma descamação a medida que o epitélio das mãos sofre atrito durante a manipulação de objetos. A quantidade de células descamadas é influenciada diretamente pela pressão exercida e duração da manipulação assim como pelas características dos indivíduos como idade e sexo, por exemplo. Além das células descamadas, a superfície dos objetos manipulados também apresenta os fluidos biológicos produzidos pelas glândulas presentes no epitélio (13).

1.7 TOUCH DNA

A medida que a relevância e o valor probatório das provas produzidas através da análise de DNA tem aumentado, também se criou uma maior expectativa para se gerar resultados em um maior número de casos, o que acabou levando à necessidade de se obter perfis de DNA a partir de quantidade cada vez menores de material biológico (11).

Ao mesmo tempo, as técnicas empregadas para a análise de DNA têm evoluído consideravelmente nos últimos anos, possibilitando a obtenção de resultados a partir de fontes que até então não se acreditava que fossem úteis para a investigação criminal. Por exemplo, objetos deixados em uma cena de crime podem oferecer informações valiosas sobre o indivíduo que os utilizou (23).

Os casos forenses se distinguem de pesquisas acadêmicas pelo fato de que normalmente a quantidade de material biológico disponível para análise é muito pequena, muitas vezes inviabilizando o uso de técnicas tradicionais. Desde o início da utilização do DNA como ferramenta forense, sempre se buscou obter perfis genéticos de qualidade a partir de pequena quantidade de material biológico disponível (24).

O conceito de “*touch DNA*” se refere ao material genético que é deixado por um indivíduo, através das suas células epiteliais, quando se toca ou entra em contato com um objeto qualquer (24). Todo dia milhares de células epiteliais descamam e são transferidas para qualquer superfície que a pele de um indivíduo entrar em contato. Se algum suporte relacionado a um crime for tocado por uma das pessoas envolvidas, existe a possibilidade de se obter DNA a partir das células epiteliais descamadas (25).

Ao se adotar uma metodologia que permita trabalhar com DNA deixado após contato, um laboratório de DNA forense amplia muito a gama de casos para serem trabalhados, uma vez que apenas alguns tipos de ações criminosas deixam material biológico de forma evidente para que seja possível a análise de DNA. Ao contrário, oferecendo a possibilidade de identificar *touch DNA*, praticamente qualquer local de crime pode apresentar vestígios com potencial para ser analisado (16).

Contudo, células epiteliais geralmente são depositadas em uma quantidade muito menor do que a quantidade de células presentes em um fluido biológico, como sangue por exemplo. Dessa forma, a dificuldade em se obter um perfil de DNA a partir desse tipo de material é muito maior do que a partir de uma mancha de sangue encontrada em um local de crime (26).

Para se obter resultados satisfatórios utilizando amostras obtidas de objetos contendo *touch DNA* é necessário reconhecer quais objetos e quais regiões desses objetos são mais propensos a apresentar células epiteliais deixadas quando do contato a pele humana. Além disso também é imprescindível a escolha e desenvolvimento de métodos e técnicas mais adequados para se recuperar a maior quantidade de células possível e conseqüentemente, maior quantidade de DNA (27).

Para se obter um perfil genético a partir de quantidades muito pequenas de DNA, é necessário que todos os procedimentos realizados durante o exame sejam otimizados para se obter o melhor resultado possível. Além disso, novas tecnologias de extração, quantificação, amplificação e genotipagem, que se tornam disponíveis a cada dia, proporcionam um avanço na capacidade de gerar bons resultados. Logo, uma coleta adequada e uma análise criteriosa são determinantes para a qualidade do resultado obtido (28).

Ao se trabalhar com esse tipo de vestígios, uma outra preocupação importante deve ser levada em conta pelos serviços forenses. Os materiais biológicos comumente mais encontrados em locais de crimes, como sangue, saliva, sêmen, fios de pelo, são de conhecimento dos agentes de segurança pública. Em função disso, os locais são bem preservados e os vestígios são coletados e encaminhados à análise da melhor forma possível. Por outro lado, em locais em que se deseje efetuar a coleta e análise de amostras contendo "*touch DNA*", é necessário que procedimentos de preservação de local, coleta, acondicionamento e encaminhamento estejam bem definidos e divulgados entre os agentes de segurança pública. A pesquisa, avaliação e definição clara e correta dos procedimentos de preservação e processamento de locais de crime é de fundamental importância para que esse tipo de vestígio possa ser incluído na rotina de análise de um laboratório de DNA forense (29). Da mesma forma, o desenvolvimento de técnicas e procedimentos laboratoriais específicos para se trabalhar com amostras contendo *touch DNA*, assim como o aprimoramento e customização de parâmetros das técnicas existentes, pode significar a diferença entre alcançar ou não um resultado final satisfatório.

1.8 REVELAÇÕES DE IMPRESSÕES DIGITAIS LATENTES

Identificar se um objeto foi tocado por alguma pessoa não é uma tarefa fácil, já que esse contato, na grande maioria das vezes, não deixa vestígios visíveis a olho nu. Na investigação criminal, um procedimento largamente empregado para a análise de impressões papilares é o uso de reveladores de impressões latentes. Para tanto, um reagente revelador é aplicado em uma determinada superfície, reagindo com a gordura e o suor deixado pelo contato com a pele, propiciando a observação da impressão latente (30).

Os reagentes mais comumente utilizados para a detecção de impressões digitais latentes são os pós reveladores. De diversas composições diferentes, os pós reveladores são compostos coloridos de partículas muito finas que aderem aos componentes oleosos e à umidade deixada pelo contato da pele em uma superfície. Como a superfície da pele é irregular, formada por cristas e vales, a deposição de material nas superfícies segue o mesmo padrão. Os pós reveladores aderem por eletrostática nas regiões em que material foi depositado pelo contato com as cristas, mas não onde houve contato com os vales. Dessa forma, a coloração do pó aderido proporciona o contraste suficiente para a revelação de uma impressão latente (31).

O mesmo contato da pele humana que produz as impressões digitais também pode depositar células na superfície onde houve o contato. Mesmo que a deposição de células seja o esteja relacionada com os padrões morfológicos deixados pela impressão, o fato de se descobrir o local exato onde um suporte foi tocado por um indivíduo pode auxiliar na escolha do local de eleição para se efetuar a coleta de material visando a obtenção de um perfil genético (32).

A revelação de impressões latentes pode ser aplicada não somente para detectar o padrão morfológico da impressão papilar como também nos casos onde a impressão produzida não apresenta qualidade suficiente para um confronto. Em muitas situações, o contato da pele com a superfície acontece de forma que as impressões deixadas se apresentem borradas e indefinidas, impedindo qualquer possibilidade de confronto. Porém, uma área de contato de morfologia indefinida pode informar de forma segura que um determinado local foi tocado e potencialmente pode conter células epiteliais e DNA em quantidade suficiente para a genotipagem (33).

Contudo, a composição química dos pós reveladores aparentemente possui um

efeito inibidor da reação de PCR, ou no mínimo prejudica a obtenção de perfis genéticos a partir das amostras. Essa propriedade compromete o emprego da revelação de impressão latente em conjunto com a pesquisa de DNA (34). Para que isto seja possível, faz-se necessário o aprimoramento das técnicas laboratoriais de exame de DNA para que o material genético coletado neste tipo de amostra seja extraído e isolado de quaisquer substâncias que possam prejudicar a sua identificação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver protocolos e metodologia para a pesquisa de DNA em amostras relacionadas à ocorrências de natureza criminal contendo material biológico deixado por contato, o *touch DNA*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de se coletar material biológico depositado por contato em determinadas superfícies comumente relacionadas a ocorrências de natureza criminal;
- Identificar as regiões de eleição para coleta de material biológico deixado por contato através da revelação de impressão digital latente com pós reveladores;
- Comparar diferentes metodologias de coleta de material biológico para escolher a que possibilite a recuperação da maior quantidade possível de material para a pesquisa de DNA;
- Comparar diferentes metodologias laboratoriais de extração e purificação de DNA, com a finalidade de isolar o material genético e retirar quaisquer substâncias que possam comprometer a obtenção de um perfil genético de qualidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da coleta e recuperação de *touch DNA*, foram selecionadas cinco superfícies candidatas, relacionadas com ocorrências de natureza criminal:

- Superfície externa de uma arma de fogo;
- Parte externa de um cartucho de munição;
- Cabo de uma faca serrilhada de cozinha;
- Superfície de um volante de um automóvel;
- Alavanca de câmbio de um automóvel.

Para a coleta de amostra foram recrutados três indivíduos adultos, não aparentados, do sexo masculino. Os indivíduos manipularam os cinco objetos em três dias diferentes.

As armas de fogo e os cartuchos de munição foram escolhidos porque a grande maioria dos locais relacionados com crimes contra a pessoa envolvem instrumentos dessa natureza. Foram utilizadas para as coletas pistolas automáticas de marca Taurus, modelo 24/7, calibre .40 S&W, constituídas por uma armação de polímero e ferrolho de aço com comprimento de 182mm. Os cartuchos coletados eram compatíveis com as armas de fogo, e apresentavam calibre .40 S&W, com a superfície externa de latão e 19mm de comprimento.

As facas foram escolhidas como representantes de armas brancas que também são comumente encontradas em locais de crime. Foi escolhido um modelo de faca de cozinha, de lâmina serrilhada e cabo plástico, de comprimento de aproximadamente 10cm de comprimento.

O volante e a alavanca de câmbio foram selecionados com o objetivo de compreender também os crimes de menor potencial ofensivo, onde não são utilizados instrumentos próprios, mas que a identificação dos autores através do DNA seja relevante. O volantes apresentavam revestimento sintético e diâmetro de

aproximadamente 40cm e as alavancas de câmbio de material plástico e altura de aproximadamente 20cm.

Foi realizada uma higienização das superfícies no dia anterior à coleta, utilizando uma solução de álcool 70% e papel toalha limpos. Após a limpeza, foi solicitado aos proprietários que fizessem o uso normal e cotidiano dos instrumentos, evitando apenas realizar qualquer outro tipo de limpeza adicional. A coleta foi realizada no dia seguinte, sempre após um período de 18 a 24 horas. No caso de coletas sequenciais, foi sempre respeitado um período de 48 horas de intervalo entre as diferentes coletas dos mesmos locais.

A exceção do protocolo de coleta foi feita com as facas de cozinha, uma vez que era difícil estabelecer um uso regular das facas sem que elas fossem limpas, abrindo possibilidade de muitas diferenças na manipulação dos objetos. Portanto, com as facas foi adotada uma abordagem diferente, promovendo uma limpeza com detergente Extran e posterior exposição à radiação ultravioleta durante 30 minutos. As facas foram entregues aos proprietários que as seguraram por um período de aproximadamente cinco minutos.

Os experimentos de impressões palmares, do polegar e indicador foram realizadas com uma placa de vidro, de espessura igual a 0,5mm, de dimensões aproximadas de 50 por 60 centímetros, que era usada apoiada sobre uma mesa no momento da coleta e que possibilitasse ser retirada para limpeza e descontaminação. A limpeza foi realizada com a solução de Extran e a placa foi submetida a radiação ultravioleta por 30 minutos antes de ser usada nos experimentos.

3.2 REVELAÇÃO DAS IMPRESSÕES LATENTES

As amostras produzidas por contato foram submetidas a uma aplicação de pós reveladores para a triagem das áreas a serem coletadas. Foram utilizados três tipos diferentes de pós reveladores: HiFi Volcano Latent Print Powder Silk Black® (Sirchie® Finger Print Laboratories, NC, USA), Magnuclei® Magnetic Fingerprint Powder (Sirchie® Finger Print Laboratories, NC, USA) e uma opção de pó artesanal, um pigmento usado em tinta de rejunte utilizado em construção civil.

Silk Black® Latent Print Powder é um pó específico para revelações de

impressões digitais latentes, de utilização muito versátil, recomendado para uma ampla gama de superfícies diferentes. O pó é composto de uma mistura de *carbon black* e *Lycopodium*, em uma granulometria muito fina. O pó foi aplicado sobre a superfície a ser revelada e a seguir o excesso foi retirado com a ajuda de um pincel de fibra de vidro. Apenas o pó que ficou aderido às impressões digitais permanece na superfície após a passagem do pincel, possibilitando a identificação da impressão.

Magnuclei® Magnetic Fingerprint Powder é um pó magnético que se apresenta como uma alternativa ao pó de revelação padrão. Este é mais adequado para trabalhar com impressões em superfícies plásticas e texturas. O pó magnético não utiliza um pincel padrão durante a revelação. Ao invés disso, uma espécie de aplicador atrai o pó utilizando a força magnética, de forma que não há um contato direto com a superfície pesquisada.

Como alternativa aos pós reveladores comerciais, foi testada a aplicação de uma solução artesanal, a utilização de um pigmento para tintura de rejunte como revelador. O pigmento utilizado foi da marca Xadrez® (Lanxess Energizing Chemistry). O pó Xadrez® é um pigmento a base de óxido de ferro, que apresenta efeito satisfatório na revelação morfológica das impressões digitais. A cor do pigmento escolhida foi a vermelha, para facilitar a detecção em espectroscopia de absorção a 480 nm. A aplicação do pó Xadrez é semelhante ao Silk Black®, utilizando um pincel de fibra de vidro.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta do material biológico foi realizada da mesma forma para todos os objetos. Todas as amostras foram coletadas utilizando suabes de uso hospitalar, marca Absorve, de haste plástica e cabeça de algodão, esterilizados por Óxido de Etileno e acondicionados em embalagens plásticas. Ao longo dos experimentos foram utilizadas três protocolos diferentes de coleta das amostras: coleta com suabes umedecidos; com suabes secos; utilizando a técnica de *double swabbing*.

A coleta com suabes umedecidos é a coleta padrão utilizada em diversos serviços forenses. Ela consiste em umedecer levemente os suabes com água deionizada ultrapura, removendo qualquer excesso de água e friccionando gentilmente a cabeça de algodão contra a superfície a ser coletada. A coleta com suabes secos utiliza os suabes

sem umedecê-los em água, apenas friccionando o algodão contra a superfície.

A técnica de *double swabbing* consiste em uma mistura das duas técnicas anteriores. Primeiramente, um suabe é umedecido em água deionizada e friccionado contra a superfície de interesse. A seguir, um segundo suabe seco é friccionado na mesma região, recolhendo a umidade deixada pela passagem do primeiro. Os dois suabes são então acondicionados e processados como se fossem apenas uma amostra (35).

Após a coleta, os suabes foram devidamente identificados e submetidos a uma breve secagem ao ar livre. A seguir, foram acondicionados em embalagens de papel e armazenados em freezer a -20°C , até a realização dos exames laboratoriais.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PÓ REVELADOR

Para a quantificação do pó revelador, foram produzidos três tipos de impressões papilares, da polpa digital do polegar, do dedo indicador e da palma da mão, em uma superfície limpa de vidro. Cada tipo de impressão foi produzida em triplicata. As impressões latentes foram reveladas utilizando o pó revelador da marca Xadrez®. Após a retirada do excesso, o pó aderido em cada uma das impressões foi coletado com suabes úmidos e eluído em uma solução aquosa.

A quantificação do pó revelador foi realizada utilizando a técnica de colorimetria através de espectroscopia de absorção na luz visível. Ela se baseia na propriedade das substâncias em absorver luz no espectro do visível em quantidade proporcional à sua concentração. Para a realização das análises foi utilizado um espectrofotômetro modelo Genesys 2.0 (Thermo Fisher Scientific). A absorbância das amostras foi aferida em cubetas de vidro, considerando o valor médio de três leituras sequenciais. O método utilizado para se estabelecer as concentrações de pó revelador nas amostras foi através de curva analítica, calculada através do método de mínimos quadrados, estabelecida a partir de uma curva padrão.

Para a produção da curva padrão, foi realizada uma diluição seriada de cinco pontos, na proporção 1:3, preparada a partir de uma solução inicial de concentração igual a 5,00mg/ml de pó Xadrez®, até ser atingida a concentração de 0,06mg/ml. As cinco

soluções foram submetidas a espectroscopia de absorção no comprimento de onda de 480nm e os resultados obtidos utilizados para construir a curva padrão.

As amostras reveladas com o pó Xadrez® coletadas com os suabes foram solubilizadas em 1ml de água. A seguir foi realizada a leitura do valor das absorbâncias de cada amostra, e a concentração de pó em cada amostra calculada a partir da curva analítica.

3.5 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO E A QUANTIDADE DE DNA EXTRAÍDO

Este experimento buscou estabelecer uma correlação entre a quantidade de pó revelador recuperado das impressões latentes e o DNA extraído das mesmas impressões. Para tanto, em uma superfície limpa de vidro foram produzidas diversas impressões com mãos e dedos de um mesmo indivíduo de forma aleatória, com graus variados de pressão e arrastamento, buscando simular como ocorreria em uma situação cotidiana. Após a revelação dessas impressões, dez regiões foram delimitadas e escolhidas ao acaso. A área dessas regiões foi medida e o material depositado foi coletado com suabes úmidos. O material recuperado foi eluído em uma solução aquosa e submetido à espectrometria de absorção de luz visível para a dosagem da quantidade de pó presente nas amostras. A seguir, a solução restante foi submetida à extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio e posteriormente submetida a uma reação de qPCR para quantificar o DNA presente na amostra.

3.6 MEDIDA DA ÁREA DAS REGIÕES DE CONTATO

Para realizar as medidas das áreas coletadas foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health). Uma fotografia foi tirada de cada região coletada em um ângulo de 90° graus em relação a superfície. Em cada fotografia foi adicionada uma escala física de comprimento e a área coletada foi delimitada de forma clara. Utilizando o

software, primeiramente foi feita uma calibração de distâncias com a escala física e a seguir realçada a região coletada, para que o software realizasse o cálculo da área.

3.7 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO

Foi realizado um ensaio para avaliar se os pós reveladores inibem a amplificação do material genético por PCR.

Para tanto foram utilizadas amostras dos três pós reveladores diferentes - pó SilkBlack®, Magnuclei® e Xadrez®. Com cada um deles foi produzida uma curva de diluição de cinco pontos e fator de diluição 1:5, começando com uma concentração de 5mg/ml até a concentração final de 0,06mg/ml. A cada uma dessas amostras foi adicionado 1ng de DNA padrão e as soluções foram submetidas à quantificação por qPCR.

Essas amostras foram submetidas a extração orgânica e novamente a PCR em tempo real para avaliar o efeito da metodologia de extração para esse tipo de amostra. Ainda, foram posteriormente submetidas a um protocolo de purificação de DNA utilizando a resina sintética Purelink®, com a finalidade de retirar ao máximo as substâncias interferentes, no caso os pós.

3.8 EXTRAÇÃO DE DNA

Amostras produzidas por impressões palmares e reveladas pelo pó Xadrez® foram submetidas a três protocolos de extração diferentes: um protocolo de extração *in house*, com o método de extração orgânica com fenol-clorofórmio; dois kits de extração de DNA forense comerciais, o Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Corporation, WI, USA) e o Invisorb® Spin Forensic Kit (Invitrogen® Corporation, CA, USA). Os kits de extração comercial foram utilizados devido a sua capacidade em obter um DNA final limpo, livre de interferentes. Nesse experimento, as impressões palmares em triplicata foram divididas em quatro quadrantes: em três dos quatro quadrantes a

impressão foi revelada com o pó Xadrez® e no quarto não foi aplicado qualquer tipo de revelador. Em todos os quadrantes o material depositado foi coletado com suabes úmidos. Em cada impressão os quadrantes submetidos aos diferentes métodos de extração foram rotacionados para evitar qualquer influência das regiões da palma da mão que produziram a impressão. Após concluída a extração, as amostras foram submetidas à reação de PCR em tempo real para a quantificação de DNA presente em cada amostra.

3.8.1 Extração Orgânica Fenol-Clorofórmio

O método de extração orgânica fenol-clorofórmio consiste em solubilizar uma porção do algodão presente no suabe coletado em uma solução tampão EDTA contendo Proteinase K e Dithiothreitol (DTT) e incubar a 56°C por 18 a 24 horas. Durante essa incubação ocorre a lise da membrana plasmática e liberação de todo o conteúdo celular, inclusive o DNA, em solução. A seguir é feita uma extração líquida com uma mistura de fenol pH 8,6, clorofórmio e álcool iso-amílico na proporção 25:24:1. A fase aquosa da extração é retirada e os ácidos nucleicos precipitados através da adição de álcool etílico absoluto. A seguir a amostra é secada em uma concentradora SpeedVac para a retirada de todo o álcool e ressuspendida em solução aquosa com água Milli-Q (14), (15).

3.8.2 Extração utilizando os kits comerciais

As extrações utilizando os kits comerciais seguiram os protocolos dos fabricante: Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Corporation, WI, USA) e o Invisorb® Spin Forensic Kit (Invitrogen® Corporation, CA, USA). O princípio básico dos métodos de extração é semelhante. Inicialmente é adicionado um tampão de lise, para liberar o conteúdo celular em solução. A seguir é adicionado um tampão de ligação que se prende ao DNA e é recuperado através da centrifugação da solução por uma coluna com uma membrana de afinidade. A seguir o DNA é recuperado das colunas com a ajuda de um tampão de eluição.

3.9 PURIFICAÇÃO DE DNA

O DNA extraído das amostras foi purificado utilizando o kit comercial Purelink® (Life Technologies®, CA, USA). As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante. A técnica consiste em adicionar um tampão de ligação, que possui afinidade com as moléculas de DNA. A seguir são realizadas duas lavagens na coluna de purificação, retirando todas as substâncias não desejadas. Por último, o DNA ligado é eluído e recuperado das colunas de purificação.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR qPCR

O DNA extraído foi quantificado utilizando a técnica de quantificação de DNA por uma reação de PCR quantitativa (qPCR), inicialmente descrita por Higuchi, em 1993 (16). Esta técnica consiste em simultaneamente detectar e quantificar uma região de interesse do DNA, utilizando um reação de PCR em tempo real. Para tanto *primers* específicos para a região de interesse são marcados com uma sonda fluorescente. A medida em que os fragmentos são amplificados, o fluoróforo presente nos *primers* é liberado a fluorescência é detectada pelo sensor CCD do equipamento de tempo real. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de DNA é produzida para inferir a quantidade de DNA amplificado a partir da fluorescência produzida pela reação.

Para a realização dos exames foi utilizado o kit comercial Plexor® HY (Promega® Corporation, WI, USA). As amostras foram preparadas conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. A seguir, a reação de qPCR foi realizada em um aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, CA, USA). Os resultados foram coletados utilizando o *software* Applied Biosystems® SDS Software v1.4.1 e analisados com o *software* Analysis Software v.1.5.4.18 (Promega® Corporation).

Nos experimentos onde foi necessário utilizar um DNA padrão de referência, foi empregado o DNA controle da linhagem celular 9948 (Promega® Corporation), de origem masculina.

3.11 AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES GENÉTICOS

As amostras extraídas foram amplificadas através da reação de PCR utilizando o kit comercial de amplificação multiplex PowerPlex Fusion® System (Promega® Corporation). Este kit foi desenvolvido especificamente para amplificação de amostras forenses, com baixa qualidade e presença de inibidores da reação de PCR. O kit é composto por 22 marcadores do tipo STR autossômicos (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D22S1045, Penta E e Penta D), um marcador do cromossomo Y (DYS 391) e Amelogenina.

As amostras foram preparadas conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram amplificadas em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) validado para esta finalidade.

3.12 GENOTIPAGEM DOS PERFIS GENÉTICOS

Foram analisados 15 perfis genéticos obtidos com amostras representativas do universo amostral. A análise de perfil genético foi realizada na busca de validação dos resultados dos experimentos com objetos. Foi realizada eletroforese capilar com os produtos de amplificação obtidos em um sequenciador 3130 xL Genetic Analyser® (Applied Biosystems®). A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes, com polímero POP4 (Applied Biosystems®), injeção de 10 segundos, nas condições recomendadas pelo fabricante. Os dados brutos foram coletados pelo *software* Data Collection v. 3.0 (Applied Biosystems®) e o tamanho dos fragmentos foi comparado com o Internal Lane Standard CC5 ILS 500 (Promega® Corporation). Os perfis genéticos foram analisados no *software* GeneMapper® ID-X (Applied Biosystems®), utilizando os parâmetros de análise recomendados pelo fabricante e um limiar de corte de 50 RFUs.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism® v.5.0. A partir do programa foram construídas as curvas de calibração dos experimentos de quantificação de pó revelador por espectrometria de absorção, calculadas as suas equações e coeficientes de linearidade.

Para a análise estatística dos resultados obtidos nos experimentos foram utilizados os testes não paramétricos de comparação de medianas, teste de Mann Whitney não pareados, e testes de análise de variância Kruskal-Wallis. Nos experimentos em que foram analisadas correlações, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson.

Em todos os testes realizados, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO A PARTIR DAS IMPRESSÕES LATENTES

Na Figura 01 estão apresentados os resultados relativos a quantidade de pó revelador recuperado da superfície limpa de vidro nos três tipos de impressões papilares, da polpa digital do polegar, do dedo indicador e da palma da mão, reveladas utilizando o pó revelador da marca Xadrez®. A medida foi realizada em espectrometria de absorção de luz visível para a dosagem da quantidade de pó presente nas amostras.

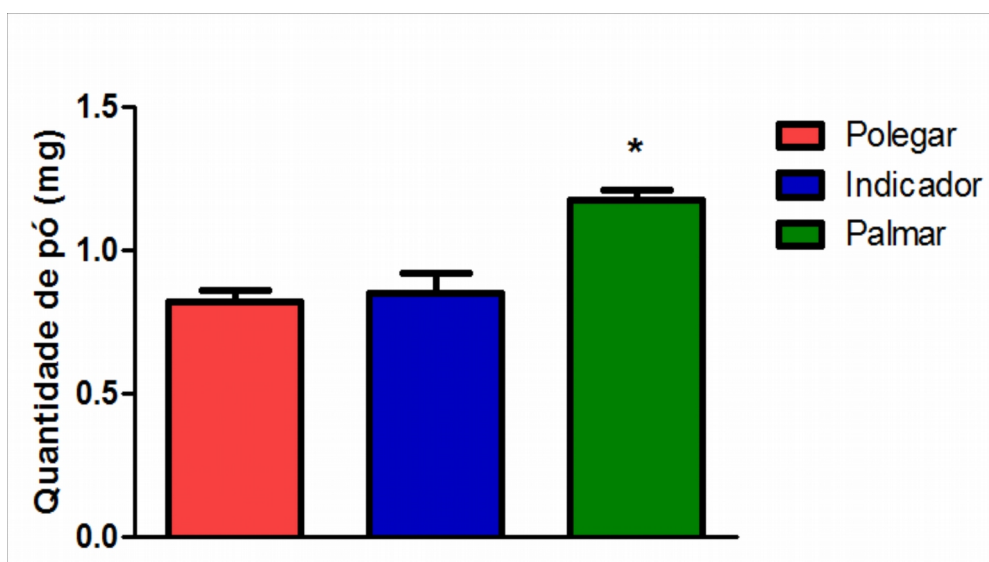


Figura 01: Quantidade de pó recuperado, em miligramas, a partir das diferentes impressões latentes reveladas, realizadas em triplicatas.

A impressão com a maior quantidade de pó revelador aderido e coletado foi a impressão palmar, com uma média de 1,17mg de pó revelador. A diferença em relação às impressões da polpa do polegar (0,82mg) e do dedo indicador (0,85mg) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de pó revelador recuperado da impressão produzida pela polpa digital do polegar e pelo dedo indicador.

Como o tamanho das impressões latentes reveladas são bem diferentes entre si, foi realizada uma medida da área de cada uma das impressões a fim de se comparar a

quantidade de pó recuperado ajustado pela mesma unidade de área. Os resultados da medida das áreas de cada tipo de impressão latente estão na Figura 02.

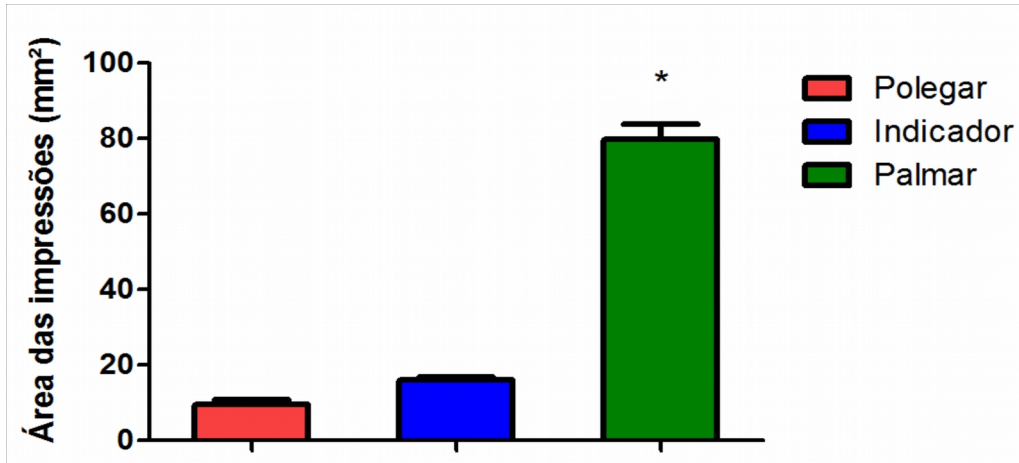


Figura 02: Área das superfícies dos três tipos de impressões latentes reveladas.

A média das áreas das impressões palmares foi de 79,77mm², bem maior do que a média das áreas das impressões da polpa digital do polegar e do dedo indicador, cujo resultado foi de 9,65mm² e de 15,67mm², respectivamente. A diferença entre o tamanho das impressões palmares foi maior de forma estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

A partir dos resultados da quantidade de pó revelador recuperado e da área das impressões latentes coletadas, foi calculada a quantidade de pó revelador recuperado a partir da mesma unidade de área para os três tipos de impressão produzidas. Na Figura 03 estão apresentados os resultados da quantidade, em miligramas, de pó revelador recuperado

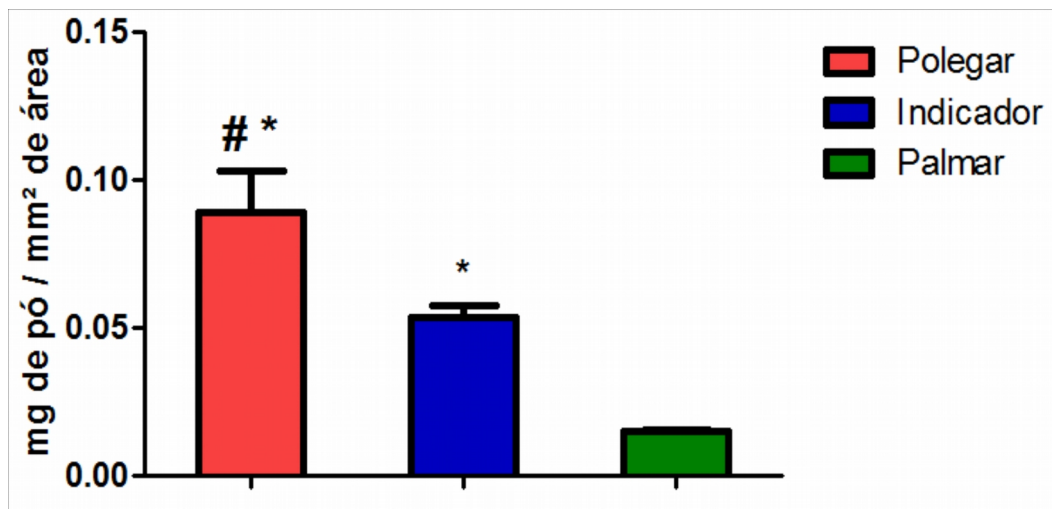


Figura 03: Quantidade de pó revelador recuperado, em miligramas, por mm² de impressão revelada.

Os resultados mostraram que, quando a quantidade de pó é corrigida pela área da coleta, a quantidade de pó recuperado da impressão produzida pela polpa digital do polegar é significativamente maior do que a das impressões produzidas pelo dedo indicador e pelas palmas das mãos ($p < 0,05$). A quantidade de pó na impressão do indicador também é significativamente maior do que a da impressão palmar ($p < 0,05$)

Apesar de em termos absolutos a quantidade de pó recuperado ser muito maior na impressão palmar, quando o valor é corrigido pela área da região coletada, essa impressão é a que apresenta a menor concentração de pó aderido. Da mesma forma, a impressão produzida pela polpa digital do dedo polegar é a mais rica em quantidade de pó aderido.

4.2 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO E A QUANTIDADE DE DNA EXTRAÍDO

Na Figura 04 está apresentado o gráfico de dispersão com a análise de tendência dos resultados obtidos da quantificação de pó revelador recuperado em relação à área das superfícies coletadas. Este experimento buscou estabelecer se há correlação entre a quantidade de pó revelador recuperado das impressões latentes e o DNA extraído das mesmas impressões.

Os resultados mostraram que houve uma boa correlação entre a área das superfícies coletadas e a quantidade de pó revelador recuperado ($R^2 = 0,9159$). Quando as impressões são produzidas de maneira aleatória, o tamanho das regiões coletadas tem relação direta com a quantidade de pó coletado. A princípio, quanto maior a área da região revelada, maior tendência de se observar uma maior quantidade de pó aderida.

A seguir foi feita a comparação entre a quantidade de pó revelador recuperado em relação à quantidade de DNA extraído do material coletado. O gráfico de dispersão com a análise de tendência dos resultados está exposto na Figura 05. Os resultados mostraram correlação entre a quantidade de DNA extraída do material e a quantidade de pó coletado, embora esta não seja uma correlação muito forte ($R^2 = 0,5062$). A correlação entre a quantidade de pó e a área coletada é muito mais forte, porém ainda é possível observar uma tendência de que quanto maior a quantidade de pó aderido a uma impressão revelada, maior é a chance de se extrair mais DNA a partir dessa amostra.

Posteriormente foi realizada a comparação entre a área da superfície coletada e a quantidade de DNA extraído do material coletado. O gráfico de dispersão e a análise de tendência estão expostos na figura 06. Como esperado, os resultados mostraram uma correlação fraca entre a quantidade de DNA extraída do material e a quantidade de pó coletado ($R^2=0,5358$). Uma vez que a área de coleta mostrou-se diretamente relacionada à quantidade de pó aderida, e a quantidade de pó aderida apresentou uma fraca correlação com a quantidade de DNA extraído, era esperado que a quantidade de DNA extraído também apresentasse correlacionada com a área da coleta.

Apesar da constatação de que a impressão produzida pela polpa digital do polegar apresenta uma quantidade de pó aderido muito maior do que outras regiões, quando as impressões foram produzidas na superfície de vidro de forma aleatória e desordenada, observou-se que a área guarda uma correlação forte com a quantidade de pó recuperado. Além disso, de uma forma geral, a quantidade de DNA extraído a partir de uma amostra coletada de uma impressão latente revelada mostrou-se relacionada com a área da superfície coletada e com a quantidade de pó aderida. Este resultado mostrou que um pó revelador pode ser utilizado como ferramenta de eleição para visualização das regiões mais apropriadas para a coleta de material genético.

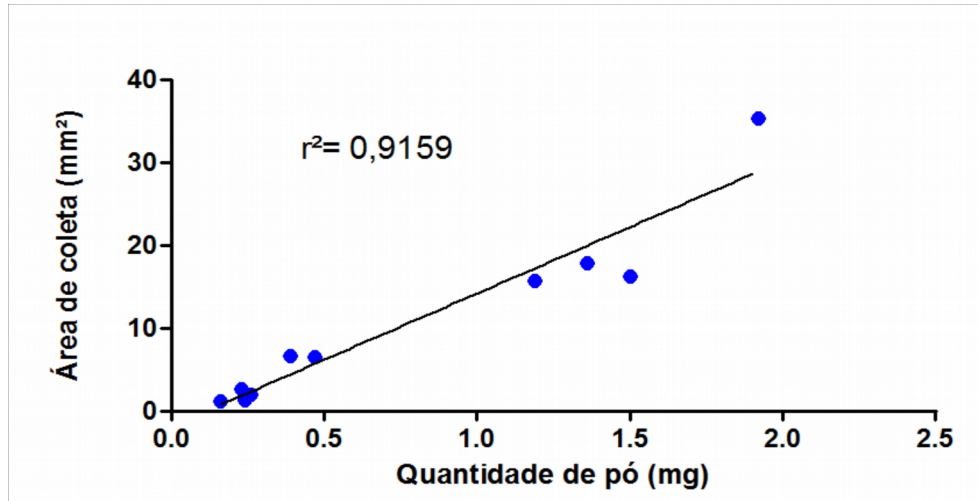


Figura 04: Quantidade de pó revelador recuperado, em miligramas, por área de impressão coletada, em milímetros quadrados.

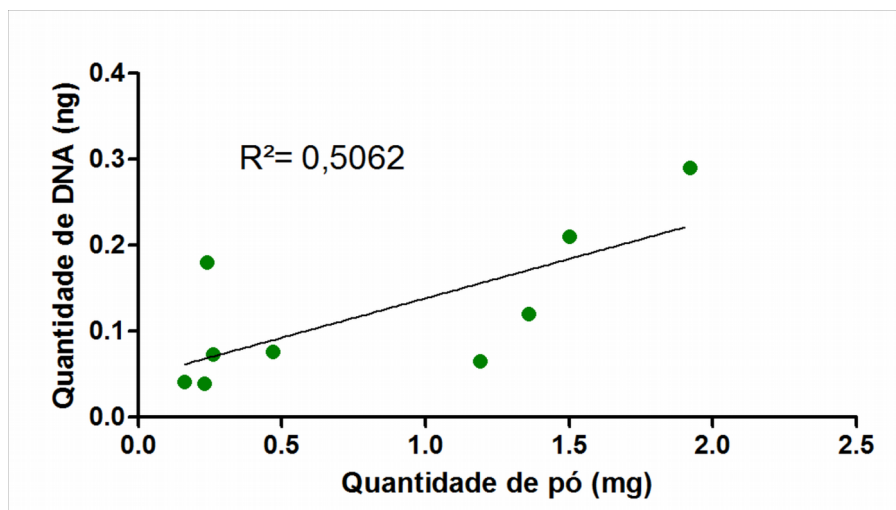


Figura 05: Quantidade de pó revelador recuperado, em miligramas, em relação à quantidade de DNA extraído da amostra, em ng.

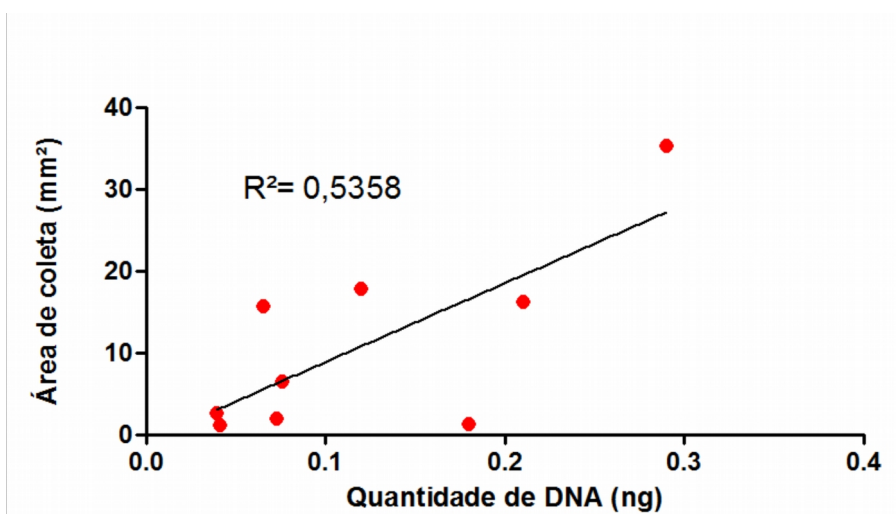


Figura 06: Área da impressão coletada, em milímetros quadrados, em relação à quantidade de DNA extraído da amostra, em ng.

4.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO

Foi avaliada a interferência dos pós reveladores na amplificação a partir de ensaios com os três pós reveladores, os pós SilkBlack®, Magnuclei® e Xadrez®. Os resultados da quantificação de DNA para cada amostra estão disposto na Figura 07.

Os resultados obtidos mostraram que todos os pós reveladores testados apresentaram um efeito significativo de inibição sobre a reação de PCR. O pó Xadrez®, na concentração de 5mg/ml, inibiu totalmente a reação de PCR e fez com que nenhum DNA fosse detectado na amostra. Os outros dois reveladores não apresentaram um efeito tão intenso, porém ainda muito relevante.

A intensidade da inibição foi um pouco mais baixa nas menores concentrações, porém não foi observado um efeito concentração-dependente muito característico. Nos três reveladores analisados, o efeito da inibição foi muito forte mesmo em concentrações muito baixas. Esses resultados mostraram que os pós reveladores quando adicionados diretamente às amostras comprometem a amplificação de DNA.

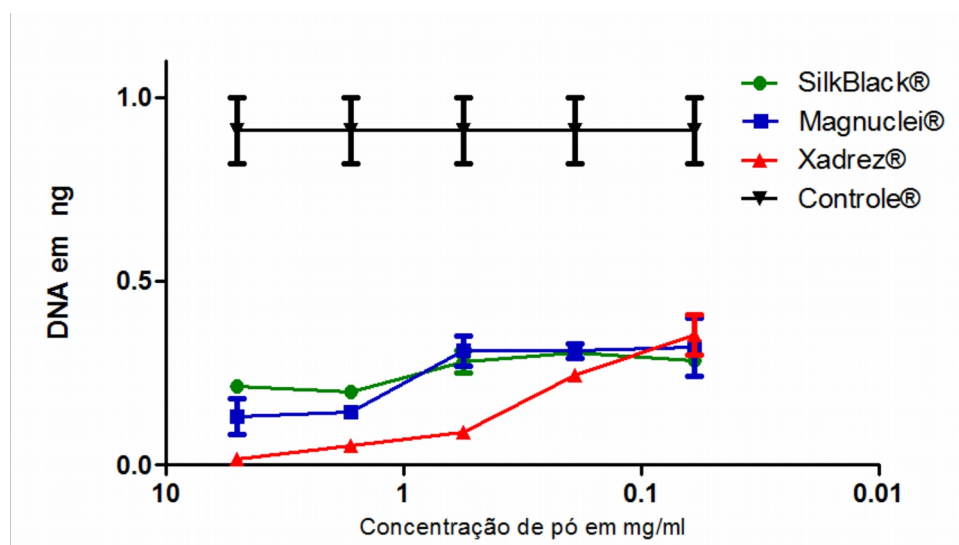


Figura 07: Quantidade de DNA recuperado de cada amostra com as diferentes concentrações de pós reveladores.

4.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS A ETAPA DE EXTRAÇÃO

Este experimento avaliou o quanto o procedimento de extração é capaz de atenuar o efeito inibitório dos pós reveladores sobre a PCR observado anteriormente. Para tanto, as mesmas amostras que foram utilizadas no experimento anterior foram submetidas a uma extração orgânica de DNA pelo método de fenol-clorofórmio. A seguir, a solução resultante do procedimento de extração foi submetida novamente à reação de PCR em tempo real para a medida da quantidade de DNA observada nas amostras. Os resultados obtidos estão na Figura 08.

Os resultados obtidos mostraram que houve uma melhora na quantidade de DNA recuperado nas amostras após a extração de DNA. Esse efeito foi observado principalmente nas concentrações mais baixas dos pós reveladores, onde o pó magnético Magnuclei® praticamente não exibiu nenhum efeito de inibição quando comparado ao controle. Os outros tipos de pó também apresentaram um efeito menor de inibição após a extração de DNA.

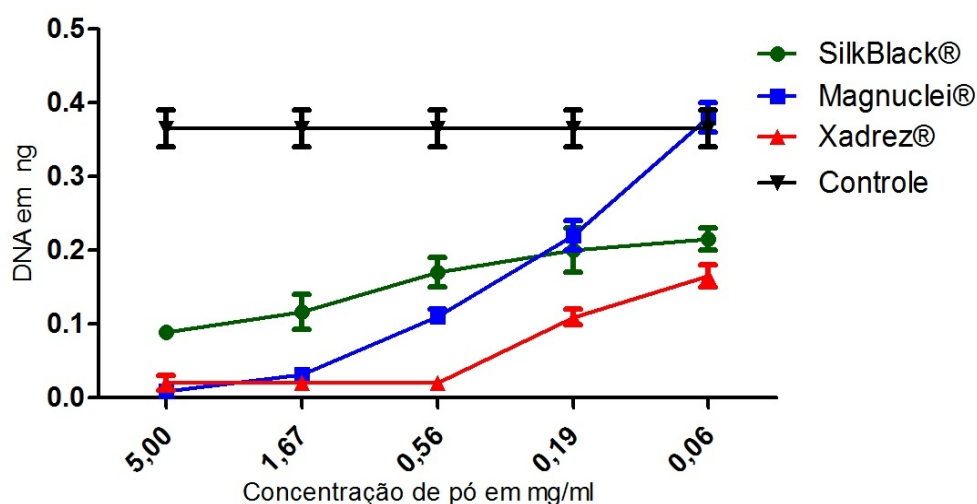


Figura 08: Quantidade de DNA recuperado de cada amostra com as diferentes concentrações de pós reveladores após a extração fenol-clorofórmio.

Foi possível também observar uma melhora na curva de inibição concentração-dependente, onde nas concentrações intermediárias já foi observada uma diminuição significativa na inibição. O pó magnético Magnuclei® foi o que apresentou a maior amplitude de variação, saindo da inibição quase total na concentração de 5mg/ml até a

ausência de inibição na concentração de 0,06mg/ml. Por outro lado, o pó SilkBlack® mostrou uma pequena diferença no resultado de inibição entre as concentrações final e inicial. O pó Xadrez® apresentou um comportamento intermediário entre os dois anteriores.

Apesar do procedimento de extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio diminuir o efeito inibitório dos pós reveladores sobre a reação de PCR, esse efeito ainda foi observado de forma significativa, especialmente nas amostras com concentrações maiores de reveladores.

4.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS UMA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

Como a extração orgânica sozinha não foi suficiente para reduzir o efeito inibidor dos pós reveladores sobre a reação de PCR, as amostras do experimento anterior foram submetidas a um protocolo de purificação de DNA utilizando a resina sintética Purelink®, com a finalidade de retirar ao máximo as substâncias interferentes. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 09.

Os resultados obtidos mostraram uma leve redução no efeito inibitório dos reveladores, porém nenhuma redução de grande magnitude. A curva de inibição do pó magnético Magnuclei® foi muito semelhante à do experimento anterior, somente com a etapa de extração. A curva do pó SilkBlack® apresentou o melhor resultado em relação ao anterior, onde em baixas concentrações o efeito de inibição foi praticamente suprimido. Nas concentrações intermediárias, os resultados foram os melhores. A curva do pó Xadrez® não apresentou uma grande melhora como um todo, porém na concentração mais baixa de 0,06mg/ml o resultado apresentou uma melhora muito significativa. É possível que, em menores concentrações, o efeito de inibição fosse totalmente suprimido.

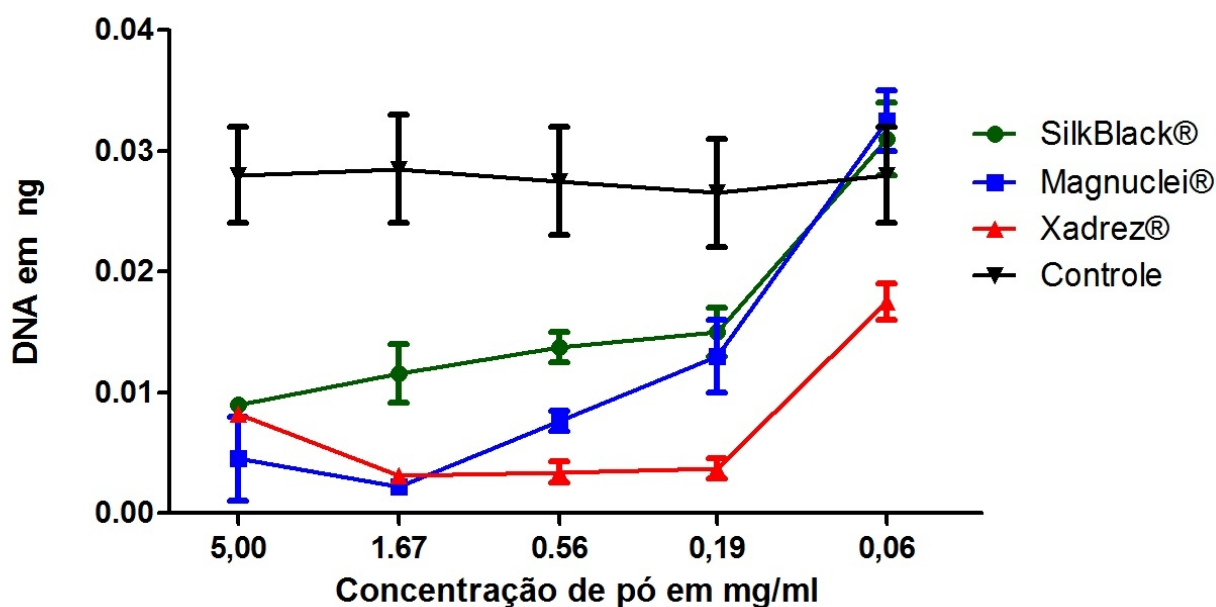


Figura 09: Quantidade de DNA recuperado de cada amostra com as diferentes concentrações de pó reveladores após a purificação com resina Purelink®. Análise realizada em triplicata.

A etapa de purificação proporcionou uma melhora geral no resultado, especialmente quando consideramos as menores concentrações de reveladores. A inibição observada na concentração mais baixa dos pós SilkBlack® e Magnuclei® foi praticamente eliminada e reduzida consideravelmente no pó Xadrez®.

4.6 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COLETA NA QUANTIDADE DE DNA RECUPERADO DE IMPRESSÕES LATENTES

Após as análises visando a utilização dos pós reveladores como indicadores das melhores regiões para a coleta de DNA, foram comparados três métodos distintos de coleta do material depositado pelo contato: coleta com suabes úmidos, com suabes secos, e pela técnica de *double swabbing*.

As amostras foram impressões palmares em uma superfície de vidro limpa dividida em quatro quadrantes e em cada um deles foi utilizado um método de coleta diferente. O experimento foi realizado em triplicata, as impressões foram reveladas utilizando o pó SilkBlack® e os quadrantes foram rotacionados entre as diferentes impressões para evitar qualquer diferença entre as regiões da palma da mão que produziram a impressão. Os resultados obtidos na PCR tempo real são mostrados na Figura 10.

A quantidade de DNA extraído utilizando os métodos de suabe seco (0,126ng de DNA) e *double swabbing* (0,114ng) foi praticamente a mesma. Porém, a quantidade de DNA extraído utilizando a coleta com suabe úmido foi muito menor do que as outras (0,062ng), diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Este resultado mostrou que coletar material depositado pelo contato utilizando um suabe seco ou a técnica de *double swabbing* recupera praticamente duas vezes mais DNA do que ao se fazer a coleta utilizando um suabe úmido.

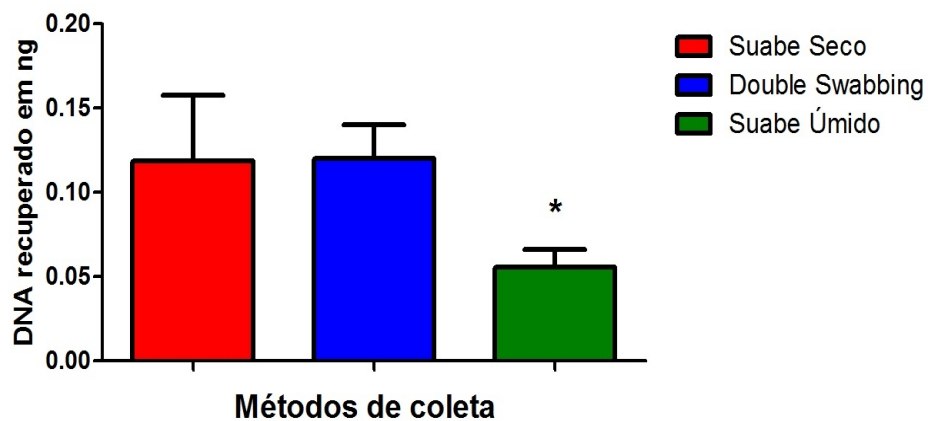


Figura 10: Quantidade de DNA extraído para cada método de coleta utilizado. Análise realizada em triplicata.

4.7 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Foram comparados três métodos de extração de DNA: um método tradicional de extração orgânica por fenol-clorofórmio e dois métodos comerciais das marcas Invitrogen® e Promega®. As amostras foram coletadas a partir de impressões palmares feitas na placa de vidro e reveladas com o pó Xadrez®. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 11.

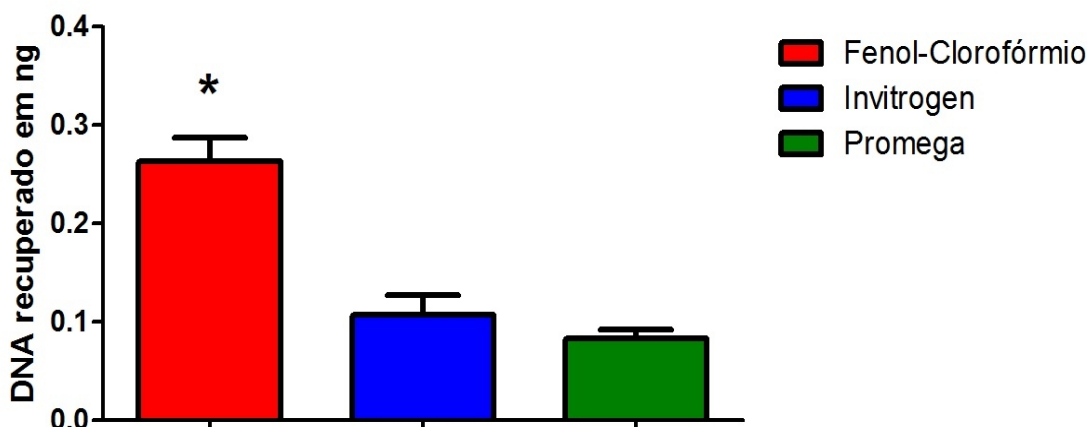


Figura 11: Quantidade de DNA recuperado em amostras com pó revelador utilizando três diferentes metodologias de extração.

Na comparação entre os métodos de extração propriamente ditos, a extração orgânica com fenol clorofórmio apresentou uma quantidade de DNA (0,263ng) significativamente maior ($p < 0,05$) do que os métodos comerciais da Invitrogen® e Promega® (0,107ng e 0,083ng, respectivamente). A diferença entre os dois métodos comerciais não foi estatisticamente significativa.

Este resultado mostrou que o método tradicional de extração orgânica por fenol-clorofórmio ainda é o que resulta em uma maior quantidade de DNA extraído em comparação com os métodos comerciais. Além disso, a redução da quantidade de DNA recuperada é ainda mais drástica quando comparada com a amostra cuja impressão não foi revelada com o pó xadrez.

Como esperado, a maior quantidade de DNA extraído foi observada nas amostras em que não foi aplicado o pó revelador (0,540ng). Esse resultado corrobora os anteriores no sentido que os pós reveladores, em especial o pó xadrez, prejudica consideravelmente a quantidade de DNA amplificado.

4.8 PESQUISA DE MATERIAL GENÉTICO EM CINCO OBJETOS DIFERENTES

Este experimento teve como finalidade avaliar a metodologia de coleta e extração de amostras de *touch DNA* utilizando cinco objetos de interesse forense: arma de fogo,

cartucho de munição percutida, faca de cozinha, volante de veículo e alavanca de câmbio de um veículo.

A Figura 12 apresenta os resultados relativo a média da concentração de DNA obtido nos cinco objetos, listados anteriormente, em três dias diferentes. Essas amostras foram coletadas após a revelação de impressões latentes com pó SilkBlack® utilizando a técnica de *double swabbing*. Em todos os objetos testados, foi possível recuperar DNA. No cartucho de munição, faca de cozinha, alavanca de câmbio e arma de fogo a quantidade coletada foi relativamente pequena, porém nos volantes dos veículos a quantidade de DNA extraído foi satisfatória.

O objeto que apresentou a maior quantidade de DNA foi o volante de veículo (0,156ng). Esse valor foi estatisticamente significativo em relação a todos os outros objetos testados ($p < 0,05$). Por outro lado, os cartuchos de munição apresentaram a menor quantidade de DNA extraído, 0,003ng de DNA, em média, significativamente menor que todos os outros objetos testados ($p < 0,05$).

A arma de fogo, a alavanca de câmbio e a faca de cozinha apresentaram valores intermediários, menores do que o volante dos veículos e maiores do que os cartuchos de munição (0,035ng, 0,018ng e 0,009ng de DNA, respectivamente). Entre esses três objetos não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Com a finalidade de comparar se a diferença entre o material depositado pelos indivíduos era relevante e poderia comprometer a análise, os resultados deste experimento foram agrupados conforme os indivíduos que produziram as amostras, para verificar se haviam diferenças significativas entre eles. Os resultados estão dispostos na Figura 13. Nos resultados agrupados por doadores, não é possível observar diferença significativa entre eles. Embora o primeiro doador apresentou uma maior quantidade de DNA recuperado (0,05ng), a diferença não foi estatisticamente significativa (0,035ng e 0,033ng).

Os resultados também foram agrupados conforme os diferentes dias de coleta, para avaliar se a ordem dos dias em que o material foi coletado apresentava alguma influência na quantidade de DNA recuperado. Os resultados estão dispostos na Figura 14. Assim como no resultado anterior, a ordem em que o material foi coletado não apresentou nenhuma influência no resultado, uma vez que não houve diferença significativa entre os três dias diferentes de coleta (0,030ng, 0,030ng e 0,032ng).

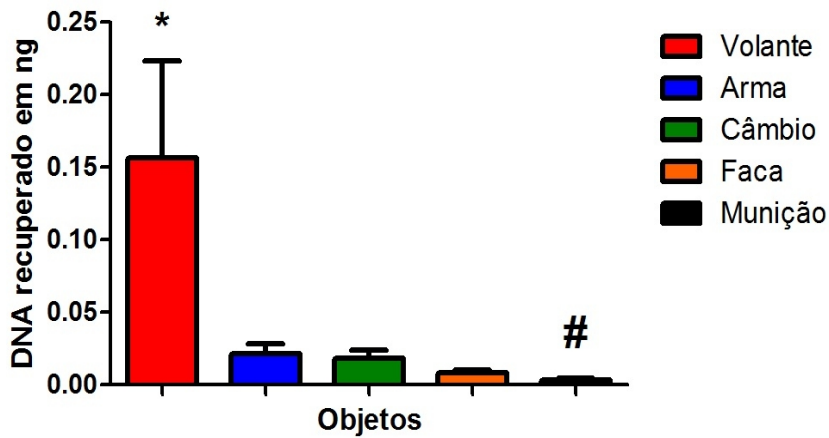


Figura 12: Quantidade de DNA extraído a partir de cada um dos diferentes objetos testados.

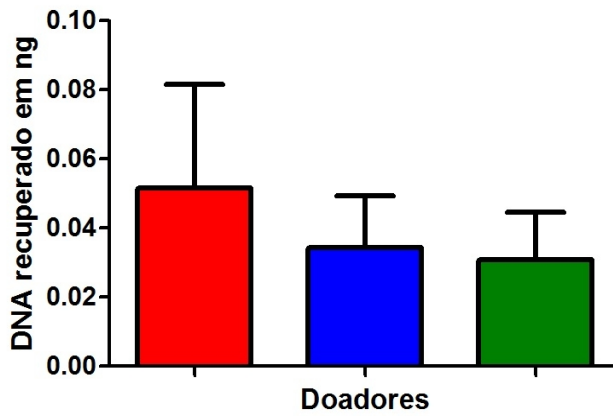


Figura 13: Quantidade de DNA extraído a partir de cada um dos diferentes objetos testados agrupados conforme os doadores.

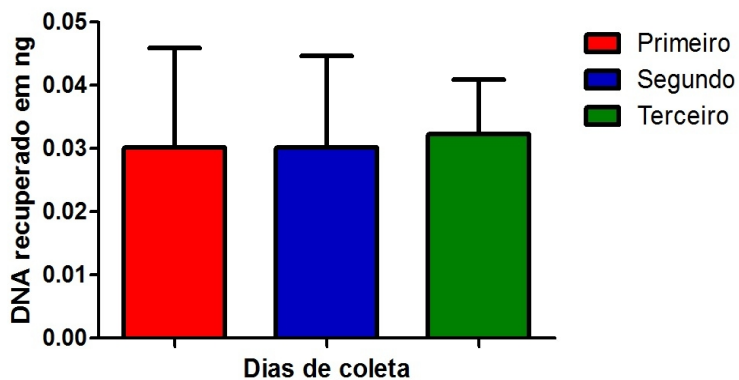


Figura 14: Quantidade de DNA extraído a partir de cada um dos diferentes objetos testados agrupados conforme dias de coleta.

4.9 OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE AMOSTRAS COLETADAS

A fim de validar os resultados do experimento anterior e confirmar que a quantidade de DNA extraída dos objetos é suficiente para se obter perfis genéticos, 15 amostras foram selecionadas para serem genotipadas. As amostras foram escolhidas de forma a representar os diferentes objetos que foram avaliados e distribuídas em uma faixa ampla de concentração de DNA.

As 15 amostras selecionadas, o objeto de onde foram coletadas, a ordem do dia em que foram coletas, o resultado da quantificação de DNA pela reação de PCR em tempo real e o número de marcadores observados no perfil genético obtido, estão dispostos na Tabela 01. De uma forma geral, os resultados observados nos perfis genéticos foram coerentes com a quantificação de DNA. Perfis genéticos completos foram observados em sete das 15 amostras analisadas, cujas concentrações de DNA variaram entre 0,430ng e 0,032ng. Apenas uma amostra não teve nenhum dos 23 marcadores amplificados. Para as cinco amostras com concentração mais baixa de DNA (de 0,008ng a 0,001ng) foram obtidos perfis com pequeno número de marcadores, insuficientes para realizar um exame genético.

Considerando os perfis com mais de 19 marcadores com qualidade suficiente para realizar uma comparação genética, foram observados ao menos um representante das amostras provenientes de volante de veículo, arma de fogo, faca de cozinha e alavanca de câmbio. O cartucho de munição não apresentou nenhuma amostra com um perfil genético com qualidade suficiente para uma análise genética.

Por outro lado, se considerarmos perfis com menos de 10 marcadores como insuficientes para realizar uma comparação genética, podemos observar a ocorrência de exemplos de amostras de cartucho de munição, arma de fogo e faca de cozinha. Todos os exemplos de amostras de volante de veículo e alavancas de câmbio apresentaram resultados suficientes para uma análise genética.

Tabela 01: Quantidade de marcadores genéticos observados nos perfis das diferentes amostras obtidas de diferentes objetos em diferentes dias de coleta e com diferentes quantidades de DNA.

Amostra	Objeto	Dia de coleta	Quantidade de DNA (ng/ul)	Número de marcadores amplificados
01	Volante	01	0,430	23
02	Arma	02	0,300	23
03	Volante	01	0,230	23
04	Câmbio	02	0,160	23
05	Faca	03	0,099	22
06	Câmbio	01	0,082	23
07	Câmbio	03	0,064	19
08	Arma	02	0,042	23
09	Faca	01	0,037	20
10	Volante	01	0,032	23
11	Faca	01	0,008	09
12	Cartucho	02	0,004	05
13	Arma	01	0,003	04
14	Cartucho	03	0,002	00
15	Cartucho	01	0,001	07

Um exemplo de perfil genético completo pode ser visto na figura 15 A. Este é o eletroferograma da amostra 01, cuja concentração de DNA foi de 0,430ng e onde houve produto de amplificação em todos os 23 marcadores analisados. Na figura 15 B está o eletroferograma da amostra 15, cuja concentração de DNA foi de 0,001ng e foi obtido um perfil parcial com sete marcadores.



Figura 15: Eletroferograma da (A) amostra 01, 0,430ng de DNA e perfil completo com todos os 23 marcadores; (B) amostra 15, 0,001ng de DNA e perfil parcial composto por sete dos 23 marcadores analisados.

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver protocolos e metodologia para a pesquisa de DNA em amostras relacionadas à ocorrências de natureza criminal contendo material biológico deixado por contato, o *touch DNA*. Por isso, foi avaliada uma série de parâmetros a partir de experimentos especialmente desenvolvidos para esse fim. Espera-se que os protocolos aqui utilizados possam ser empregados na rotina das investigações criminais.

5.1 QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO A PARTIR DAS IMPRESSÕES LATENTES

O objetivo deste experimento foi compreender melhor como funciona a dinâmica do material biológico depositado após o contato com as mãos. Em 1997 surgiu o primeiro trabalho descrevendo que objetos tocados por mãos poderiam ser fontes de um exame de DNA (17). Desde então, diversos outros trabalhos descreveram vários objetos que poderiam ser utilizados para a pesquisa de DNA deixado por contato, como por exemplo armas de fogo, cartuchos de munição, documentos e impressões digitais (18), (19) e (20). Inclusive, vários casos criminais resolvidos a partir de amostras de *touch DNA* foram descritos na literatura (21), (22).

O fundamento da revelação de impressões digitais é a aderência mecânica de pós reveladores no material úmido e oleoso deixado pelo contato com a pele. Essa aderência de material acaba formando padrões morfológicos únicos para cada indivíduo e são utilizados com a finalidade de identificação. Contudo, nem sempre o contato da pele com uma superfície deixa um padrão morfológicamente possível de ser comparado. Em muitos dos casos, os pontos característicos deixados acabam se revelando borrados e danificados, impedindo a identificação morfológica (23).

O mesmo contato que produz um padrão morfológico acaba também depositando células que descamam das camadas mais superficiais da epiderme (24). O objetivo de utilizar os pós reveladores de papiloscopia é justamente identificar as regiões de um objeto ou superfície que foram manipuladas por um indivíduo. Caso a impressão não

esteja com qualidade suficiente para comparação, a coleta do material celular depositado pode ser utilizada para a pesquisa de DNA (25).

Os resultados deste experimento mostraram que a aderência do pó revelador é maior quando a impressão é produzida pela polpa digital do polegar, em relação ao dedo indicador e à palma da mão. A polpa digital é uma região da pele mais rica em glândulas sebáceas, enquanto que outras regiões apresentam uma maior quantidade de células queratinosas. A maior quantidade de pó aderido pode estar relacionada também a um maior potencial de recuperação de DNA (13).

O trabalho de Thomas *et al.*, 2013 (26), já havia observado diferenças na quantidade de DNA recuperado a partir de impressões produzidas por dedos diferentes. Naquele caso, impressões produzidas pelo dedo indicador recuperaram mais material do que as produzidas pelos dedos médios e anelares. É muito provável que regiões mais sensíveis da pele, que apresentem um maior número de glândulas e receptores sejam também melhores para obtenção de DNA.

O resultado foi importante também para mostrar que não necessariamente a coleta de uma região muito grande tem o potencial de recuperar uma maior quantidade de material biológico. Inclusive já foi descrito na literatura que a coleta de regiões muito grandes pode acabar apenas “espalhando” o material por toda a superfície ao invés de recuperá-lo (25). A aderência de uma maior quantidade de pó revelador pode ser um bom indício de que aquele sítio apresente um bom potencial para coleta de DNA. Portanto, se for possível identificar morfológicamente a região que produziu a impressão latente, é mais interessante coletar as impressões produzidas por regiões mais ricas em material, como a polpa digital, por exemplo.

5.2 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE PÓ RECUPERADO E A QUANTIDADE DE DNA EXTRAÍDO

Este experimento teve como objetivo estabelecer a correlação entre a quantidade de pó aderido e a quantidade de DNA recuperado. A coleta de impressões produzidas de forma aleatória foi importante para produzir um universo de amostras com graus variados de aderência de pó e também para procurar simular como o contato é efetuado no cotidiano.

O resultado do experimento anterior mostrou que as impressões produzidas por diferentes regiões da mão possuem diferentes graus de aderência de material, independentemente do tamanho da impressão reduzida. O fato de se observar nesse experimento que a área das impressões guardava uma forte correlação com a quantidade de pó aderido mostrou que quando as impressões são produzidas de forma aleatória e desorganizada, o efeito da região da mão que produziu a impressão é minimizado. A observação de correlação entre a quantidade de pó aderido e a quantidade de DNA recuperado confirmou as expectativas de que esse tipo de material pode ser utilizado como um revelador das melhores regiões para coleta de DNA.

Quando a impressão é produzida de forma desordenada, com grau de pressão variado, simulando borrões e arrastamentos, a quantidade de DNA passa a ser mais dependente da quantidade de pó aderido do que da região que produziu a impressão. Dessa forma, podemos dizer que quando uma revelação produz um padrão desordenado de contato, as regiões onde houver maior aderência de pó revelador são as mais propensas a possuir material biológico para análise.

Este resultado é muito conveniente, pois esse tipo de impressão é justamente o maior potencial da pesquisa de DNA forense em material de contato. Quando as impressões estão bem definidas, a comparação morfológica tradicional é a maneira mais barata e eficiente de se obter informação de um vestígio. Porém, nos casos de impressões borradas e arrastadas, o DNA pode ser uma ferramenta útil de identificação. Inclusive, nos casos onde há um contato com maior pressão e arrastamento, a tendência é que mais células se desprendam da epiderme e, portanto, mais DNA possa ser recuperado (27).

5.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO

Uma vez que a utilidade da utilização de pós reveladores como ferramentas de eleição das regiões para coleta de DNA foi demonstrada, o desafio seguinte era encontrar uma maneira de trabalhar com esse material de forma a não prejudicar os procedimentos laboratoriais. Na literatura, está extensamente descrito que os pós reveladores de impressões digitais latentes diminuem e até eliminam completamente a possibilidade de

se recuperar DNA a partir de uma amostra (25), (28).

Para determinar a extensão desse efeito nas técnicas forenses utilizadas atualmente, foram testados três tipos de pós reveladores utilizados comumente na rotina forense. O pó BlackSilk® foi escolhido por ser um pó multiuso, empregado na rotina para a grande maioria dos casos. O pó magnético Magnuclei® foi escolhido principalmente por uma característica importante: na sua aplicação não há contato físico entre o pincel aplicador e a superfície, o que é um ponto muito importante do ponto de vista da contaminação das amostras. O pó Xadrez® representou a escolha de uma alternativa caseira aos anteriores, de baixo custo porém um composto que não possui uma composição química claramente definida.

Os resultados, de uma forma geral, confirmaram o que já havia sido descrito na literatura (28). A adição direta dos pós reveladores sobre uma solução de DNA comprometeu significativamente a reação de PCR quantitativa. O efeito foi observado para todos os reveladores e de uma forma mais ou menos constante em todas as concentrações. Esse resultado sugere que o efeito inibidor desses compostos não é concentração-dependente.

Esse resultado também não foi surpreendente considerando a natureza dos compostos. Várias de suas características, como, por exemplo, o fato de serem hidrofóbicos, possuírem diversos minerais em sua composição, serem formados por partículas finas insolúveis e serem ricos em pigmentos, sinalizavam que esses materiais comprometeriam as reações de biologia molecular.

5.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS A ETAPA DE EXTRAÇÃO

A etapa de extração é fundamental na rotina de um laboratório de DNA forense. Os dois principais objetivos durante a extração são a liberação em solução do material genético do interior da célula e a retirada de substâncias exógenas que possam interferir nas etapas posteriores da análise de DNA, como por exemplo inibir a reação de PCR (29).

Remover possíveis inibidores da reação de PCR deve ser uma das principais preocupações durante a etapa de extração. A presença de inibidores, mesmo em

pequenas quantidades, pode comprometer o resultado devido às características desse tipo de amostra. Os métodos de extração devem ser considerados sob os dois pontos de vista, da quantidade de DNA extraída, da qualidade e da presença de inibidores (25).

O resultado deste experimento mostrou a importância da etapa de extração na análise de DNA. Todos os pós reveladores testados apresentaram uma redução na inibição da reação de PCR quantitativa. A redução foi mais evidente nas concentrações mais baixas, mas também pode ser observada mesmo nas concentrações mais altas.

A curva de inibição do pó magnético Magnuclei® apresentou um padrão concentração-dependente que mostrou que a inibição da reação de PCR é totalmente dependente da concentração de pó presente na solução. Nas concentrações mais baixas o efeito inibitório foi bastante reduzido, o que permite concluir que nessas concentrações é viável a obtenção de DNA a partir de amostras contendo o pó magnético sem prejuízo do resultado.

Uma consideração importante é que aproximadamente metade das amostras analisadas no experimento 4.2 apresentaram uma quantidade de pó recuperado abaixo de 0,5mg, ponto a partir de onde os efeitos inibitórios foram bastante reduzidos. Portanto, amostras coletadas com menor quantidade de pó revelador aderido possuem um maior potencial para análise de DNA. Caso não seja possível coletar sem adicionar uma grande quantidade de pó revelador, uma solução possível para esses casos seria eluir a amostra em uma quantidade maior de solução durante a extração, para que a concentração de pó não atinja níveis muito altos.

O pó BlackSilk® e pó Xadrez® apresentaram resultados semelhantes, porém com um valor de inibição bem maior do que o pó magnético Magnuclei®. O pó BlackSilk® apresentou uma inibição relativamente constante ao longo das diferentes concentrações, sugerindo que algum componente do pó estaria inibindo a reação de PCR quantitativa de forma não específica, e a etapa de extração não teria sido suficiente para eliminá-lo. Contudo, os valores de inibição observados foram intermediários, não impossibilitando o emprego do pó BlackSilk® nesse tipo de amostra.

O pó Xadrez® foi aquele com o resultado geral de inibição mais significativo. De certa forma esse resultado não é surpreendente uma vez que esse material não é de emprego específico para essa finalidade, e em sua composição estão presentes diversos componentes inclusive uma quantidade muito grande de pigmentos, que classicamente tem sido associados à inibição da reação de PCR (30). Contudo, na concentração mais baixa de pó houve uma mudança na tendência da curva, com uma redução significativa

da inibição. Isso sugere que a curva de inibição concentração-dependente deste composto se apresente em concentrações menores do que as analisadas. De qualquer forma, o resultado permite concluir que o pó Xadrez® pode ser utilizado na análise desse tipo de amostra, desde que não esteja em concentrações muito altas.

5.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DOS PÓS REVELADORES NA AMPLIFICAÇÃO APÓS UMA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

Com o objetivo de eliminar o efeito inibidor dos pós reveladores observado mesmo após a etapa de extração, as amostras foram submetidas a um protocolo de purificação de DNA específico para amostras forenses utilizando um kit comercial Purelink®. Técnicas de purificação são amplamente utilizadas na rotina de um laboratório forense, especialmente quando as amostras analisadas são consideradas de alta complexidade e propensas à presença de grande quantidade de substâncias inibidoras da reação de PCR, como amostras de solo, dentes, ossos e outros restos mortais (31), (32).

No casos de amostras de *touch DNA* tratadas com pós reveladores, o efeito inibidor dos reveladores sobre a reação de PCR é o principal efeito limitador do seu emprego nos exames de rotina (28). Portanto, a utilização de alguma técnica de purificação é mais do que justificada nesses casos.

O resultado mostrou uma ligeira diminuição no efeito inibidor dos reveladores, embora essa redução não tenha sido de grande relevância. Apenas em alguns pontos específicos o resultado observado foi significativo.

O pó magnético Magnuclei® apresentou um padrão muito parecido com o obtido apenas com a etapa de extração, em que o efeito inibidor praticamente desapareceu na concentração mais baixa. O pó Xadrez® também não apresentou uma melhora muito significativa, apesar de que o efeito inibitório começou a se reduzir já na penúltima concentração. Nas outras concentrações, a inibição continuou significativa. Esses resultados mostram que os componentes químicos presentes nesses reveladores praticamente não foram eliminados utilizando essa técnica de purificação.

Contudo, o resultado do pó Silkblack® foi mais interessante. Podemos observar claramente uma redução na inibição, principalmente na concentração mais baixa onde o efeito foi praticamente suprimido. De uma forma geral, o padrão de inibição ficou muito

parecido com o do pó magnético Magnuclei®, sendo que os resultados são até melhores nas concentrações mais altas. Esse resultado é muito importante, pois o pó Silkblack® é o mais utilizado na rotina de análises forenses do que o pó magnético Magnuclei® devido a sua praticidade e bons resultados. Podemos concluir que após uma etapa adicional de purificação, os resultados de inibição desses dois reveladores são muito semelhantes.

5.6 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COLETA NA QUANTIDADE DE DNA RECUPERADO DE IMPRESSÕES LATENTES

Não há dúvidas que a coleta de vestígios representa etapa fundamental no fluxo de um exame de DNA. Uma coleta bem feita aumenta em muito a possibilidade de sucesso de um exame, enquanto que uma coleta deficiente dificilmente apresentará resultados satisfatórios. A maioria das amostras de *touch DNA* são coletadas com suabes. A técnica mais tradicional consiste em aplicar o suabe umedecido sobre uma superfície, aplicando pressão e rotacionando a haste com o objetivo de retirar o maior número de células da superfície. Contudo, a aplicação de um suabe úmido pode não ser suficiente para retirar todo o material celular presente na área coletada (25).

Alternativas ao método de coleta utilizando o suabe úmido seriam a coleta com o suabe seco e a técnica de *double swabbing*. O princípio de se utilizar um suabe seco seria aproveitar a umidade original presente no vestígio a ser coletado, evitando adicionar um volume de líquido que poderia aumentar o espalhamento das células nas superfícies e diminuir a quantidade de material aderido no algodão do suabe (26).

A técnica de *double swabbing* tem sido descrita como a melhor para coleta de DNA forense em geral. Ela consiste em umedecer um suabe com água, realizar a coleta em determinada superfície e em seguida utilizar um segundo suabe seco para recuperar o resíduo úmido deixado na mesma região, juntamente com as células que são o objeto de interesse. Esse método foi descrito como o mais eficiente para a coleta de amostras de *touch DNA* (33).

O resultado observado nesse experimento foi de certa forma surpreendente, no sentido que nas amostras coletadas com o suabe seco, a quantidade de DNA recuperado foi semelhante à quantidade obtida das amostras coletadas pela técnica de *double swabbing* e maiores do que das coletadas com suabe úmido. A técnica de suabe úmido é

a tradicionalmente mais utilizada, e embora o *double swabbing* tenha se mostrado mais eficiente, teoricamente ainda mostraria resultados superiores do que com suabes secos (25).

Possíveis explicações para esse resultado podem estar relacionadas com a natureza das amostras de *touch DNA*. A utilização de um suabe úmido talvez seja a mais interessante pois de forma geral a grande maioria das amostras coletadas para exames de DNA sejam de fluídos biológicos, como sangue e saliva, por exemplo, e na grande parte desses casos essas amostras se encontram secas quando do momento de coleta. Dessa forma, a umidade adicionada contribuiria para desprender as células da superfície e aderi-las ao suabe (26).

Já no caso de amostras de *touch DNA* recém produzidas, como foram as condições realizadas neste experimento, é possível que a umidade natural deixada pelo contato com a pele, juntamente com os ácidos graxos depositados, seja um meio eficiente para a coleta das células pelo algodão do suabe. Umedecer o suabe acabaria acrescentando umidade desnecessária que estaria dificultando a aderência de células no algodão do suabe.

Para reforçar essa teoria, os resultados de Thomasma *et al.*, 2013, fornecem informações interessantes. Neste estudo, amostras coletadas com suabes secos após uma primeira passagem com suabes úmidos forneceram perfis genéticos adicionais aos da primeira coleta úmida. Embora este trabalho não tenha avaliado os métodos isoladamente, seus resultados sugerem que para amostras de *touch DNA*, a passagem de um suabe seco pode trazer vantagens em relação ao suabe úmido.

De qualquer forma, a técnica de *double swabbing* deve ser utilizada preferencialmente na análise deste tipo de amostras, pois na teoria une as vantagens de ambas as técnicas de coleta utilizando suabes secos e úmidos. Os resultados comprovaram esta vantagem na prática, embora os resultados tenham sido semelhantes aos obtidos com os suabes secos.

Adicionalmente, extrapolando esses resultados para condições reais de coleta de DNA forense, é muito provável que no tempo decorrido entre a deposição do *touch DNA* e a coleta do material pelo serviço de perícia criminal a umidade presente naturalmente nas amostras seja perdida e o resultado da coleta com suabes secos acabe comprometido. Portanto, realizar a coleta de amostras contendo *touch DNA* com a técnica de *double swabbing* é a forma mais adequada do ponto de vista da recuperação de DNA.

5.7 AVALIAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM RELAÇÃO A QUANTIDADE DE DNA RECUPERADA

Como anteriormente já discutido, a etapa de extração é fundamental na análise de DNA forense, especialmente nos casos de amostras complexas e de alto grau de dificuldade (34). O protocolo de extração mais utilizado na rotina de um laboratório de DNA forense é o de extração orgânica fenol-clorofórmio, devido à grande quantidade de DNA recuperada ao final do procedimento. Tal é a eficiência da técnica que ela é comumente referida como padrão ouro para extração de DNA forense (35). Contudo, essa técnica também apresenta algumas desvantagens, por ser trabalhosa e demorada e utilizar reagentes que representam um risco de saúde ocupacional aos manipuladores (29).

Recentemente diversos kits comerciais de extração de DNA tem sido lançados no mercado, com a promessa de extraírem quantidades de DNA semelhantes à do método de fenol-clorofórmio, porém com as vantagens de não trabalhar com reagentes tóxicos, produzirem um produto final mais limpo de impurezas e a possibilidade de emprego junto à plataformas de automação (30). Principalmente devido à característica de produzirem um produto mais limpo e livre de impurezas, a avaliação de métodos de extração comerciais representava uma alternativa a ser considerada.

Os resultados obtidos, porém, mostraram que os kits comerciais ainda estão longe de apresentar o rendimento obtido com o protocolo tradicional de extração orgânica. A quantidade de DNA obtida em ambos os testes foi significativamente menor do que na extração orgânica. Aparentemente, o menor rendimento final de DNA é crítico em situações onde a quantidade de material genético inicial é pequena, característica típica das amostras de *touch DNA*. Em amostras tradicionais, de referência, com uma grande quantidade de material genético disponível, métodos mais modernos podem apresentar vantagens adicionais, mas nos casos de *touch DNA*, essas vantagens parecem não compensar o baixo rendimento da extração de DNA.

Com o desenvolvimento da tecnologia relacionada à extração automatizada de DNA, é possível que seja observado um progresso na qualidade e rendimento das extrações promovidas por kits comerciais. Fabricantes tem prometido novos produtos capazes de retornar resultados tão bons ou melhores do que os obtidos com a extração orgânica fenol-clorofórmio tradicional, inclusive para amostras especificamente de *touch*

DNA (35). Caso essa evolução nos kits de extração comerciais se confirmem, esses produtos poderão ser alternativas interessantes, embora pelo menos a princípio a tradicional extração orgânica por fenol-clorofórmio se apresente ainda sem concorrentes.

5.8 PESQUISA DE MATERIAL GENÉTICO EM CINCO OBJETOS DIFERENTES

O resultado da pesquisa de *touch DNA* recuperado a partir de cinco distintos objetos forneceu informações importantes sobre a utilização na prática de todas as técnicas analisadas anteriormente. Em primeiro lugar, o resultado mais importante foi que a maioria das amostras apresentam o potencial de fornecerem DNA em quantidade e qualidade suficientes para a obtenção de um perfil genético.

As amostras coletadas dos volantes dos veículos foram as que apresentaram a maior quantidade de DNA recuperado, quantidade essa mais do que suficiente para produzirem perfis de qualidade. Por outro lado, a média de DNA recuperado das amostras de cartuchos de munição foi muito baixa, abaixo da quantidade necessária para essa finalidade.

Os outros três objetos obtiveram uma quantidade de DNA em uma faixa limítrofe entre a obtenção de perfis genéticos ou não. Na média, os resultados obtidos seriam suficientes para ao menos produzirem perfis genéticos parciais. Esse resultado foi mais do que esperado devido à natureza do material analisado. Praticamente todos os estudos publicados reportam dificuldades na obtenção de perfis genéticos a partir de amostras contendo *touch DNA* (27), (36), (33) e (18).

Todos os objetos testados apresentam uma correlação estreita com ocorrências de natureza criminal. A possibilidade de se obter perfis genéticos de quase todos eles abre uma nova perspectiva para a coleta de DNA em locais de crime, onde essas amostras passam a dividir a atenção com materiais tradicionalmente coletados.

Os volantes e alavancas de câmbio estão ligados a crimes relacionados com furto e roubo de veículos, além de ocorrências mais graves como sequestros e crimes sexuais. Principalmente quando consideramos os resultados dos volantes, a quantidade de DNA extraído foi suficiente para a obtenção de bons perfis genéticos. Devido ao volante ser o objeto analisado com a maior área de contato, é possível que o grande valor de material

genético recuperado tenha sido auxiliado pela estratégia de selecionar as regiões de contato utilizando os pós reveladores.

Uma consideração importante em relação a esses potenciais vestígios está no fato de que quando o veículo for conduzido regularmente pelo seu proprietário, este provavelmente depositará uma grande quantidade de material na sua superfície. Se o objetivo da pesquisa for encontrar o perfil genético de algum indivíduo que teve um contato eventual com o veículo, como um autor de furto, por exemplo, o condutor regular do veículo deve ser obrigatoriamente pesquisado e excluído do resultado obtido. Contudo, em diversas situações esse cuidado não é necessário pois o próprio autor é quem faz uso regular do veículo, em casos de sequestro e crimes sexuais, por exemplo.

Por outro lado, a arma de fogo e os cartuchos de munição são objetos de uso pessoal e raramente são compartilhados entre diversos indivíduos. Nesses materiais, portanto, um eventual perfil genético obtido muito provavelmente será do indivíduo que fez uso da arma de fogo, mesmo que esta possa estar registrada em nome de outra pessoa. A quantidade de DNA obtida da arma de fogo pode estar aumentada devido ao contato com a pele durante o porte regular, não necessariamente sendo resultado direto da manipulação. Porém, mesmo nesses casos, o uso do pó revelador é útil pois ele permanecerá aderido às regiões que entraram em contato com a pele independentemente de terem sido manipuladas com as mãos ou não. Os padrões morfológicos deixados pelas impressões digitais não são necessários para a pesquisa de DNA.

A quantidade muito baixa de DNA recuperado das amostras dos cartuchos de munição pode ser explicada pela pequena área desse material e pelo fato que eles são pouco manipulados, somente no momento do municiamento da arma de fogo. O trabalho de Horsman-Hall *et al.*, 2009 (18) demonstrou a dificuldade de se trabalhar com esse tipo de material. Mesmo quando foi pedido aos seus doadores que manipulassem os cartuchos por 30 segundos, um período muito maior do que eles seriam manipulados em condições reais, os perfis genéticos obtidos foram parciais, de baixa qualidade, resultando em média de 7 a 22% dos perfis genéticos originais. Os resultados obtidos não são muito diferentes do que os encontrados neste trabalho.

O resultado obtido da faca de cozinha apresenta uma peculiaridade interessante, já que a quantidade de DNA obtida foi razoável, e a faca foi o único objeto que não havia sido manipulado previamente, o contato com a pele foi de apenas cerca de poucos minutos antes da coleta. Dessa forma podemos concluir que mesmo objetos manipulados eventualmente podem ser fontes de coleta para *touch* DNA.

É possível que as diferenças na quantidade de DNA recuperado entre os diferentes objetos estejam também relacionadas com a natureza das superfícies em que foram realizadas as coletas. Amostras coletadas de superfícies de madeira tendem a apresentar mais DNA do que amostras coletadas de tecido e de vidro, por exemplo (27). Neste trabalho duas amostras foram de material sintético (volante e câmbio), uma de material plástico (faca), uma de material metálico (cartucho) e uma mista de material plástico e metálico (arma). A possibilidade que a natureza do material tenha uma influência maior na quantidade de DNA recuperado do que os outros parâmetros analisados deve ser considerada e melhor investigada por trabalhos futuros.

Diferenças na propensão de indivíduos depositarem material sobre superfícies foram descritas na literatura (27), (13) e (37). No presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas no agrupamento dos indivíduos que produziram as amostras. Isso foi importante para garantir que eventuais diferenças entre os indivíduos prejudicassem as análises. Por mais que houvesse um cuidado em produzir as amostras de uma forma padronizada, essa padronização nunca seria completamente perfeita, uma vez que seria virtualmente impossível reproduzir as mesmas condições em todas as situações.

O mesmo raciocínio cabe aos diferentes dias de coleta. Como no resultado agrupado por dias de coleta também não houve diferença significativa, podemos assumir que o período mínimo de 48 entre uma e outra coleta foi suficiente para repor todas as células epiteliais e depositar quantidades equivalentes de material.

5.9 PERFIS GENÉTICOS DE AMOSTRAS DE *TOUCH DNA*

A amplificação e genotipagem de uma parte das amostras permitiu validar as conclusões que foram tiradas a partir das análises dos resultados das quantificações. As quantificações foram usadas como método preferencial para as comparações devido a natureza quantitativa do seu resultado, permitindo análises e comparações mais adequadas. A técnica empregada de quantificação por PCR em tempo real foi fundamental para que houvesse confiabilidade dos resultados, pois a reação de PCR quantitativa possui as mesmas características da PCR utilizada para a genotipagem.

Porém, a obtenção de alguns dos perfis possibilitou tirar algumas conclusões

importantes, em especial relacionadas com a quantidade de DNA necessária para a obtenção de um perfil genético de qualidade. Historicamente, amostras com menos de 100 a 50pg de DNA tem sido consideradas como *low template*, ou seja, com uma quantidade abaixo da recomendável para a produção de perfis genéticos (38). Contudo, não há um valor limite para qual a quantificação de DNA seja suficiente para descartar uma amostra, já que mesmo amostras com resultado negativo na quantificação podem produzir perfis genéticos (25). Na faixa que varia entre 0 a 50 ou 100pg de DNA, o resultado da genotipagem é inesperado, podendo produzir um perfil satisfatório ou não, devido à ocorrência de efeitos estocásticos.

Como a média dos resultados das quantificações de todos os objetos, exceto os volantes de veículos, ficaram nessa faixa, a genotipagem de determinadas amostras forneceu informação importante sobre a aplicabilidade deste tipo de exame. E os resultados observados foram muito bons. Em todas as amostras com quantidade acima de 100pg foram obtidos perfis completos. Nas amostras entre 30 a 100pg foram observados perfis de boa qualidade, alguns completos. Nas amostras abaixo de 10pg foram observados apenas perfis parciais de baixa qualidade, um inclusive sem nenhum marcador amplificado.

Dessa forma, os resultados observados foram melhores do que os esperados, uma vez que todas as amostras com concentrações acima de 30pg produziram perfis de qualidade. Um ponto importante a ser considerado é o fato do kit de amplificação utilizado, PowerPlex® Fusion 23, ser de última geração e possuir uma sensibilidade acima dos kits normalmente utilizados pelos estudos da literatura. Contudo, no trabalho de Oostidik *et al.*, 2014 (39), este kit começou a produzir perfis parciais já na concentração de 50pg de DNA.

Talvez uma explicação para esse resultado esteja no fato desse kit possuir componentes especificamente desenhados para que seja diminuído o efeito inibidor sobre a reação de PCR (39). Embora os componentes do kit da reação de PCR quantitativa sejam também de boa qualidade, não foram desenvolvidos especificamente para essa finalidade. Dessa forma um componente da amostra que provoque um eventual efeito de inibição sobre a reação da PCR quantitativa poderia ser minimizado na reação de PCR para genotipagem, produzindo bons perfis em amostras cujos resultados da quantificação não foram tão bons.

De uma maneira geral, podemos dizer que todos os objetos analisados apresentam potencial para produzirem perfis de DNA. A exceção talvez sejam os

cartuchos de munição, porém mesmo um perfil parcial com nove marcadores, como foi observado na amostra de número 11, pode ser suficiente para se realizar um confronto genético. Assim a coleta de *touch DNA* constitui uma ferramenta inovadora e importante na genética forense.

5.10 CONSIDERAÇÕES EM RELAÇÃO À ANÁLISE DOS RESULTADOS

Alguns pontos importantes devem ser considerados no momento da análise dos resultados obtidos usando amostras de *touch DNA*. A análise desse tipo de amostra deve sempre ser acompanhada de um cuidado muito grande em relação à contaminação. A baixa quantidade de DNA presente nas amostras e a ausência de uma fonte de perfil genético dominante torna esse tipo de amostra muito propícia à contaminação por fontes externas. Dessa forma, os cuidados durante a coleta, transporte e armazenagem dessas amostras deve ser redobrado. Qualquer manipulação não essencial à realização dos exames deve ser evitada (25). Procedimentos como por exemplo a comparação dos resultados com os perfis dos servidores do laboratório e do serviço forense envolvidos na coleta das amostras, podem ser adotados como forma de evitar a liberação de um resultado proveniente de uma contaminação.

Além da contaminação, existe a possibilidade de que o DNA genotipado nessas amostras seja simplesmente de outro indivíduo não relacionado com a conduta criminosa, que participou da sua produção ou comercialização. Objetos do cotidiano não são isentos de DNA e a possibilidade de que um perfil genético identificado não seja de ninguém relacionado ao crime deve ser sempre considerada (40).

Uma outra possibilidade a ser considerada é a chance de o DNA obtido por contato ser na verdade proveniente de um outro indivíduo, com a transferência de material biológico ocorrido de forma indireta. Estudos posteriores nessa área ainda são necessários para compreender em quais circunstâncias esses eventos seriam observados, e em que magnitude a sua ocorrência compromete a análise de amostras de *touch DNA* (24).

Quando perfis genéticos obtidos de amostras com baixa quantidade de DNA forem analisados, sempre deve ser considerada a possibilidade de ocorrência de eventos

do tipo *drop in* e *drop out* de alelos. A não detecção de alelos ou a detecção de alelos estranhos ao DNA fonte prejudica muito a comparação entre os perfis genéticos. A ocorrência de um pequeno número de não coincidências em uma comparação de perfis pode acontecer devido a esses eventos e não necessariamente significar uma exclusão (41), (42).

Além dos eventos do tipo *drop in* e *drop out* de alelos, qualquer ocorrência de artefatos de corrida que dificultem a correta interpretação do perfil genético, como por exemplo *stutters*, desbalanço de marcadores heterozigotos, cristais de polímero, *dye blobs*, *spikes* e quaisquer outros artefatos devem ser analisados corretamente para que não ocorram erros na genotipagem. Para tanto, o laboratório deve sempre seguir as recomendações nos procedimentos de análise e manter padrões de qualidade rígidos (43).

Um resultado que deve ser frequentemente encontrado quando analisadas amostras de *touch DNA* são as misturas de material genético com mais de um contribuidor. Uma vez que boa parte das superfícies analisadas pode ter sido tocada por mais de um indivíduo, é de se esperar que em ao menos algumas delas sejam amplificados mais de um perfil genético. Nesses casos a atenção na análise do perfil deve ser redobrada no sentido de identificar o número de contribuidores e separar corretamente seus genótipos em todos os marcadores, o que dependendo da qualidade dos perfis obtidos, pode representar um grande desafio. Nesses casos, todos os resultados devem ser analisados com muito cuidado (38).

5.11 PERSPECTIVAS FUTURAS EM RELAÇÃO A NOVAS TECNOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Grandes avanços tem sido observados na área de genética forense nos últimos anos. Mesmo sendo relativamente nova, muitos dos métodos uma vez empregados já se tornaram obsoletos e muitos dos empregados atualmente se tornarão, em um futuro não muito distante (7). Nesse contexto, é importante avaliar como as tecnologias que provavelmente estão presentes na rotina de uma laboratório forense em um futuro próximo influenciam a análise de amostras de *touch DNA*.

5.11.1 Utilização de SNPs

Marcadores do tipo *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) estão surgindo como alternativas muito promissoras na área de genética forense. Entre as suas vantagens podemos citar a sua abundância no genoma humano, a baixa taxa de mutação, a possibilidade de analisá-los utilizando *amplicons* de tamanho pequeno e o potencial de automação e análise em grande escala (44).

A principal vantagem do SNP em relação ao STR na análise de amostras de *touch DNA* está relacionada com o tamanho dos *amplicons* analisados. O tamanho do *amplicon* é uma característica fundamental na análise de amostras com alto grau de degradação, quanto menor o tamanho maior é a probabilidade que o alelo de interesse possa ser identificado em uma amostra. Apesar da degradação não ser uma característica intrínseca de amostras de *touch DNA*, qualquer técnica que minimize a chance de não detecção de alelos e otimize a produção de perfis genéticos é altamente desejada (45).

Algumas limitações importantes devem ser consideradas em relação à utilização de SNPs. Em primeiro lugar, a análise de amostras de DNA provenientes de mais de um doador, uma situação muito comum quando da análise de amostras de *touch DNA*, são muito mais complicadas utilizando SNPs do que STRs. Além disso, SNPs possuem um poder de discriminação muito menor do que STRs, fazendo com que para a sua utilização de rotina seja necessário desenvolver multiplexes com um número muito grande de marcadores. Assim, a vantagem de *amplicons* menores seria compensada e talvez anulada pela necessidade de construção de multiplexes muito grandes (3).

5.11.2 Sequenciamento de Nova Geração

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) tem revolucionado a pesquisa em genômica. Elas possibilitam a obtenção de um número muito grande de informação em um curto espaço de tempo. Basicamente, a tecnologia é baseada no sequenciamento, em paralelo, de milhares de pequenos segmentos do DNA de interesse.

Posteriormente, através da bioinformática, esses fragmentos paralelos são organizados e ordenados, construindo a sequência completa do DNA analisado (46).

Essas novas tecnologias abrem várias possibilidades de aplicabilidade na análise de DNA forense. Uma opção interessante é a análise de DNA mitocondrial. O DNA mitocondrial está presente em um número de cópias por célula muito maior do que o DNA nuclear. Essa característica é particularmente interessante ao se considerar amostras de *touch DNA*, uma vez que a grande dificuldade na análise desse tipo de amostra está na baixa quantidade de células coletadas. O método atual de análise de DNA pelo sequenciamento de *Sanger* é trabalhoso, dispendioso e demorado. A aplicação de técnicas de NGS nesses casos pode tornar viável a análise de DNA mitocondrial em amostras forenses (47).

Outra possibilidade interessante da aplicação de técnicas de NGS está na análise de SNPs. O sequenciamento de SNPs por NGS elimina a dificuldade em se desenvolver reações multiplexes tradicionais muito grandes e complicadas. Além disso, um número maior de marcadores pode ser analisado simultaneamente, atenuando a questão do baixo poder de discriminação desse tipo de marcador (48).

Contudo, algumas desvantagens importantes dificultam o uso de NGS na análise de amostras forenses. A principal limitação existente na tecnologia de hoje está relacionada com a quantidade de DNA necessária para as reações. A maioria das técnicas necessita algo em torno de 10ng de DNA para a obtenção dos perfis genéticos. Essa é uma quantidade muito grande para amostras de *touch DNA*, que somente é obtida em pouquíssimos casos (48).

Além disso, a análise de resultados através da bioinformática demora um tempo relativamente grande e necessita de uma grande quantidade de recursos de processamento. Na maioria das vezes, essas condições não são realizáveis na rotina de um laboratório forense, onde é desejada a produção de resultados no menor tempo possível. A estrutura física necessária para a implantação de técnicas de NGS ainda é cara e complexa, o que também dificulta a sua implantação e padronização nos diversos laboratórios de genética forense (49).

6 CONCLUSÃO

É possível extrair DNA depositado por contato em objetos relacionados a ocorrências criminais em quantidade suficiente para obtenção de perfis genéticos de qualidade.

Os pós reveladores de impressões latentes são ferramentas que podem ser empregadas para a eleição das regiões nas superfícies onde será feita a coleta de material biológico para os exames de DNA.

A quantidade de material biológico depositado nas superfícies após o contato varia conforme a região da pele que entrou em contato. De uma maneira geral a quantidade de pó revelador aderido a uma impressão é proporcional à quantidade de material biológico depositado.

Apesar de auxiliar na coleta de material, de uma maneira geral os pós reveladores apresentam um efeito de inibição da reação de PCR e diminuem a quantidade de DNA recuperado nas reações. O emprego de uma reação de purificação de DNA pode auxiliar a melhorar a qualidade da amostra, embora os efeitos inibitórios não tenham sido totalmente compensados.

A extração do DNA pelo método de extração orgânica fenol-clorofórmio ainda é a melhor maneira de extrair esse tipo de amostra, devido principalmente ao alto rendimento necessário para recuperar a pouca quantidade de DNA presente nessas amostras.

O método de coleta pela técnica de *double swabbing* apresentou resultados melhores do que a técnica de um suabe úmido. Apesar do suabe seco ter resultados semelhantes a *double swabbing*, a sua utilização em casos de rotina pode não apresentar a mesma eficiência.

Todos os objetos testados apresentaram potencial para obtenção de perfis genéticos, embora nos cartuchos de munição as chances de sucesso sejam muito pequenas. Nos volantes de veículos a quantidade de DNA recuperado foi sempre grande, enquanto que na arma de fogo, faca de cozinha e alavanca de câmbio as quantidades de DNA obtidas estavam sempre próximas ao limite para a obtenção de perfis genéticos.

REFERÊNCIAS

1. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 2004 Oct ;5(10):739–51.
2. Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff KR and PW. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science; 5 edition; 2007.
3. Butler JM. *Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* Academic Press; 2 edition; 2005.
4. Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1980 Nov 1.
5. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature.* 1985 Mar 7;314(6006):67–73.
6. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature.* 1985 Jul 4; 316(6023):76–9.
7. Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investigative Genetics;* 2013 Jan ;4(1):22.
8. McDonald J, Lehman DC. Forensic DNA analysis. *Clin Lab Sci.* 2012 Jan ;25(2):109–13.
9. Thompson R, Zoppis S, McCord B. An overview of DNA typing methods for human identification: past, present, and future. *Methods Mol Biol.* 2012 Jan; 830:3–16.
10. Silva NM, Pereira L, Poloni ES, Currat M. Human neutral genetic variation and forensic STR data. *PLoS One.* 2012 Jan; 7(11):e49666.
11. Ministério da Justiça. *Diagnóstico da Perícia Criminal no Brasil.* 2012 p. 107.
12. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 11^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
13. Zoppis S, Muciaccia B, D’Alessio A, Ziparo E, Vecchiotti C, Filippini A. DNA fingerprinting secondary transfer from different skin areas: Morphological and genetic studies. *Forensic Sci Int Genet.* 2014 Jul; 11:137–43.
14. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006 Jan 1.
15. Barnett R, Larson G. A phenol-chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples. *Methods Mol Biol.* 2012 Jan; 840:13–9.
16. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993

Sep;11(9):1026–30.

17. Van Oorschot RAH, Jones MK. DNA fingerprints from fingerprints. 1997 Jun 19;387(6635):767.
18. Horsman-Hall KM, Orihuela Y, Karczynski SL, Davis AL, Ban JD, Greenspoon S a. Development of STR profiles from firearms and fired cartridge cases. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Sep; 3(4):242–50.
19. Sewell J, Quinones I, Ames C, Multaney B, Curtis S, Seeboruth H, et al. Recovery of DNA and fingerprints from touched documents. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Sep ; 2(4):281–5.
20. Schulz MM, Reichert W. Archived or directly swabbed latent fingerprints as a DNA source for STR typing. *Forensic Sci Int.* 2002 Jun 25;127(1-2):128–30.
21. Tokutomi T, Takada Y, Kanetake J, Mukaida M. Identification using DNA from skin contact: case reports. *Leg Med (Tokyo).* Elsevier Ireland Ltd; 2009 Apr; 11 Suppl 1:S576–7.
22. Dieltjes P, Mieremet R, Zuniga S, Kraaijenbrink T, Pijpe J, de Knijff P. A sensitive method to extract DNA from biological traces present on ammunition for the purpose of genetic profiling. *Int J Legal Med.* 2011 Jul;125(4):597–602.
23. Sodhi GS, Kaur J. Powder method for detecting latent fingerprints: a review. *Forensic Sci Int.* 2001 Sep; 120(3):172–6.
24. Goray M, Mitchell RJ, van Oorschot RAH. Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions. *Leg Med (Tokyo).* 2010 May; 12(3):117–20.
25. Van Oorschot RA, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review. *Investig Genet.* BioMed Central Ltd; 2010 Jan; 1(1):14.
26. Thomasma SM, Foran DR. The influence of swabbing solutions on DNA recovery from touch samples(.). *J Forensic Sci.* 2013 Mar; 58(2):465–9.
27. Daly DJ, Murphy C, McDermott SD. The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Jan;6(1):41–6.
28. Van Hoofstat DE, Deforce DL, Hubert De Pauw IP, Van den Eeckhout EG. DNA typing of fingerprints using capillary electrophoresis: effect of dactyloscopic powders. *Electrophoresis.* 1999 Oct;20(14):2870–6.
29. Köchl S, Niederstätter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2005 Jan; 297:13–30.
30. Stangegaard M, Hjort BB, Hansen TN, Hoflund A, Mogensen HS, Hansen AJ, et al. Automated extraction of DNA from biological stains on fabric from crime cases. A

- comparison of a manual and three automated methods. *Forensic Sci Int Genet*. 2013 May;7(3):384–8.
31. Young JM, Rawlence NJ, Weyrich LS, Cooper A. Limitations and recommendations for successful DNA extraction from forensic soil samples: a review. *Sci Justice*. 2014 May ;54(3):238–44.
 32. Strychalski EA, Konek C, Butts ELR, Vallone PM, Henry AC, Ross D. DNA purification from crude samples for human identification using gradient elution isotachopheresis. *Electrophoresis*. 2013 Sep;34(17):2522–30.
 33. Pang BCM, Cheung BKK. Double swab technique for collecting touched evidence. *Leg Med (Tokyo)*. 2007 Jul;9(4):181–4.
 34. Caputo M, Irisarri M, Alechine E, Corach D. A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. *Forensic Sci Int Genet* . 2013 Sep ; 7(5):488–93.
 35. Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, Calandro LM, Furtado MR, Shewale JG. Developmental validation of the PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *J Forensic Sci*. 2009 May;54(3):599–607.
 36. Nunn S. Touch DNA collection versus firearm fingerprinting: comparing evidence production and identification outcomes. *J Forensic Sci* . 2013 May;58(3):601–8.
 37. Phipps M, Petricevic S. The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int* . 2007 May 24;168(2-3):162–8.
 38. Pfeifer CM, Klein-Unseld R, Klintschar M, Wiegand P. Comparison of different interpretation strategies for low template DNA mixtures. *Forensic Sci Int Genet* . 2012 Dec ;6(6):716–22.
 39. Oostdik K, Lenz K, Nye J, Schelling K, Yet D, Bruski S, et al. Developmental validation of the PowerPlex(®) Fusion System for analysis of casework and reference samples: A 24-locus multiplex for new database standards. *Forensic Sci Int Genet*. 2014 Sep;12:69–76.
 40. Aditya S, Sharma a K, Bhattacharyya CN, Chaudhuri K. Generating STR profile from “Touch DNA”. *J Forensic Leg Med*. 2011 Oct;18(7):295–8.
 41. Mitchell AA, Tamariz J, O’Connell K, Ducasse N, Budimlija Z, Prinz M, et al. Validation of a DNA mixture statistics tool incorporating allelic drop-out and drop-in. *Forensic Sci Int Genet*. 2012 Dec;6(6):749–61.
 42. Caragine T, Prinz M. Comment on “Low copy number typing has yet to achieve ”general acceptance” by Budowle, B., et al., 2009. *Forensic Sci. Int. Genetics: Supplement Series 2*, 551-552. *Forensic Sci Int Genet*. 2011 Jan;5(1):3–4; discussion 5–7.
 43. Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, et al. DNA commission of

the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 Dec;6(6):679–88.

44. Sobrino B, Brión M, Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int.* 2005 Nov 25;154(2-3):181–94.
45. Sobrino B, Carracedo A. SNP typing in forensic genetics: a review. *Methods Mol Biol.* 2005 Jan;297:107–26.
46. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013 Dec;98(6):236–8.
47. Preuner S, Danzer M, Pröll J, Pötschger U, Lawitschka A, Gabriel C, et al. High-quality DNA from fingernails for genetic analysis. *J Mol Diagn.* 2014 Jul;16(4):459–66.
48. Seo SB, King JL, Warshauer DH, Davis CP, Ge J, Budowle B. Single nucleotide polymorphism typing with massively parallel sequencing for human identification. *Int J Legal Med.* 2013 Nov;127(6):1079–86.
49. Scheible M, Loreille O, Just R, Irwin J. Short tandem repeat typing on the 454 platform: strategies and considerations for targeted sequencing of common forensic markers. *Forensic Sci Int Genet.* 2014 Sep;12:107–19.