

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAROLINA MAYUMI VIEIRA

**ANÁLISE DE MINISTR'S EM IMPRESSÕES DIGITAIS DEPOSITADAS EM
SUPORTES VARIADOS**

VITÓRIA

2014

CAROLINA MAYUMI VIEIRA

ANÁLISE DE MINISTR'S EM IMPRESSÕES DIGITAIS DEPOSITADAS EM
SUPORTES VARIADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Greiciane Gaburro Paneto

Coorientador: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro

VITÓRIA

2014

CAROLINA MAYUMI VIEIRA

ANÁLISE DE MINISTR'S EM IMPRESSÕES DIGITAIS DEPOSITADAS EM
SUPORTES VARIADOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 24 de junho de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Greiciane Gaburro Paneto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Cintia Fridman Rave
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

À minha família, que mesmo de longe, torceu e me ajudou em momentos difíceis. Agradeço por todo o esforço em apontar os melhores caminhos.

À minha querida Beloca, que nasceu no meio e me ajudou a chegar ao fim desse Mestrado, alegrando os meus dias.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Greiciane Gaburro Paneto, pela sua paciência, sabedoria e dedicação durante todos os momentos do trabalho.

Ao grande profissional, exemplo e amigo, Dr. Luís Renato da Silveira Costa, que me incentivou desde o início e me ajudou com sua incrível sabedoria e experiência.

Aos colegas do Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, que me apoiaram durante todo o Mestrado e suportaram os meus dias difíceis.

À Polícia Civil do Espírito Santo, em especial à Polícia Técnico Científica, que permitiu a realização desse trabalho, disponibilizando os equipamentos.

Aos doadores das impressões digitais, que sempre torceram pelo engrandecimento da Perícia Criminal.

Aos meus queridos amigos, mesmo os que estão distante, que sempre me apoiaram.

"Quaisquer que sejam os passos, quaisquer objetos tocados por ele, o que quer que seja que ele deixe, mesmo que inconscientemente, servirá como uma testemunha silenciosa contra ele. Não apenas as suas pegadas ou digitais, mas o seu cabelo, as fibras das suas calças, os vidros que ele porventura parta, a marca da ferramenta que ele deixe, a tinta que ele arranhe, o sangue ou sêmen que deixe. Tudo isto, e muito mais, carrega um testemunho contra ele. Esta prova não se esquece. É distinta da excitação do momento. Não é ausente como as testemunhas humanas são. Constituem, per se, numa evidência factual. A evidência física não pode estar errada, não pode cometer perjúrio por si própria, não se pode tornar ausente. Cabe aos humanos, procurá-la, estudá-la e compreendê-la, apenas os humanos podem diminuir o seu valor."

Edmond Locard

RESUMO

A identificação humana por impressões digitais (ID's) constitui um método simples, rápido e econômico. Entretanto, borrões de impressões depositadas em superfícies rugosas constituem desafio em relação à perda de detalhes. Ainda assim, nem sempre os métodos de revelação são suficientes para permitir a análise da impressão digital latente, pois os pontos observados podem estar borrados ou danificados. Com os avanços na tecnologia de genotipagem do DNA, pequenas quantidades de material biológico, como uma dezena de células podem gerar um perfil completo de DNA e auxiliar nas investigações. Neste contexto, as impressões digitais, antes somente analisadas sob o aspecto lofoscópico, agora podem ter um enfoque genético. A utilização de miniSTR's aliada ao aumento de número de ciclos da PCR, auxiliam na detecção de amostras de quantidade limitada de DNA e/ou degradada. No processo de produção de provas, o perito criminal deve considerar a ausência de hierarquia entre elas, mas deve analisar cada vestígio considerando sua viabilidade e efetividade na geração de evidências. Uma superfície deve ser examinada quanto à sua probabilidade em obter uma impressão digital útil à análise lofoscópica, em comparação com a possibilidade em obter um perfil genético. Assim, neste trabalho foram coletadas quatro impressões digitais de vinte e cinco indivíduos, em quatro suportes diferentes: alumínio, madeira, plástico e vidro, com o objetivo de extrair DNA das possíveis células presentes nas ID's, amplificar o DNA utilizando marcadores miniSTRs e comparar os perfis genéticos gerados com aqueles obtidos nas amostras controle dos respectivos indivíduos. O kit de amplificação AmpFISTR MiniFiler™ foi capaz de amplificar amostras das impressões digitais coletadas resultando, em sua maioria, em perfis parciais e, em alguns casos, em perfis completos. Comparando-se os perfis com as amostras controle, o alumínio possibilitou maior sucesso na obtenção de perfis (67,33%), seguido do plástico (64,66%), madeira (63,48) e por último, o vidro (45,37%).

Palavras-chave: DNA. Impressão Digital. MiniSTR. Suportes.

ABSTRACT

The human fingerprint identification is a simple, fast and economical method. However, blurred prints deposited on rough surfaces constitute a challenge because of the loss of details. The development methods are insufficient to allow the analysis of the fingerprint, as observed points may be blurred or damaged. With the advances in DNA genotyping technology, small amounts of biological material such as a dozen cells can yield a complete DNA profile and be of great help in criminal investigations. In this context, fingerprints, previously only analyzed from the lophoscopic aspect, can now have a genetic approach. The use of MiniSTR 's combined with an increase in the number of PCR cycles can improve the detection of DNA in samples with degraded and/or limited amount of DNA. When investigating a crime scene, the forensic expert should keep in mind there is no hierarchy among evidence and every vestige should be analyzed considering its feasibility and effectiveness in generating proof. A surface should be assessed regarding its likelihood of providing a useful fingerprint for identification purposes, compared to the possibility of obtaining a genetic profile. In the present study, four fingerprints of twenty-five individuals were collected from four different surfaces: aluminum, wood, plastic and glass, with the goal of extracting the DNA of cells that might be present in the fingerprints, amplifying the DNA for miniSTRs markers and comparing the genetic profiles obtained with those from the individuals' respective control samples. The AmpFISTR™ MiniFiler® amplification kit was able to amplify samples of the collected fingerprints resulting mostly in partial profiles and, in some cases, complete profiles. When comparing the profiles with the control samples, it was observed that the fingerprints collected on the aluminum surface resulted in better quality profiles (67,33%), followed by plastic (64,66%), wood (63,48%) and finally the glass (45,37%).

Key words: DNA. Fingerprint. MiniSTR. Surfaces.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando os marcadores dos kits de amplificação AmpFISTR Identifiler e AmpFISTR MiniFiler.....	19
Figura 2. Esquema dos primers de MiniSTR.....	20
Figura 3. Ilustração de resultados hipotéticos de um locus heterozigótico.....	27
Figura 4. Evento estocástico.	31
Figura 5. Suportes testados: plástico, vidro, madeira e alumínio, nesta ordem.	31
Figura 6. Eletroferograma de amostra controle de DNA de 100pg.....	39
Figura 7. Eletroferograma de uma das amostras de impressão digital.....	39

LISTA DE SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

h - horas

ID's - Impressões Digitais

LCN - Low Copy Number (do inglês baixo número de cópias)

Mili Q - Sistema de purificação de água fornecido pela empresa Millipore Corporation

min - minutos

μL - Microlitros

mL - Mililitro

ng - Nanogramas

°C - Graus Celsius

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (do inglês Reação em Cadeia da Polimerase)

pg - Picogramas

rpm - rotações por minuto

RFU - Relative Fluorescence Unit (do inglês Unidade de Fluorescência Relativa)

STR – Short Tandem Repeat (do inglês Repetições Curtas Consecutivas)

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UV - Ultra Violeta

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats (do inglês Repetições Consecutivas em Número Variado)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Perícia criminal e os vestígios biológicos.....	15
2.2 A molécula de DNA.....	16
2.3 DNA forense e marcadores moleculares	17
2.4 Impressões Digitais.....	20
2.5 Impressões digitais como fonte de DNA	21
2.6 Variáveis que afetam a quantidade de DNA disponíveis nas ID's	22
2.7 Desafios de interpretação dos perfis genéticos de impressões	25
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO	29
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Geral	30
4.2 Específico	30
5. METODOLOGIA	31
5.1 Comitê de Ética em Pesquisa	31
5.2 Coleta de amostras	31
5.3 Critérios de exclusão.....	32
5.4 Extração do DNA	33
5.4.1 DNA das impressões digitais	33
5.4.2 DNA controle (swab bucal)	33
5.4.3 Controle negativo.....	34
5.4.4 Teste de sensibilidade do kit.....	34
5.5 Reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	35
5.6 Reação de eletroforese e detecção	36
5.7 Análises dos resultados	36
6. RESULTADOS	38
6.1 Teste de sensibilidade do kit AmpFISTR MiniFiler™	38
6.2 Amplificação dos miniSTRs autossômicos das impressões digitais.....	38
6.3 Amplificação da amelogenina das impressões digitais	42
6.4 Amplificação de alelos extra (<i>drop-in</i>).....	43
6.5 Ocorrência de alelos e locus nulos (<i>allele e locus drop-out</i>).....	44

7. DISCUSSÃO.....	46
7.1 Teste de sensibilidade do kit.....	46
7.2 Amplificação dos miniSTRs autossômicos das impressões digitais.....	46
7.2.1 As impressões digitais como fonte de material genético.....	46
7.3 Estratégias para amplificação <i>Low Copy Number</i> (LCN).....	50
7.4 Amplificação da amelogenina das impressões digitais.....	51
7.5 Amplificação de alelos extra (<i>drop-in</i>).....	51
7.6 Ocorrência de <i>allele</i> e <i>locus droup-out</i>	53
8. CONCLUSÕES.....	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
10. ANEXOS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A identificação humana por meio do DNA, desde que foi introduzida, na década de 80, tem revolucionado a ciência forense e a capacidade da aplicação da lei em conectar indivíduos com a cena de um crime. Amostras biológicas coletadas pelos peritos criminais atuam como testemunhas silenciosas e podem ser usadas para incriminar, mas também inocentar um indivíduo.

A análise de vestígios biológicos em fatos criminosos é o maior contribuinte para identificação humana, tanto de criminosos como vítimas (LAGOA, 2007). Manchas de sangue, sêmen, saliva, fios de cabelo, material fetal, vestígios subungueais e até dejetos fecais e urina têm ampla aplicação à análise genética, mas em certas ocasiões como furtos, por exemplo, podem estar ausentes.

Em análise minuciosa sobre o local de crime, qualquer superfície que tenha sido tocada pelo criminoso, pode ter vestígios de células epiteliais. Com os avanços na tecnologia de genotipagem do DNA, pequenas quantidades de material biológico, como uma dezena de células, podem gerar um perfil completo de DNA e auxiliar nas investigações. Neste contexto, as impressões digitais, antes somente analisadas sob o aspecto lofoscópico, agora podem ter um enfoque genético. Van Oorschot e Jones (1997) demonstraram que é possível obter perfis genéticos de objetos que foram tocados, incluindo ferramentas, arma de fogo, papel, vidro, pedras, portas, etc.

Os marcadores STR (*Short Tandem Repeat*) são atualmente os marcadores genéticos mais informativos para testes de identificação humana por serem altamente polimórficos (LUCE et al., 2009). Sua principal característica é o caráter único da combinação dos marcadores, tornando a identificação humana irrefutável, além de estar presente e ser igual em qualquer célula do corpo, possibilitando a comparação de uma amostra vestígio de qualquer fonte, seja ela proveniente do sangue, sêmen, saliva, pelos, etc, com uma amostra referência, e também catalogada para ser usada a qualquer tempo, como nos bancos de DNA. Baseadas em curtas repetições consecutivas em regiões não codificadoras do DNA, sua análise pode ser realizada numa única reação com todos os iniciadores (*primers*) dos marcadores STR, amplificando-os simultaneamente em reação em cadeia da

polimerase (PCR multiplex). Este método possibilitou a obtenção de informações genéticas com menor quantidade de DNA, característica da maioria das amostras forenses, além de amostras degradadas e em curto espaço de tempo.

Em artigo "*Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers,*" Wiegand e Kleiber (2001) demonstraram que DNA altamente degradado assim como DNA com poucas cópias (*DNA low template*) poderiam ser analisados usando novos *primers* redesenhados que estariam mais próximos das regiões de STR. Os primers denominados miniSTR são construídos de forma a hibridizar em zonas mais próximas das unidades de repetição, com redução da região flanqueadora e, assim, produzem fragmentos de amplificação menores. Os miniSTR geram amplicons que se estendem numa faixa de 70 a 283 nucleotídeos, enquanto os kits multiplex de STR disponíveis, de 100 a 450 nucleotídeos, aumentando a taxa de sucesso na detecção de pequenas quantidades de DNA (BUTLER, 2011).

A chave para obtenção de sucesso nos resultados de amostras tão exíguas depende do reconhecimento de técnicas mais adequadas à obtenção do maior número de células possíveis, associadas às análises cada vez mais sensíveis na detecção de DNA. Várias alternativas são implementadas para esse tipo de amostra, como técnicas mais eficientes de coleta e extração de DNA e aumento do número de ciclos de PCR, dentre outros.

Em ocorrências criminosas nas quais um grande número de vestígios é submetido à investigação, tempo e recursos devem ser investidos em análises com maiores perspectivas de sucesso na obtenção de perfis genéticos que auxiliem na elucidação do fato. A possibilidade de se encontrar quantidades suficientes de células em uma única impressão digital (ID), depende de vários fatores, como a característica do indivíduo ser bom ou mau doador de células, atividades realizadas anteriormente à produção da ID, tempo decorrente entre a produção e a coleta e por fim, o suporte em que foi produzida. Como em uma perícia realizada em cena de crime, vários desses fatores são desconhecidos e o único possível de ser controlado e escolhido é o suporte, é necessário saber aquele que melhor possibilita a coleta e determinação do perfil genético. Assim, neste trabalho, os suportes: alumínio, madeira, plástico e vidro, que representam superfícies comuns como armas, facas, portas, maçanetas, garrafas, etc, com os quais os autores de crime podem ter

entrado em contato foram comparados quanto ao sucesso de obtenção de perfis genéticos obtidos de ID's.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Perícia criminal e os vestígios biológicos

O exame de corpo de delito realizado pelos peritos criminais está inserido no contexto de produção de provas que auxiliam a justiça e tem papel de suma importância quando se busca o conjunto de vestígios materiais deixados no cometimento de um crime. Os vestígios sejam eles materiais, documentais, circunstanciais, tem o poder de provar fatos (materialidade) e os ligar a indivíduos que dele participaram (autoria).

Os peritos criminais têm muitas estratégias para tornar o vestígio uma peça útil à justiça e a evolução das técnicas está intimamente ligada às ciências médicas e biológicas, às novas tecnologias computadorizadas e às pesquisas criminológicas (MEDEIROS, 2009). A ciência e a tecnologia tem um papel crucial na análise, interpretação e avaliação das provas no laboratório de ciência forense e cada vez mais, estão sendo aplicadas na cena do crime. A biotecnologia é apenas uma dessas estratégias, mas de grande importância quando a investigação do crime depende de provas ligadas a evidências e vestígios biológicos. A biotecnologia proporciona à justiça uma série de recursos, entre os quais a utilização do ácido desoxirribonucleico (DNA).

O estudo de certas regiões do DNA que determinam a individualidade humana foi desenvolvido a pouco mais de uma década, e trouxe muitos avanços para a identificação humana e investigações de paternidade. Além do seu poder discriminatório, o material genético está presente em qualquer célula nucleada, e é perene, ou seja, não muda ao longo do tempo. Sangue, sêmen, saliva, todo exsudado biológico que contém células de um indivíduo terá o mesmo perfil genético, que poderá ser confrontado com outros perfis, sejam de pessoas ou vestígios (LAGOA, 2007). Com base nessas prerrogativas, a construção de bancos de dados de perfis genéticos está revolucionando a justiça criminal, com perspectivas maiores na geração de provas contra um crime. Na Inglaterra, após investimentos do governo no chamado Programa de Expansão do DNA, foi constituído o maior banco de dados de perfis genéticos do mundo (NDNAD). São

mais de 3 milhões de pessoas cadastradas (4,5% da população do país) que corresponde à maioria da população criminosa. Em um típico mês, os confrontos realizados no banco de dados conectam suspeitos a 15 assassinatos, 45 estupros e 2500 crimes de volume (assaltos e relacionados a veículos). Ainda, caso um vestígio de DNA recuperado da cena de um crime, não resulte em “*match*” contra um indivíduo no banco de dados, novas buscas baseadas em algoritmos foram desenvolvidos pelo Serviço de Ciência Forense da Inglaterra, que podem identificar possíveis parentes de sangue próximos, como irmãos ou pais (MENNELL, 2007).

Neste contexto, a criminalística biológica é uma área fundamental das ciências forenses, pois os vestígios biológicos representam a possibilidade de identificação da autoria de crimes violentos contra a vida, integridade física e liberdade sexual.

Com os grandes avanços nas tecnologias de detecção do DNA, pequenas quantidades de amostras forenses, antes inúteis como peças informativas, hoje avocam uma percepção mais acurada dos peritos criminais na cena de crime. O princípio de Edmond Locard, que enuncia que sempre que dois objetos entram em contato, ocorre troca de material entre eles, ganhou novas proporções com análise de quantidades ínfimas de material como células epiteliais que podem ser coletadas de objetos tocados por alguém (ADYTIA et al., 2011).

2.2 A molécula de DNA

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é um polímero em fita dupla constituído de 4 tipos de desoxirribonucleotídeos: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) unidos por ligações fosfodiéster covalentes, que unem o carbono 5' de um grupo desoxirribose ao carbono 3' do próximo nucleotídeo. A dupla fita é disposta em hélice, por pareamento dos nucleotídeos de cada fita por pontes de hidrogênio. Sequências desses nucleotídeos podem constituir genes, que carregam a informação genética de um ser vivo, ou a parte estrutural e de regulação da molécula. Os genes carregam as informações sobre as características de todos os seres vivos e são transmitidos hereditariamente. Os genes fazem parte da estrutura

dos cromossomos e se encontram em locais denominados locos genéticos (ALBERTS et al., 2002).

Denomina-se alelo cada diferença encontrada em um determinado gene. Cada um de nós apresenta um cromossomo paterno e um materno, e a segregação destas estruturas segue a lei de Mendel, em que um alelo é de origem materna e o outro, paterna, para cada loco. Assim, em um caso de paternidade, há de se comparar os alelos do indivíduo com o de seus pais e confirmar essa herança mendeliana. Além de casos de paternidade, seja cível ou criminal, o DNA como meio de prova ou investigação pode ser utilizado para associar ou excluir um indivíduo de uma cena de crime, identificar pessoas desaparecidas, associar vestígios de dois ou mais fatos criminosos, e confrontar vestígios com perfis de bancos de dados de DNA.

2.3 DNA forense e marcadores moleculares

A rápida evolução biotecnológica tem possibilitado grandes avanços na identificação humana por meio do DNA. Até poucos anos atrás, as análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos auxiliavam a área forense (JOBIM et al., 2012).

Em 1985, Jeffreys e colaboradores desenvolveram os primeiros testes de DNA para análise da individualidade humana baseados em polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP's) (JOBIM et al., 2012). Com a tecnologia dos RFLP's, amostras de aproximadamente 250ng eram submetidas à análise para obtenção de perfis. Perfis de DNA úteis eram obtidos com aproximadamente 30ng de alto peso molecular (não degradado) de DNA inicial (WICKENHEISER e HORNS, 2002). Atualmente, a descoberta de outros marcadores genéticos mais específicos e técnicas de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilitaram a análise de menores quantidades de DNA e tornaram a individualidade humana indício incontestável em processos judiciais. O alto poder discriminatório dessa molécula presente em exames de corpo de delito é capaz de trazer a certeza da imputação criminosa a alguém ou a sua inocência (JOBIM et al, 2012).

A identificação humana pelo DNA é baseada na análise da diversidade de marcadores biológicos (polimorfismos), que conferem a individualidade às pessoas e vínculo entre elas. Os minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) são formados por sequências de nucleotídeos repetidas em número de vezes diferentes em cada indivíduo. As amostras de DNA são analisadas por comparação de regiões de DNA repetitivas localizadas fora das regiões de codificação do DNA. Apesar de mais de 99,9% do genoma ser o mesmo em toda a população humana, as variações na sequência de DNA nos marcadores polimórficos pode ser usado tanto para diferenciar e correlacionar os indivíduos (GIARDINA et al., 2011). Cada número de repetições determina um loco para o minissatélite e, quanto menor a frequência desse loco, maior será seu poder de discriminação dentro da população. Como cada indivíduo possui um cromossomo paterno e outro materno, identificando os alelos maternos, obrigatoriamente os restantes deverão ser iguais aos do pai na identificação de um filho, por exemplo (JOBIM et al, 2012).

Os microsatélites ou STRs têm estrutura repetitiva menor que os VNTRs, possibilitando a análise em amostras com pouco DNA viável. Existem diversos kits de amplificação de STR disponíveis no mercado, como o AmpFLSTR® Identifiler® (Applied Biosystems®), PowerPlex® 16 HS System (Promega) (15 marcadores e a amelogenina), GlobalFiler™ (Applied Biosystems®) (24 marcadores e a amelogenina), dentre outros.

Os sistemas de genotipagem por STR são ferramentas úteis para identificação de amostras biológicas em casos forenses, mas no caso de amostras com quantidades exíguas de DNA, com inibidores ou muito degradadas, não demonstram sucesso de amplificação. O Amp FISTR MiniFiler foi o primeiro kit de amplificação de miniSTR disponível comercialmente para uso em casos forenses em situações em que outros kits de genotipagem de DNA provaram ser inadequados para analisar amostras de DNA degradadas e com inibidores de PCR.

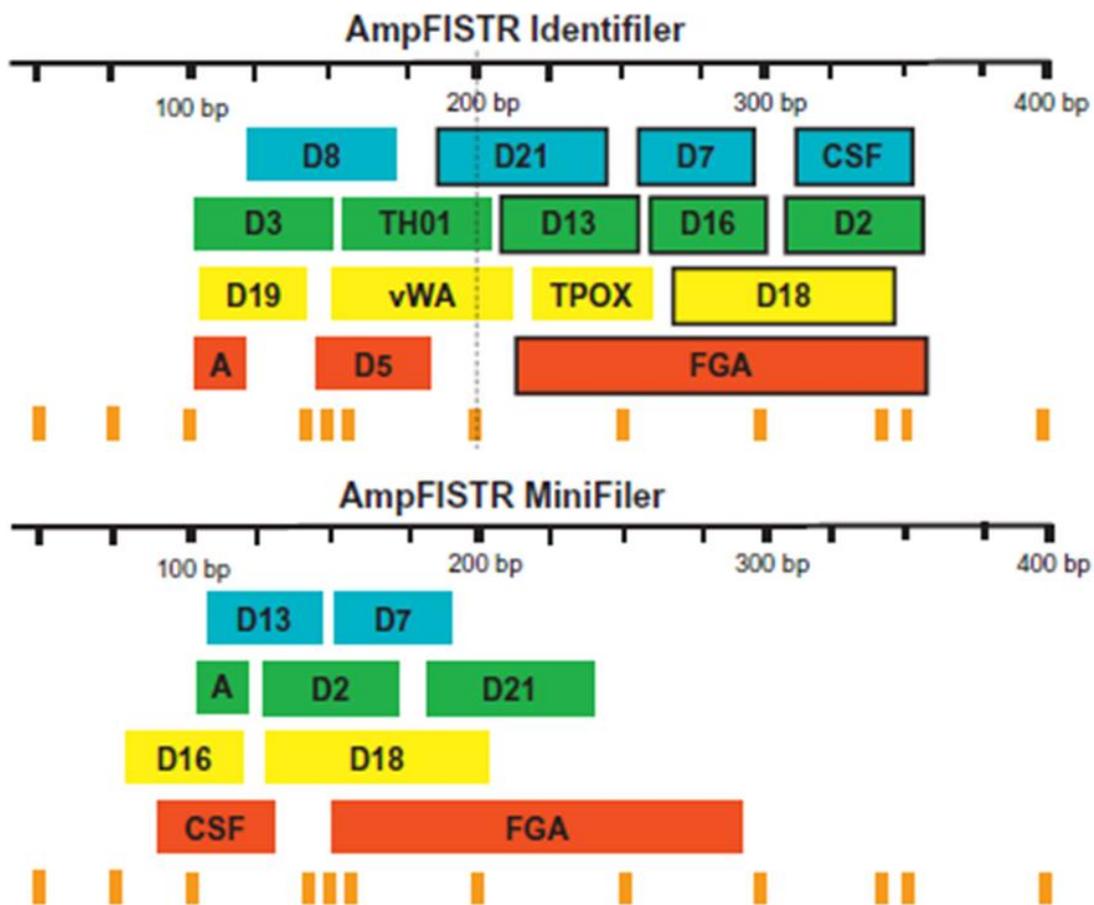


Figura 1. Esquema ilustrando os marcadores dos kits de amplificação AmpFISTR Identifiler e AmpFISTR MiniFiler. Fonte: Manual do kit de amplificação *AmpFISTR MiniFiler*, Applied Biosystems.

Mulero et al. (2008) descreveu a conversão de oito marcadores STR em miniSTR e o desenvolvimento comercial do kit de amplificação AmpFISTR MiniFiler (Applied Biosystems). Este kit amplifica 8 (oito) dos maiores loci do kit de PCR AmpFISTR Identifiler (D7S820, D13S317, D16S539, D21S11, D2S1338, D18S51, CSF1PO e FGA) (MULERO et al., 2008). A vantagem do miniFiler em relação a outros kits de STR são os amplicons de menor comprimento produzidos durante a PCR (Figura 1). MiniSTR são o resultado de aproximação dos primers de PCR da região de repetição dos STR's, diminuindo a região flanqueadora e assim o tamanho geral do marcador STR (Figura 2), conseqüentemente resultando em maior taxa de sucesso na obtenção de perfis em amostras degradadas (LUCE et al., 2009).

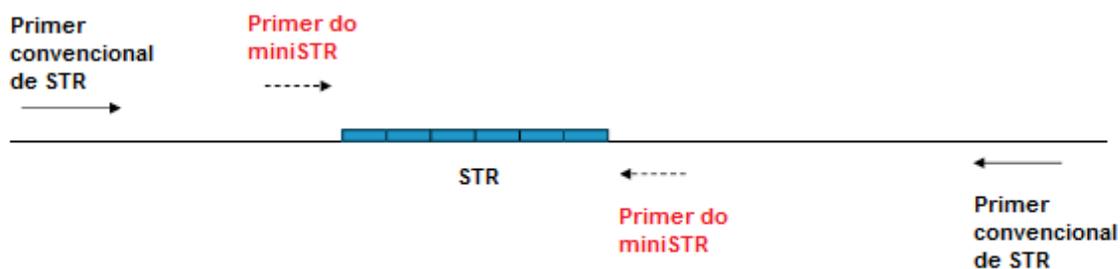


Figura 2: Esquema dos primers de MiniSTR. Amplicons de tamanho reduzido amplificados a partir de primers posicionados em regiões mais próximas das repetições dos STR's convencionais. Fonte: Modificado de BUTLER (2011).

Outro kit de amplificação de mini STR disponível comercialmente é o Power Plex® S5 (Promega), mas possui somente 4 marcadores (D8S1179, D18S51, FGA e TH01) e a Amelogenina.

A capacidade de analisar rotineiramente amostras, como uma ponta de cigarro ou um único fio de cabelo tem excedido as expectativas da maioria dos cientistas que usam essas ferramentas da biologia molecular para caracterizar evidências biológicas forenses (BUDOWLE e VAN DALL, 2009). Recentes avanços em estudos genômicos humanos identificaram uma série de novos marcadores genéticos para a caracterização de materiais biológicos e várias tecnologias foram desenvolvidas simultaneamente para aumentar a resolução e/ou sensibilidade de detecção (GIARDINA et al., 2011).

2.4 Impressões Digitais

As impressões digitais (ID's) têm ampla aplicação desde a sua sistematização. Elas têm contribuído na individualização, na localização de pessoas, assim como na manutenção e no uso de arquivos de identificação civil e criminal em todo o mundo (CROXTON et al., 2010). O processo de identificação de um indivíduo é realizado a partir de detalhes das cristas papilares, e segue um procedimento em conjunto de análise, comparação, avaliação e verificação (GUPTA et al., 2008). As ID's latentes,

por definição, não são visíveis e os métodos de revelação são realizados por meio de uma variedade de técnicas físicas e químicas. O fundamento principal é a aderência mecânica de pós específicos nos componentes úmidos e oleosos das cristas papilares (SODHI e KAUR, 2001) ou reação química de compostos como o cianoacrilato, vapor de iodo, o nitrato de prata ou a ninidrina. Esses métodos de revelação são usados quando as impressões localizam-se em superfícies que possibilitam o decalque da impressão, ou seja, superfícies lisas, não rugosas e não adsorventes (SCHULZ, 2004). A identificação humana por impressões digitais constituem um método simples, rápido e econômico. Entretanto, borrões de impressões depositadas em superfícies rugosas constituem desafio em relação à perda de detalhes (ADYTIA et al., 2011). E, nem sempre os métodos de revelação são suficientes para permitir a análise da impressão digital, pois os pontos observados podem estar borrados ou danificados (BHOELAI et al., 2011).

2.5 Impressões digitais como fonte de DNA

A célula epitelial dura em média cerca de um mês na epiderme antes de sofrer descamação, e o ser humano em geral, descarta cerca de 400.000 células da pele diariamente. As células descamativas da epiderme são constituídas principalmente de queratinócitos, que são anucleados (BALOGH et al., 2003). Kita et al. (2008) verificaram a presença de núcleos e DNA nas células da epiderme utilizando um anticorpo ssDNA, que detectou principalmente a presença de DNA fragmentado. No entanto, estudos mostram que células nucleadas são transferidas através do toque de uma superfície, pelos dedos (GORAY et al., 2009). Células epiteliais, segundo Wichenheiser e Horns (2002) são nucleadas, e cada célula pode conter cerca de 5 picogramas de DNA nuclear. Cada centímetro quadrado de pele contém 100 glândulas sudoríparas e 10 glândulas de óleo (WICKENHEISER e HORNS, 2002). As impressões digitais latentes são resultado da deposição de suor e óleo produzido por essas glândulas que tomam o formato das cristas papilares dos dedos. Essas secreções fazem o seu caminho para a superfície da pele por meio de dutos e poros, levando consigo um grande número de células também. Desse modo, a superfície da pele representa um grande potencial como fonte de perfis genéticos.

Atualmente, kits multiplex de PCR para genotipagem de DNA geram perfis completos com aproximadamente 100 picogramas de DNA purificado (SENIGE et al., 2011).

O princípio de Locard enuncia que, quando dois objetos entram em contato, há troca de material. Esta é a essência da ciência das impressões digitais e da ciência forense em geral. Como o óleo e suor são transferidos para a superfície do suporte em contato com os dedos, estes funcionam como vetores da transferência. O suor e o óleo visualizados em impressões digitais podem também ser o transporte de células epiteliais. Com o grande número de células nucleadas da pele disponíveis para transferência, bem como o pequeno número necessário para produzir um perfil, é razoável concluir que muitos itens entram em contato com a pele durante a prática de um crime – considerando a não utilização de luvas –, aumentando o potencial de obtenção de perfis genéticos de DNA.

Além do DNA proveniente de células de descamação da própria mão, estas podem atuar como vetores de transmissão de células de outras partes do corpo (LADD et al., 1999). Estas áreas incluem da boca, nariz e olhos. Por exemplo, as células de ambos os epitélios da córnea (olho) e o epitélio bulbar (interior das pálpebras e bordas do globo ocular) são nucleadas, e se regeneram continuamente, sendo totalmente substituídas a cada 24 horas (WICKENHEISER e HORNS, 2002). Esfregando os olhos pode-se efetivamente carregar nas mãos DNA para transferência. Da mesma forma, esfregar a face, nariz, e boca, roer unhas, e outros atos inconscientes, pode proporcionar um grande número de células nucleadas nas mãos, disponíveis para a transferência para o próximo objeto tocado.

2.6 Variáveis que afetam a quantidade de DNA disponíveis nas ID's

Visto que o número de células disponíveis em ID's é exíguo, uma série de fatores pode contribuir para o sucesso na obtenção de um perfil genético de DNA do suporte. O tempo de contato, a característica do doador, atividades realizadas anteriormente ao toque, o material do suporte, e fatores ambientais, todas essas variáveis afetam a quantidade e qualidade de DNA disponível para a análise

(KISILEVSKY E WICKENHEISER, 1999). Adicionalmente, a preservação do local de crime, e protocolos adequados de coleta e processamento de material, aumentam as chances de tornar o vestígio de DNA, uma evidência concreta para as investigações.

De acordo com Lowe et al. (2002) alguns indivíduos transferem quantidade elevada de células epiteliais sendo considerados bons doadores de células epiteliais, cuja análise resulta em perfis completos de DNA, outros não. Bright e Petricevic (2004) observaram maior quantidade de DNA em dois dos seus seis doadores em repetidos experimentos. Mas esse não é um fator de consenso entre os autores, que consideram outros fatores tão importantes quanto a característica do doador. Sewell et al. (2008) acreditam que a natureza do suporte pode influenciar a quantidade de impressões deixadas na superfície. Verificou-se que a quantidade de DNA transferida para um suporte durante o manuseio é independente do tempo de manipulação. A transferência de células epiteliais durante o toque em uma superfície é instantânea e testes com tempos de deposição diferentes demonstraram a mesma quantidade de DNA disponível (VAN OORSCHOT e JONES, 1997; ALESSANDRINI et al., 2003). As atividades anteriores ao toque na superfície influenciam consideravelmente na deposição de células. O fato de o indivíduo ter lavado suas mãos, diminui o número de células disponíveis nos dedos (PESARESI et al., 2003). Além disso, se as glândulas sudoríparas estão mais ativas no momento, a probabilidade de transferência de células provindas dos ductos dessas glândulas e de células aderidas aos dedos de outras partes do corpo também aumenta. No momento da realização do fato criminoso, a maioria das vezes, o autor é tomado por nervosismo, o que aumenta a atividade das glândulas sudoríparas.

Popa et al. (2010) consideraram as características morfológicas e bioquímicas das ID's para determinar a sua idade, ou tempo decorrido entre a deposição e sua análise. De acordo com os autores, a taxa de degradação dos constituintes bioquímicos presentes nas ID's depende da sua exposição a fatores ambientais.

O potencial de geração de um perfil completo de DNA é maximizado por um "bom" doador das células epiteliais em um suporte poroso. É interessante citar que a análise lofoscópica tem maior sucesso em superfícies lisas, não porosas, tal como o vidro e de metal polido. Pelo contrário, as superfícies que representam um desafio

na recuperação de boas impressões digitais, tais substratos como madeira sem pintura, são bons substratos para a recuperação de DNA vestígios (RESENDE, 2013).

Superfícies rugosas ou porosas apresentam dificuldade na visualização de impressões digitais, mesmo com a aplicação de reveladores (PESARESI, 2003). Mas, quando o fato leva a crer que um objeto com estas características tenha sido tocado e não há possibilidade de recuperação dos detalhes lofoscópicos da ID's, a coleta de material biológico deve ser realizada. Suportes como a madeira, apresentaram resultados mais satisfatórios que superfícies lisas como o vidro, por exemplo, e a hipótese é a de que a superfície rugosa causa maior fricção nos dedos do doador, além de manter mais células aderidas aos poros (LAGOA, 2007).

No processo de produção de provas, o perito criminal deve considerar a ausência de hierarquia entre elas, mas deve analisar cada vestígio considerando sua viabilidade e efetividade na geração de evidências. Uma superfície deve ser examinada quanto a sua probabilidade em obter uma impressão digital útil, em comparação com a possibilidade em obter um perfil genético. Superfícies lisas, como janelas de vidro podem ser submetidas à análise de impressões digitais latentes inicialmente. Superfícies muito ásperas, como a alça de uma serra ou cabo de um revólver ou cabo de madeira de faca, podem ser direcionadas para coleta das possíveis células epiteliais ali presentes. Determinados tipos de objetos também levam a crer que o manuseio determine força, gerando “borrões” de impressões, que não são úteis à análise lofoscópica.

Pesaresi et al. (2003) realizou testes para investigar a influência de pós de revelação de impressões digitais nos resultados de amplificação de DNA, e obteve perfis completos de amostras de mucosa oral misturadas com esses pós. A hipótese é a de que a aplicação do cianoacrilato, por exemplo, em vez de impossibilitar a análise de DNA, fixe as células no local da impressão digital até a coleta. Considerando os resultados já obtidos nas pesquisas conclui-se que a deposição dos pós de forma mecânica com pincéis reutilizáveis, além de retirar as células epiteliais que porventura existam ali, ainda aumentam as chances de obtenção de perfis de mistura por contaminação (PROFF et al., 2006).

2.7 Desafios de interpretação dos perfis genéticos de impressões

Existem vários termos utilizados para definir amostras de quantidades exíguas de DNA. “Traços” de DNA (*trace DNA*), DNA “tocado” (*touch DNA*), “*low template*” DNA e “*low copy number*” DNA são algumas das nomenclaturas utilizadas na literatura (VAN OORSCHOT et al., 2010). Cada uma se refere ao momento de análise da pequena amostra. Por exemplo, traços de DNA ou DNA tocado referem-se a diminutos vestígios coletados em cenas de crime. “*Low template*” DNA ou DNA de poucas cópias pode ser usado quando se trata do material aplicado no método de amplificação, que costuma gerar efeitos estocásticos, tratados logo em seguida neste trabalho. Enquanto “*low copy number*” DNA é mais específico para amostras que serão submetidas a um aumento do número de ciclos de PCR. Os vestígios biológicos na cena de crime podem ser invisíveis a olho nu, mas mesmo assim serem fonte de quantidades limitadas, mas detectáveis de DNA, por vezes, menos de 100 pg (VAN OORSCHOT et al., 2010; SENGE et al., 2011).

O sucesso e a aceitação generalizada de genotipagem de DNA na ciência forense são devidos, em parte, a sua sensibilidade de detecção (pelo uso de PCR) e a capacidade em analisar amostras de pequenas quantidades. No entanto, quando apenas algumas moléculas estão disponíveis, eventos estocásticos poderão ocorrer, diminuindo a validade e significância da interpretação dos resultados (GE e BUDOWLE, 2014).

O aumento da sensibilidade em uma técnica de detecção normalmente é um recurso valioso para que os resultados sejam obtidos a partir de evidências biológicas de quantidades limitadas. Uma das estratégias é aumentar o número de ciclos da PCR de 28 para 34 ciclos, que com reagentes suficientes, resultariam em um aumento no produto da amplificação (FORSTER et al., 2008; GILL et al., 2000; WHITAKER et al., 2001). Entretanto, o mesmo aumento de sensibilidade que detecta a amostra questionada, pode também detectar células provenientes de transferência secundária (LADD et al., 1999; GORAY et al., 2009) e contaminação do próprio laboratório. O benefício do aumento da sensibilidade decorrente do aumento do número de ciclos de amplificação deve ser contrabalanceado de acordo com a qualidade dos perfis gerados (BALOGH, 2003) (Figura 3).

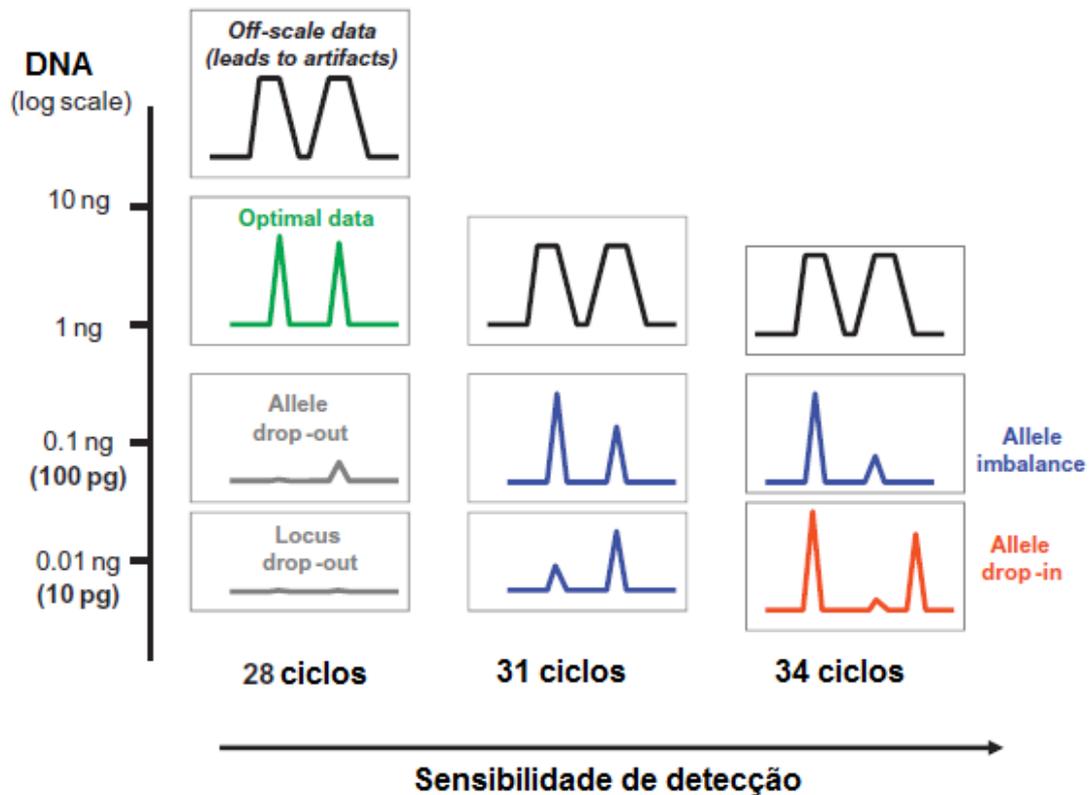


Figura 3. Ilustração de resultados hipotéticos de um locus heterozigótico. Quantidades diferentes de DNA inicial e sensibilidade de detecção modulada pelo aumento do número de ciclos de PCR. Modificado de Butler (2011).

As tentativas de gerar perfis com pequenas quantidades de DNA se deparam com uma barreira científica fundamental denominada amplificação estocástica. Os efeitos estocásticos ocorrem devido à seleção aleatória de alelos das poucas cópias de DNA, nos primeiros ciclos de amplificação por PCR. Quando há um número limitado de DNA molde numa amostra, os primers da PCR utilizados para amplificar uma região específica podem não hibridizar homoganeamente em todos os alelos da amostra e se manifestam como um desequilíbrio substancial de dois alelos em um dado locus heterozigótico (Figura 4). Quando esse efeito é muito acentuado, um dos alelos pode ser suprimido (*allele drop-out*) ou em situações piores, os dois podem ser suprimidos (*locus drop-out*) (BØRSTING et al., 2013; PUCH-SOLIS et al., 2011; COWEN et al., 2011).

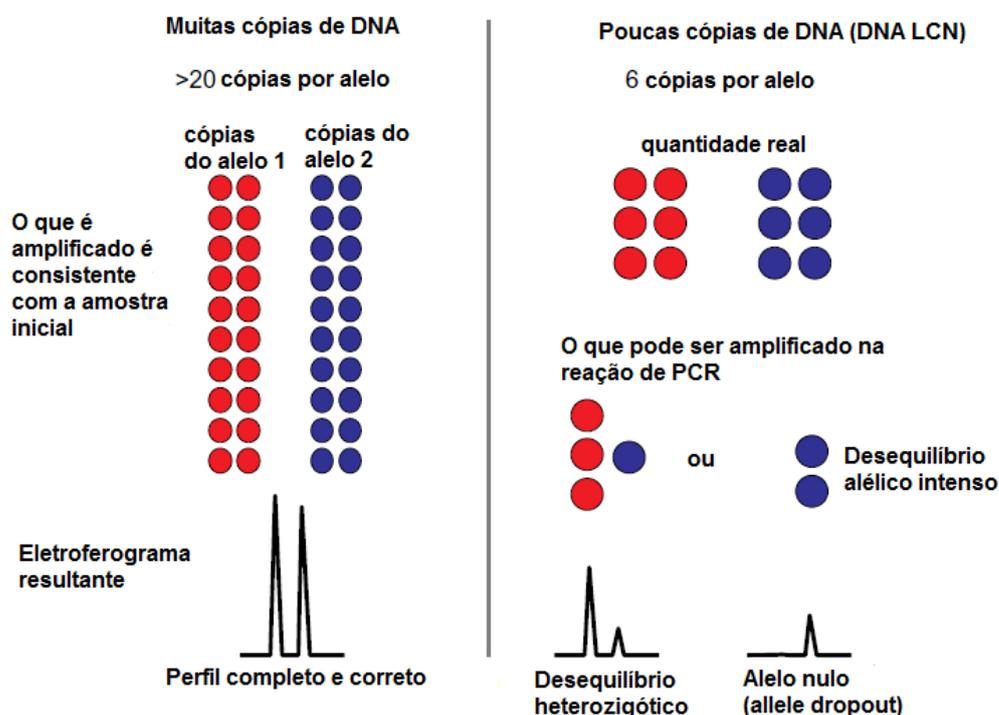


Figura 4. Evento estocástico. Pode ocorrer com amostras em pequenas quantidades de DNA durante a amplificação de dois alelos em um locus genético. Desequilíbrio de alelos, alelo nulo ou locus nulo podem ser exibidos no eletroferograma, não refletindo a amostra original. Modificada de Butler et al. (2011).

Estes artefatos só são visíveis com um número mais elevado de ciclos, porque nestas condições, é possível detectar qualquer molécula de DNA, mesmo quando um dos alelos está sub-representado. Gill et al. (2007) também relatou, por meio de simulação, que a fonte de artefatos provenientes da variação estocástica é a aleatoriedade na seleção de moléculas de DNA, quando este é pipetado para a reação de PCR. O desequilíbrio heterozigótico leva a que dois alelos do mesmo locus possam ter tamanhos muito distintos, sendo por vezes difícil saber se o menor é um alelo. Estes resultados mostram que existe a tendência para um aumento do desequilíbrio heterozigótico com a diminuição da eficiência da amplificação (observada pela altura dos picos) (MULERO et al., 2008). Estas constatações podem levar a conclusão de que quanto mais baixo for o pico, menos confiável é a sua interpretação como pico homozigótico (BRIGHT et al., 2011). Mesmo com esses efeitos estocásticos tornando o controle de qualidade mais problemático, os cientistas trabalham no sentido de aumentar a sensibilidade de detecção para a genotipagem de amostras “low template” de DNA, e prevê-se que este esforço vai continuar. Amostras de baixa quantidade na identificação humana são recorrentes e

crimes de alto volume (tais como roubos) são abundantes e podem fornecer pistas para resolver estes crimes (BUDOWLE e VAN DALL, 2009).

A literatura cita duas estratégias para a análise e interpretação dos alelos num eletroferograma (GE e BUDOWLE, 2014; COWEN et al., 2011). A estratégia do consenso divide a amostra em duas ou mais alíquotas; cada uma é submetida à amplificação, os produtos são analisados e os alelos identificados. Mas somente os alelos presentes em mais de um perfil são considerado como confiáveis. Pressupõe-se nessa estratégia que se o *drop-in* (alelos extras) ocorre randomicamente, observando-se um alelo múltiplas vezes, aumenta-se a garantia de que um alelo seja realmente da amostra e não decorrente de contaminação. Já a estratégia completa, utiliza toda a amostra extraída para uma única amplificação. Alessandrini et al. (2003) defende que a “estratégia completa”, na qual todo o produto de extração é amplificado, é a melhor alternativa para análise genética de impressões digitais já que constitui uma maneira de conseguir perfis mais completos, já que com maior quantidade de DNA de entrada na amplificação, a ocorrência de *drop-out* deverá ser menor.

A análise de perfis de DNA “low template” atualmente tem sido aceita em um limitado número de sistemas da justiça criminal no mundo, mas devido a questões na apresentação e interpretação dos resultados, foram levantadas dúvidas sobre as técnicas empregadas (LINACRE, 2009). Balding (2013) sugere modelos baseados em métodos estatísticos para interpretação de perfis genéticos de DNA “low copy number”, considerando todos os artefatos. É necessário que cada laboratório forense valide suas técnicas no processamento e interpretação de resultados para enfim empregar esse tipo de análise para fins criminais.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO

Impressões digitais latentes são aquelas que embora presentes, não permitem visualização a olho nu, necessitando serem acrescidas de reagentes específicos ou serem examinadas sob efeito de luz especial. Em cenas de crime, em objetos, em armas eventuais ou armas propriamente ditas, as impressões digitais nem sempre possibilitam o estabelecimento de uma ligação com eventual suspeito, ou por estarem incompletas (parciais), ou pela condição de terem sido submetidas ao processo de arraste nas superfícies de contato ou em outros suportes, ou ainda quando não há suspeito nem existe indicação de autoria ou de participação. Assim, a identificação de um perfil genético obtido a partir da análise de impressões digitais passa a se constituir em mais uma importante ferramenta à disposição da Justiça.

A identificação de perfis genéticos a partir da análise de impressões digitais pode ainda ser útil para confronto com outros perfis armazenados em bancos de dados de DNA, obtidos em outras amostras biológicas (como por exemplo, sangue ou sêmen) relacionadas a outros crimes.

Diante da possibilidade de se analisar amostras cada vez menores ou mais degradadas a partir da utilização de reagentes capazes de amplificar polimorfismos mais específicos como os miniSTR's, surge a necessidade de um estudo no sentido de se estabelecer o grau de confiabilidade do exame de DNA em impressões digitais, verificar se é possível a obtenção de perfis completos e conhecer os suportes nos quais este processo possa ocorrer com mais facilidade, tudo isto visando futura incorporação do procedimento de coleta adequada de impressões digitais na rotina de trabalho dos peritos criminais.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Identificar a viabilidade de obtenção de perfis genéticos de polimorfismos de DNA mediante análise de miniSTR's em impressões digitais latentes.

4.2 Específico

- Verificar o grau de confiabilidade do exame de DNA em impressões digitais latentes a partir dos seguintes suportes: plástico, vidro, alumínio e madeira;
- Verificar a possibilidade de obtenção de perfis completos;
- Verificar se há diferença na qualidade dos perfis obtidos entre os suportes testados.

5. METODOLOGIA

5.1 Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – ES e aprovado por meio do parecer consubstanciado número: 541.396 (Anexo I). Todos os doadores de amostras foram informados sobre o protocolo de coleta, objetivos do estudo e confidencialidade das informações obtidas. Foram esclarecidas todas as dúvidas e solicitado que os doadores fizessem a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) antes de sua assinatura e doação das amostras.

5.2 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas em impressões digitais latentes apostas em 4 suportes diferentes: vidro, alumínio, madeira e plástico (Figura 5).

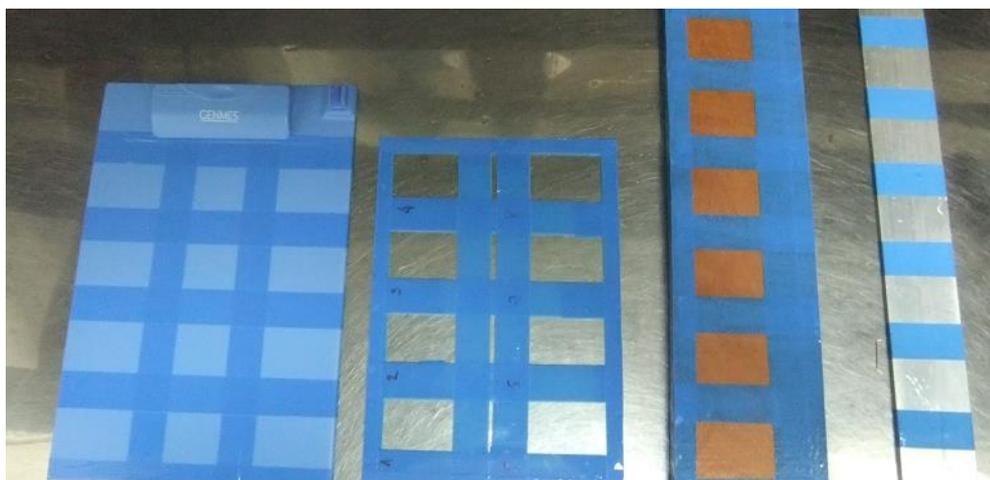


Figura 5. Suportes testados: plástico, vidro, madeira e alumínio, nesta ordem.

Os doadores das amostras, em um total de 25 (vinte e cinco) pessoas maiores de 18 anos de idade produziram as impressões digitais nos suportes descritos, fazendo pressão com duração de 10 (dez) segundos, do dedo indicador da mão direita, sem preparo prévio (limpeza, lavagem, abrasão, etc.), em dias distintos para cada suporte como forma de evitar impressões de menor qualidade nas subsequentes às inicialmente obtidas. Previamente à coleta, os suportes foram limpos com álcool 70% e submetidos à luz U.V. por pelo menos 15 (quinze) minutos.

Logo após a aposição, a impressão digital foi retirada do suporte utilizando para tanto, a ponta de um swab estéril umedecido em água MiliQ, friccionado sobre o suporte de forma perpendicular a este. Como forma de se coletar todas as células, outro swab, desta vez seco, foi friccionado da mesma forma que o primeiro. As pontas dos dois swabs foram cortadas com bisturi estéril e depositadas em um tubo plástico de 1,5ml, nomeados na tampa, de acordo com o suporte no qual foi retirada a amostra, e o doador, e armazenadas em freezer com temperatura de -15°C a -20°C, até o processo de extração.

Adicionalmente, foi recolhida uma amostra controle de células da mucosa bucal de cada um dos indivíduos, friccionando-se um swab estéril na parte interna da bochecha, para posterior comparação com as amostras obtidas das respectivas digitais.

5.3 Critérios de exclusão

Não foram aceitos como sujeitos de pesquisa pessoas em uso recente de benzodiazepínicos e os que tiveram se submetido a exercícios físicos nas últimas 02 (duas) horas, como forma de evitar, respectivamente, ausência e excesso de sudorese, além de menores de 18 anos.

5.4 Extração do DNA

5.4.1 DNA das impressões digitais

Para a extração do DNA, foram adicionados 300µl de água MilliQ e 10µl de Proteinase K (20mg/ml). O tubo foi agitado em agitador do tipo “vortex” e incubado em banho de imersão por 2h à 56°C. Após incubação, o tubo foi limpo externamente com álcool 70%, perfurado com lanceta estéril e colocado no interior de um tubo de 2,0ml e submetido à centrifugação à 7.000rpm por 1 minuto, como forma de retirar os pedaços de swab da solução. Posteriormente, foram adicionados 300µl de Fenol/Cloroforme, invertendo-se o tubo até a solução ficar com aspecto leitoso. A solução foi centrifugada à 14.000rpm por 3 min. A porção aquosa na parte superior da solução bifásica formada foi transferida para um filtro de membrana de 100kDa da marca “Milipore”, juntamente com 100 µl de água MilliQ. O filtro, no interior de um tubo plástico estéril, foi centrifugado à 7.000rpm por 7 min. O filtrado foi dispensado e mais 200µl de água MilliQ adicionada ao filtro seguindo-se de centrifugação na mesma condição, como forma de lavagem. Após concentração da amostra de DNA, o filtro foi lavado com 20µl de água MilliQ, invertido e submetido à centrifugação por 5 minutos, à 2.000rpm. A amostra de DNA foi então congelada à -15°C, até o momento de sua amplificação.

5.4.2 DNA controle (swab bucal)

Para as amostras controles foram utilizadas coletas com swab da mucosa oral dos doadores, que foram armazenadas em freezer (-8°C) até o processo de extração. Foi escolhido o método de extração com a resina Chelex®, já que o método é satisfatório para a quantidade elevada de número de células que esta coleta representa. Uma pequena porção do swab, cortada com lâmina de bisturi estéril e descartável, foi colocada em tubo de plástico de 1,5ml junto com 400 µl de água MilliQ. Depois de homogeneizada, a amostra foi colocada em banho de imersão à 56°C por 2h. Após esse período, o suporte foi retirado da amostra com o método da

“cestinha”, na qual o tubo é furado com agulha estéril e colocado dentro de outro tubo de plástico maior e centrifugado por 30s a 3000rpm. As amostras foram então centrifugadas por 3 min a 14000rpm, e o sobrenadante foi retirado, sobrando o *pellet* em aproximadamente 50 µl de água. Foram adicionados 400µl de fenol/clorofórmio e homogeneizado até formar uma solução leitosa. As amostras foram centrifugadas por mais 3 min a 14000rpm. O sobrenadante (parte aquosa da solução) foi transferido para um filtro de membrana do tipo Microcon 100kDa com mais 100 µl de água MilliQ e centrifugado por 7 min a 7000rpm. Logo após, o processo de lavagem foi repetido com mais 200 µl de água MilliQ e nova centrifugação pelo mesmo tempo e rotação. O filtro, cuja membrana retém a amostra de DNA foi lavado com 20 µl de água MilliQ, pipetando-se repetidas vezes essa água sobre a membrana, como forma de eluir o DNA. O filtro foi então invertido em outro tubo de plástico e centrifugado por 5 minutos a 2000rpm. A amostra de DNA extraído foi então armazenada em freezer (-8°C) até o processo de amplificação.

5.4.3 Controle negativo

Foram submetidos, ao mesmo processo de extração da ID's, controles negativos. Uma coleta foi realizada em cada suporte (alumínio, madeira, plástico e vidro) após mesmo método de esterilização para a coleta das amostras de ID's, sem material biológico depositado, como forma de detectar algum tipo de contaminação desses substratos ou mesmo do próprio swab.

5.4.4 Teste de sensibilidade do kit

A sensibilidade do kit AmpFLSTR® MiniFiler, utilizado neste trabalho, foi testada utilizando-se para isso uma série de diluições de um DNA padrão comercial (DNA Control 007, Applied Biosystems, 10ng/µl) nas seguintes concentrações: 1pg, 10pg, 100pg, 200pg e 1000pg. Utilizou-se, neste caso, o protocolo padrão definido pelo fabricante do kit, com 30 ciclos de temperatura.

5.5 Reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Todas as amostras de ID's foram submetidas à reação de PCR utilizando o kit AmpFLSTR® MiniFiler™ PCR Amplification (Applied Biosystems), como segue:

10µl de mix de reação (AmpFISTR® MiniFiler™ Master Mix)

5µl de Primer mix (AmpFISTR® MiniFiler™ Primer Set)

0,5µl de Taq DNA Polimerase (AmpFISTR® Kit AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, 5U/µl)

10µl de amostra de DNA¹

Os fragmentos foram amplificados em termociclador IQ™5 (BIO-RAD) conforme o ciclo abaixo:

Passo 1: (1x)

Incubação: 95°C - 11min;

Passo 2: (34x)²

Denaturação: 94°C - 20min

Anelamento: 59°C - 2min

Extensão: 72°C - 1min

Passo 3: (1x)

Extensão final: 60°C - 45min

Manutenção: 4°C ∞

¹ Para a amostra controle foi utilizado 1 µl de DNA (10ng/µl). Além dessa alteração, não foi necessário o acréscimo de Taq DNA Polimerase.

² Para a amostra controle foram utilizados 30 ciclos, como descrito pelo fabricante.

5.6 Reação de eletroforese e detecção

Foi preparada uma solução com 9µl de Formamida (Hi-Di™ Formamide) e 1µl de padrão de tamanho molecular (GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard) para cada amostra em um tubo de plástico estéril e agitada em agitador do tipo “vortex”. Foram pipetados 10µl da mistura em uma placa de reação, e cada poço recebeu 1µl de cada produto de PCR das amostras de DNA. As amostras em solução foram então desnaturadas, aquecendo-se a placa de reação em Termociclador IQ™5 (BIO-RAD), em temperatura de 95°C, por 3 min e posterior resfriamento em gelo por mais 3 min.

Os produtos de amplificação foram detectados e separados por electroforese capilar, no sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Thermo Scientific) com um tempo de injeção no capilar de 22 segundos e voltagem de 1Kv; a separação dos fragmentos foi efetuada a 15Kv. A eletroforese foi realizada a 60°C.

5.7 Análises dos resultados

Os resultados foram analisados com o software GeneMapper® ID Analysis v.3.2. As designações alélicas foram determinadas por comparação do peso molecular dos fragmentos obtidos com o ladder alélico do kit AmpFLSTR® MiniFiler™. Na marcação de alelos nos perfis foi considerado, como *peak treshold*, o limite de 100RFU.

A análise dos resultados foi baseada na comparação dos perfis genéticos obtidos de todos os 25 (vinte e cinco) doadores de ID, em todos os suportes com a sua respectiva amostra controle (swab de raspado de mucosa oral). Os alelos coincidentes foram computados e transformados em porcentagem em relação ao

número de alelos da amostra controle, já que os alelos em homozigose foram computados somente uma vez. Por exemplo, um perfil que tenha, relativamente ao Minifiler™, 08 alelos; se numa análise apenas forem detectados 6 alelos, considera-se que se obteve 75% do perfil, ou seja, obteve-se um sucesso de 75%. A conversão em percentagem permite a comparação entre suportes e entre amostras. Inicialmente, não foram considerados os alelos extras ao perfil da amostra controle (*drop-ins*), os quais foram tratados separadamente.

6. RESULTADOS

6.1 Teste de sensibilidade do kit AmpFISTR MiniFiler™

No teste de sensibilidade do kit AmpFISTR MiniFiler, foi possível observar todos os alelos somente com quantidade igual ou acima de 100pg (Figura 6 e Anexo III). Abaixo desse valor, alelos começaram a ser suprimidos.

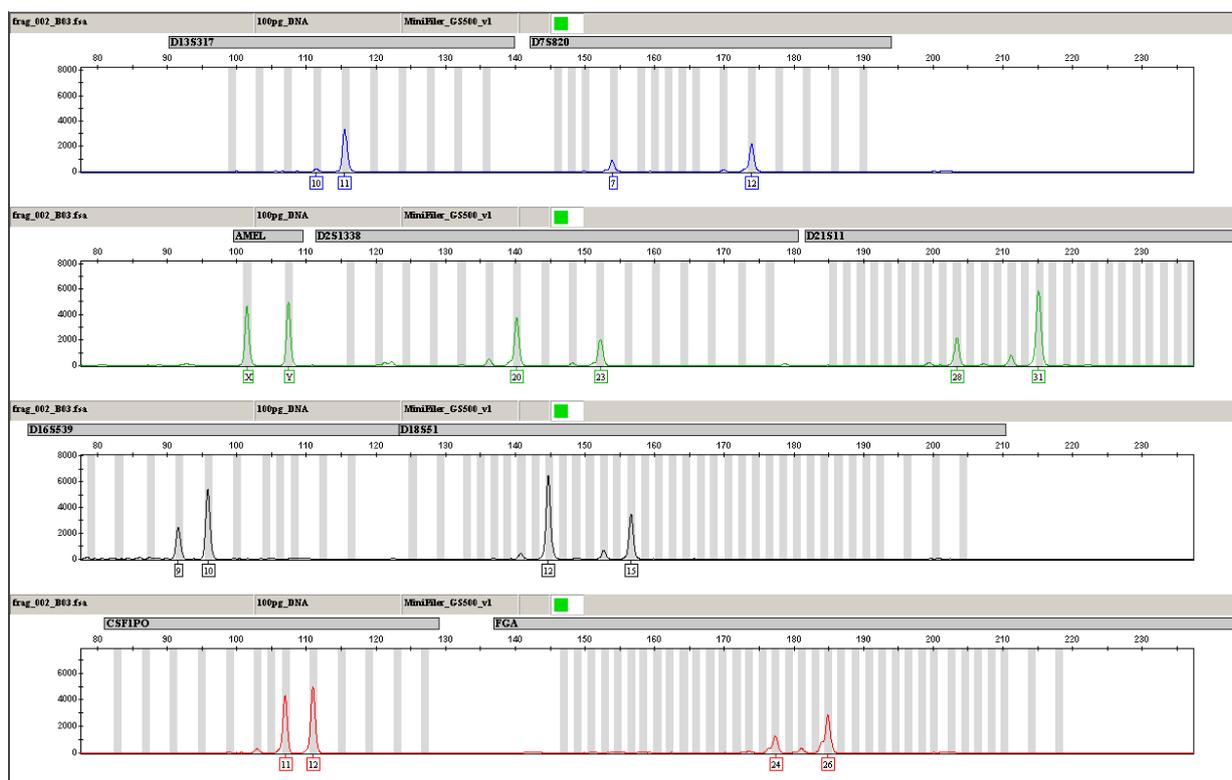


Figura 6. Eletroferograma de amostra controle de DNA de 100pg.

6.2 Amplificação dos miniSTRs autossômicos das impressões digitais

Amplificação do material genético foi obtida em 98% das amostras analisadas em todos os suportes testados e em 100% das amostras controle (raspado de mucosa oral). Apenas em 2 (duas) amostras de ID, que foram coletadas em vidro, dentre todas as 100 (cem) não foi possível observar qualquer pico coincidente de

amplificação de material genético com a amostra controle, enquanto 11 (11%) apresentaram perfil genético completo, sendo 3 (três) obtidas em alumínio, 2 (duas) em madeira, 5 (cinco) em plástico e 1 (uma) em vidro (Tabela 1). No anexo IV é possível observar o eletroferograma gerado na análise de amostra referência de um dos indivíduos, e nos anexos V, VI e VII e VIII as amostras de impressões digitais coletadas nos suportes: madeira, plástico, vidro e alumínio respectivamente.

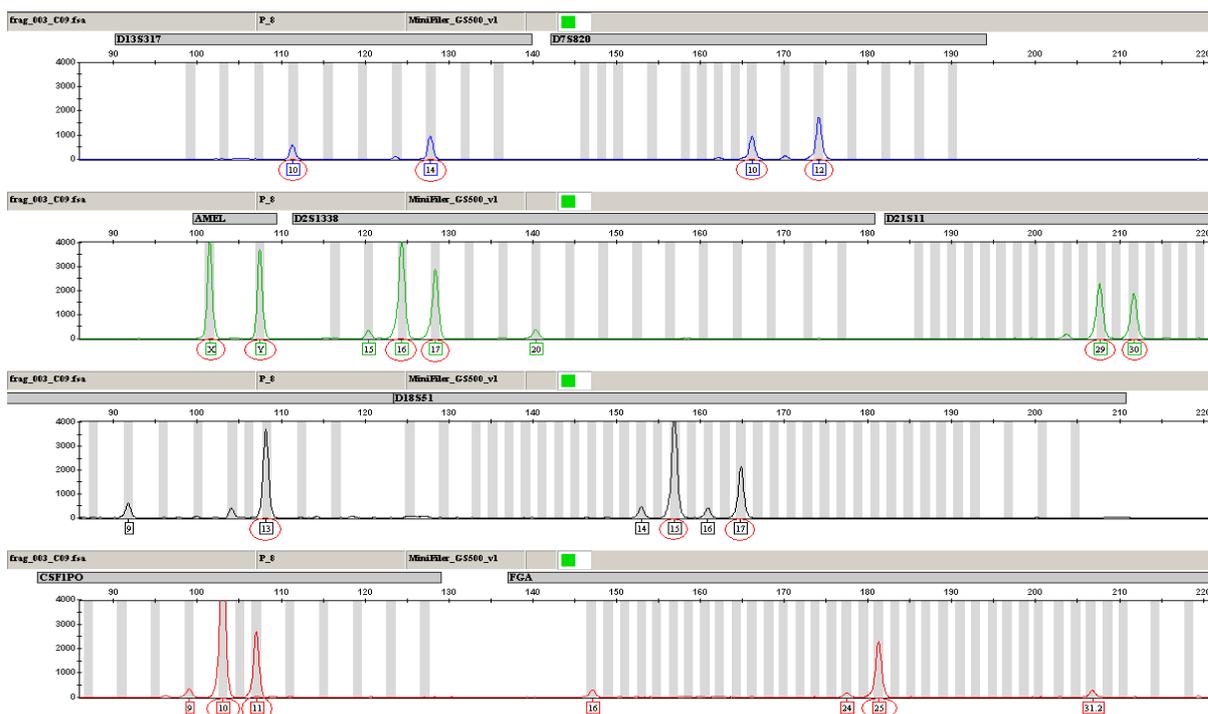


Figura 7. Eletroferograma de uma das amostras de impressão digital. O perfil tem 100% de alelos coincidentes com a amostra controle (swab bucal) circulado em vermelho e alguns alelos extras (*drop-in*).

Os perfis estão apresentados na Tabela 1 de acordo com o número de alelos coincidentes encontrados dos 8 marcadores do kit AmpFISTR MiniFiler sem considerar a amelogenina, que foi analisada separadamente. A figura 7 mostra um exemplo de eletroferograma de perfil completo. No anexo IX, X, XI e XII é possível observar todos os perfis obtidos, dos 25 indivíduos, em todos os suportes testados (alumínio, madeira, plástico e vidro, respectivamente), enquanto os perfis das amostras referências estão no anexo XIII.

Os controles negativos para cada suporte resultaram em amplificação de poucos alelos, muitos deles abaixo do limite de aceitação para análise. Aqueles que passaram desse limite (100RFU) foram considerados como contaminação.

Tabela 1: Número e porcentagem de alelos coincidentes com a amostra controle respectiva, detectados nos diferentes suportes.

AMOSTRAS	REFERÊNCIA*	%	ALUMÍNIO	%	MADEIRA	%	PLÁSTICO	%	VIDRO	%
1	16	100	6	37,50	15	93,75	2	12,50	4	25,00
2	13	100	8	61,54	11	84,62	9	69,23	3	23,08
3	13	100	12	92,31	6	46,15	10	76,92	7	53,85
4	16	100	12	75,00	10	62,50	4	25,00	8	50,00
5	15	100	14	93,33	10	66,67	13	86,67	6	40,00
6	16	100	10	62,50	16	100,00	14	87,50	6	37,50
7	16	100	4	25,00	12	75,00	16	100,00	8	50,00
8	14	100	8	57,14	12	85,71	14	100,00	7	50,00
9	16	100	13	81,25	11	68,75	15	93,75	4	25,00
10	16	100	10	62,50	8	50,00	6	37,50	0	0,00
11	13	100	9	69,23	7	53,85	8	61,54	2	15,38
12	16	100	2	12,50	9	56,25	8	50,00	0	0,00
13	14	100	14	100,00	12	85,71	8	57,14	9	64,29
14	15	100	6	40,00	5	33,33	6	40,00	6	40,00
15	15	100	7	46,67	3	20,00	7	46,67	12	80,00
16	14	100	7	50,00	9	64,29	14	100,00	9	64,29
17	16	100	11	68,75	4	25,00	2	12,50	4	25,00
18	14	100	11	78,57	11	78,57	11	78,57	2	14,29
19	14	100	11	78,57	4	28,57	3	21,43	9	64,29
20	15	100	13	86,67	7	46,67	13	86,67	11	73,33
21	13	100	13	100,00	9	69,23	5	38,46	7	53,85
22	15	100	15	100,00	11	73,33	15	100,00	13	86,67
23	15	100	12	80,00	15	100,00	7	46,67	11	73,33
24	11	100	10	90,91	9	81,82	11	100,00	11	100,00
25	12	100	4	33,33	8	66,67	7	58,33	3	25,00

*Todos os alelos dos 8 marcadores da amostra controle foram detectados, mas os alelos homocigotos foram contabilizados somente uma vez.

Dentre as amostras apostas em alumínio, 3 apresentaram perfil completo, 14 perfis entre 60% e 99%, 8 perfis entre 0 e 59%, e nenhum perfil nulo (Gráfico 1.a). Os perfis obtidos das amostras coletadas em madeira apresentaram 2 perfis completos, 14 entre 60% e 99%, 9 entre 0 e 59% e nenhum nulo (Gráfico 1.b). As ID's recuperadas

do plástico, apresentaram o maior número de perfis completos (5), 12 entre 0 e 59%, 8 perfis entre 60% e 99% e nenhum nulo (Gráfico 1.c). Considerando todas as amostras de ID coletadas no suporte vidro, apenas uma amostra dentre as 25 coletadas apresentou perfil completo e duas amostras não apresentaram amplificação. Em se tratando dos perfis parciais, 15 amostras exibiram o número de alelos entre 0% e 59%, enquanto 7, entre 60% e 99% (Gráfico 1.d). Considerando a média dos alelos computados, as ID's coletadas do suporte vidro foram as que apresentaram menor porcentagem de número de alelos coincidentes com a amostra controle detectados (Gráfico 2).

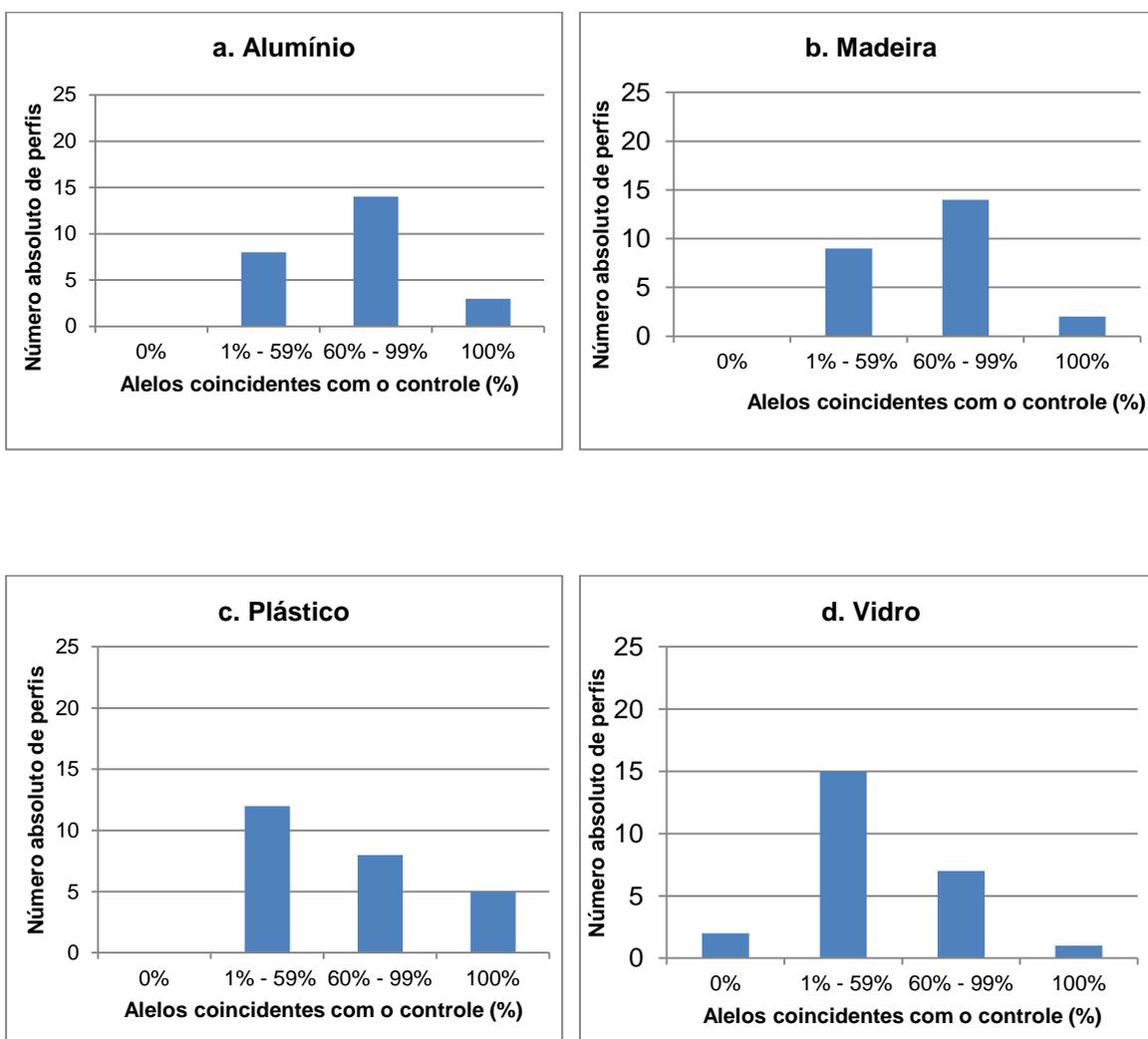


Gráfico 1: Número de perfis genéticos em relação à porcentagem de alelos coincidentes no suporte: alumínio (a), madeira (b), plástico (c) e vidro (d).

Analisando os diferentes suportes, observou-se que as amostras apostas em alumínio apresentaram a maior média de alelos coincidentes com a amostra controle (67,33%). Amostras coletadas de madeira e plástico apresentaram média de 64,66% e 63,48%, respectivamente. Já as ID's coletadas do vidro apresentaram a menor média (45,37%), conforme Gráfico 2.

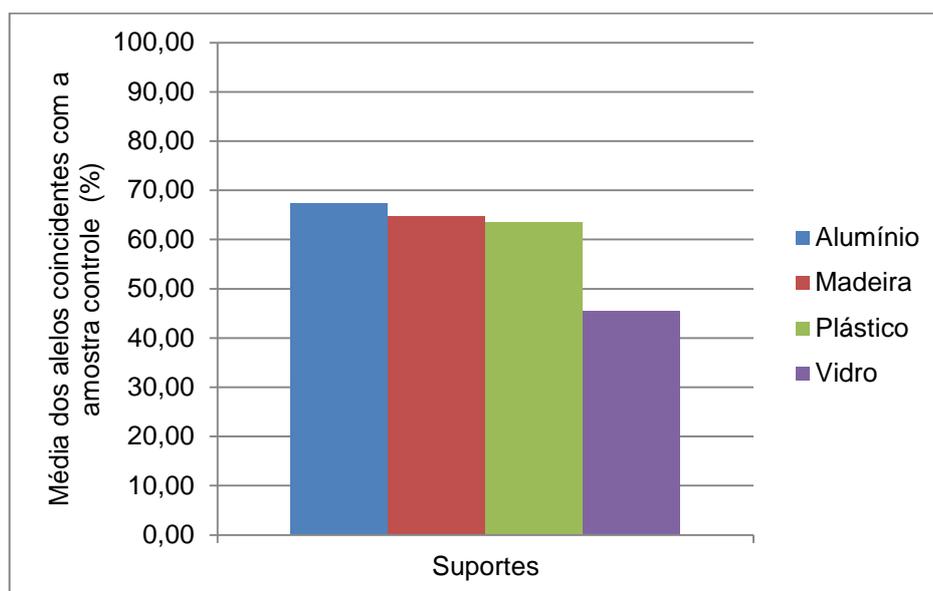


Gráfico 2: Média de alelos coincidentes com a amostra controle de todos os doadores em cada suporte.

6.3 Amplificação da amelogenina das impressões digitais

A determinação de sexo pela Amelogenina foi realizada com os mesmos parâmetros que os outros marcadores do kit MiniFiler. No entanto, seus resultados foram analisados separadamente (Gráfico 3), por determinar uma característica morfológica dos doadores. As amostras recuperadas do plástico foram as que apresentaram maior coincidência com as amostras controle (76%), seguidas das amostras em madeira (72%), vidro (68%) e alumínio (60%).

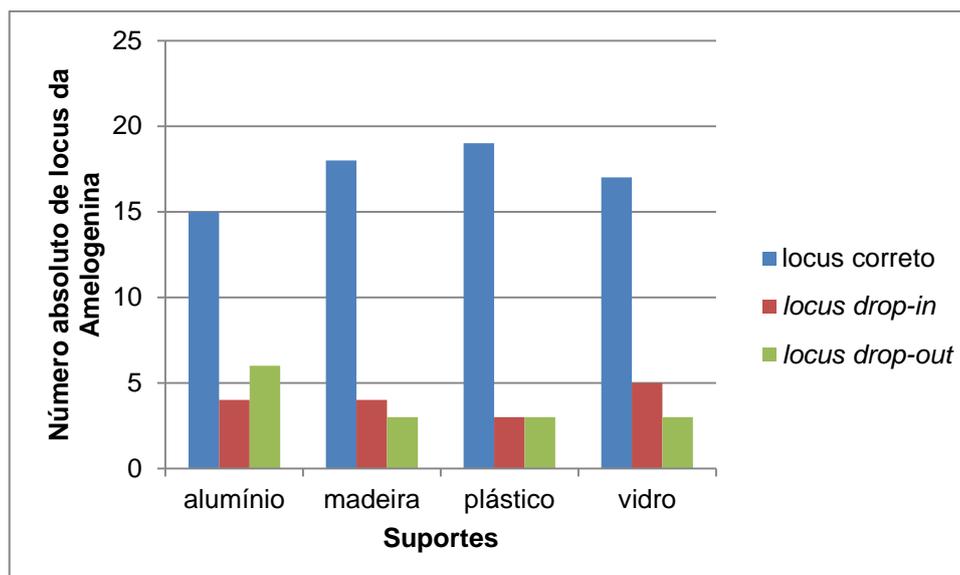


Gráfico 3: Análise da Amelogenina dos 25 doadores de amostras de impressões digitais em cada suporte.

6.4 Amplificação de alelos extra (*drop-in*)

O aparecimento de alelos extra (*drop-in*) – não coincidentes com a amostra controle – foi contabilizado e comparado ao número de alelos coincidentes. Pode-se notar que a proporção deles em relação aos locus corretos é menor em todos os suportes testados, mas o plástico apresentou menor valor de alelos extra em relação aos outros suportes (Gráfico 4). A ocorrência de *drop-in* em cada marcador em porcentagem em relação ao total pode ser observada no anexo XIV.

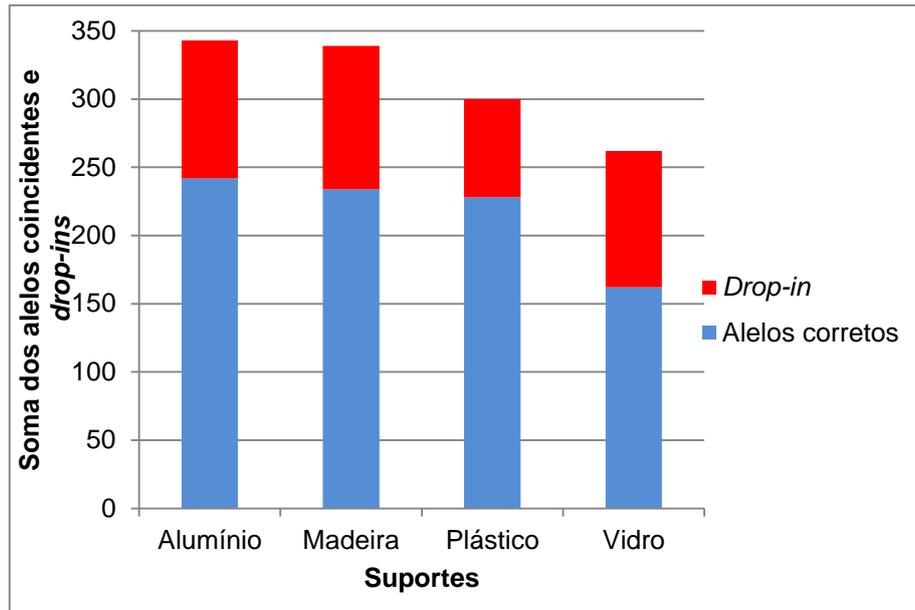


Gráfico 4. Comparação entre a soma de alelos corretos a soma de *drop-ins* das 25 amostras em cada suporte.

6.5 Ocorrência de alelos e locus nulos (*allele* e *locus drop-out*)

Foi contabilizada também a ocorrência de alelos nulos (*allele drop-out*), que seria caracterizada pelo não aparecimento de um dos alelos do locus, analisados separadamente dos locus nulos (*locus drop-out*), quando nenhum dos alelos é detectado em um locus (Gráfico 5). A menor ocorrência de *allele drop-out* foi observada no suporte de alumínio, e a maior, no suporte de vidro. Em relação ao locus drop-out, a menor ocorrência se deu no suporte de madeira, com valor bem aproximado do suporte de plástico, seguido de alumínio, e com maior ocorrência no suporte de vidro. A ocorrência de *drop-out* em cada marcador, por suporte testado, está relacionada em porcentagem no anexo XV.

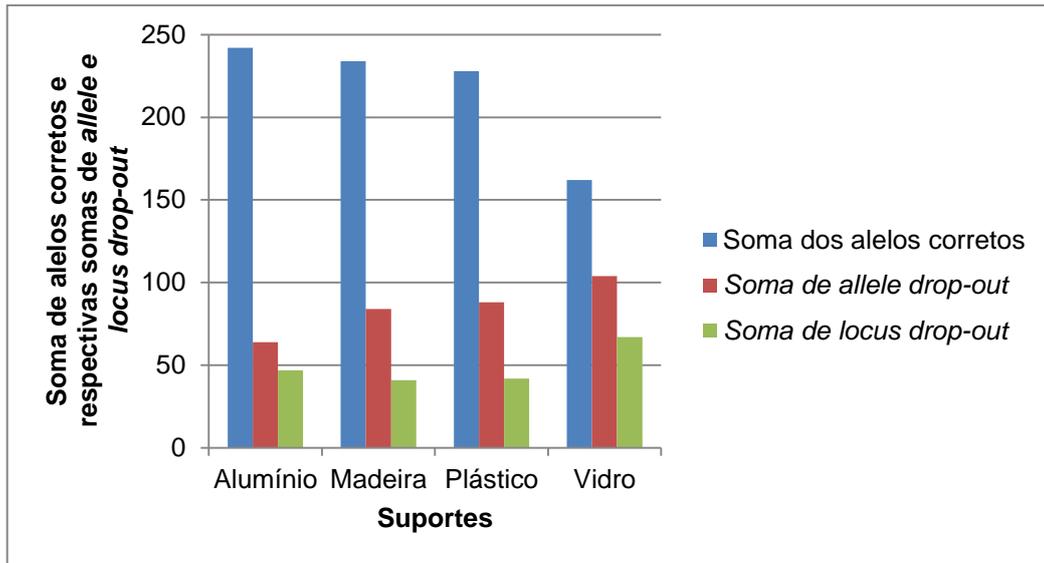


Gráfico 5: Soma dos alelos corretos encontrados em 25 perfis genéticos e respectivas somas de *allele* e *locus drop-out*.

Todos os picos presentes nos perfis dos 25 doadores de ID's foram contabilizados e caracterizados de acordo com a comparação com as amostras controle e comparados com os alelos extras (*drop-in*) e os que não foram detectados (*drop-outs*) (Gráfico 6).

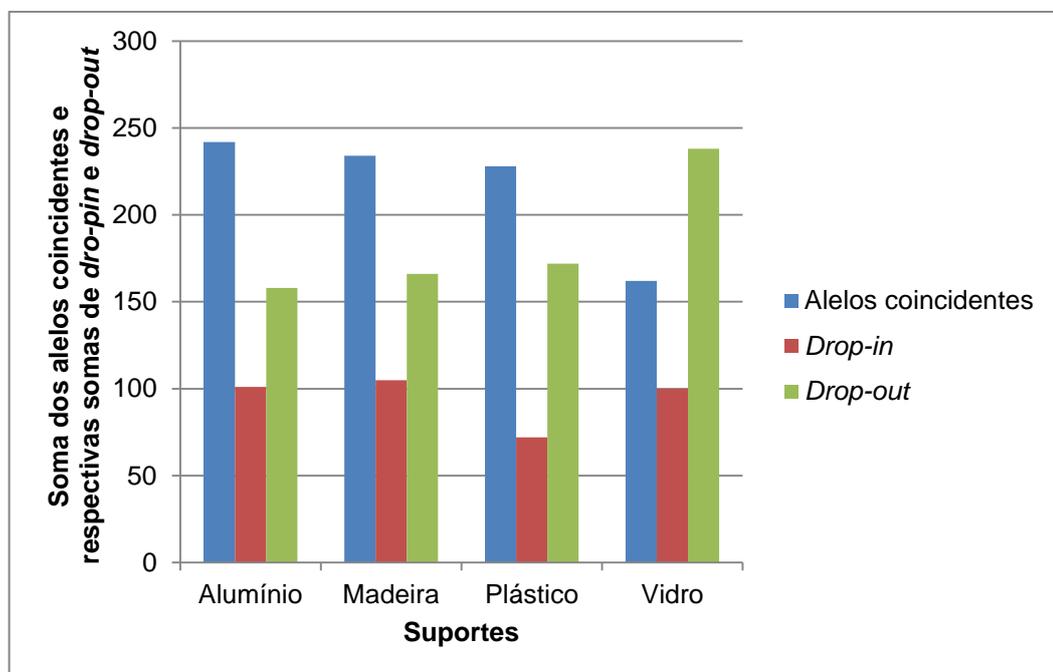


Gráfico 6: Soma dos alelos corretos encontrados em 25 perfis genéticos nos diferentes suportes e respectivas somas de *drop-in* e *drop-out*.

7. DISCUSSÃO

7.1 Teste de sensibilidade do kit

O teste de sensibilidade do kit MiniFiler mostrou uma sensibilidade mínima de 100pg, gerando perfis completos. Entretanto, existe ainda a possibilidade de geração de perfis completos com valores inferiores. Já foi relatado por Gehrig e Teyssier (2008) a obtenção de perfis completos de amostras com 40pg/μl com o kit MiniFiler. Gill et al. (2000), conseguiu obter perfis completos, amplificando amostras entre 25 – 50pg de DNA inicial. Os marcadores de miniSTR tem como principal vantagem, iniciadores (*primers*) que hibridizam em fragmentos menores de DNA em relação aos outros kit de STR, possibilitando a amplificação de amostras exíguas e/ou degradadas. Além da vantagem dos miniSTR's, todos esses trabalhos que demonstraram o sucesso na obtenção de perfis de DNA “low copy number” utilizaram como estratégia, o aumento do número de ciclos da PCR. Neste trabalho, também modificamos esse parâmetro por se tratar de uma única impressão digital como fonte de DNA, permitindo a obtenção de alelos nos eletroferogramas de amostras com baixas concentrações de DNA.

7.2 Amplificação dos miniSTRs autossômicos das impressões digitais

7.2.1 As impressões digitais como fonte de material genético

As impressões digitais podem ser vistas sob outro aspecto além da identificação lofoscópica normalmente já realizada. Elas podem atuar como fonte de material biológico para obtenção de perfis genéticos para determinar a presença de indivíduos em um local de crime (ADYTIA et al., 2011; WICKENHEISER e HORNS, 2002). Em ocorrências que não são comuns o encontro de material biológico, como sangue, sêmen, saliva, como os crimes patrimoniais, por exemplo, as ID's se tornam vestígios importantes para obtenção de células epiteliais dos participantes de um crime. As impressões digitais latentes, nem sempre são submetidas à identificação

lofoscópica, muitas vezes, por estarem em superfícies rugosas, que não são propícias à deposição dos detalhes analisados da ID ou simplesmente porque estão incompletas (borrões de impressões digitais). Além disso, os métodos empregados para o exame, baseados na revelação das impressões com pós, já demonstraram não degradar o DNA por completo (LEEMANS, 2006; RESENDE, 2013). Outra alternativa é a utilização de luzes forenses pois possibilitam a visualização de vestígios latentes. Tanto as ID's visíveis, quanto as latentes após revelação, ao serem fotografadas em vez de coletadas por fitas adesivas para identificação dos pontos, permitem a coleta e submissão à análise genética das células epiteliais ali presentes, propiciando assim, maior número de vestígios.

Balogh et al. (2003) relataram que a maioria das células epiteliais de impressões digitais latentes analisadas sob o microscópio de luz eram corneócitos caracterizados por ausência de núcleo, com uma mínima incidência de células nucleadas. Kita et al. (2008) sugerem também que, apesar de serem anucleados, os queratinócitos podem ter quantidades residuais de DNA, possivelmente resultado da degradação incompleta do DNA por endonucleases dependentes de Ca^{2+}/Mg^{2+} que fragmentam este material genético em porções de aproximadamente 200 pares de bases. Mas outros estudos defendem que durante o processo de queratinização, grandes organelas, incluindo o núcleo, são perdidas e as eventuais células nucleadas encontradas nas ID's são provenientes da transferência de células de outras partes do corpo, ou podem ainda ser oriundas de ductos de glândulas (QUINONES e DANIEL, 2012). Daly et al. (2012) e Farber et al. (2010), demonstraram a exígua quantidade de DNA extraída de amostras de impressões digitais. Sewell et al. (2008) constataram maior quantidade de DNA recuperado quando os doadores de impressões digitais eram solicitados a esfregarem suas mãos no rosto e cabelos, antes da deposição das impressões. Considerando que pessoas destros utilizam sua mão direita com maior frequência que a esquerda para tocar em superfícies e também em partes do próprio corpo, Phipps e Petricevic (2007) demonstraram que a quantidade de DNA obtido era influenciada também pela mão utilizada para deposição. Neste trabalho então, foi padronizada a aposição de impressões com o dedo direito dos doadores, considerando que a maioria da população é constituída de destros.

O dedo indicador da mão direita foi escolhido para a coleta por representar aquele que é mais utilizado para segurar objetos, além de ser da mão mais utilizada pela maioria da população (destros). O tempo de aposição foi estabelecido em 10 segundos, apenas como padrão. Estudos já demonstraram que o tempo de toque não tem influência sobre a quantidade de DNA transferido para o suporte. Impressões digitais depositadas em diferentes períodos de pressão dos dedos (1, 2, 5, 10, 30, 50 e 60 segundos) não demonstraram diferenças significativas (BALOGH et al., 2003).

As ID's foram coletadas dos suportes logo após a aposição, retirando do estudo a variável da influência do tempo de exposição à degradação das células pelas condições ambientais. Popa et al. (2010) já demonstraram a relação diretamente proporcional entre o tempo de deposição de uma impressão digital e sua degradação morfológica e bioquímica.

Em relação à quantidade de células em uma ID, Phipps e Petricevic (2007) concluíram em seu trabalho que um doador não pode ser rotulado de bom ou mau doador, e que a quantidade de DNA depositada por um indivíduo não será constante a cada deposição. Apesar da quantidade de DNA em uma ID ser influenciada por muitos fatores e a maioria não permitir controle, fixamos alguns padrões neste trabalho para testar suportes diferentes. Os mesmos indivíduos foram solicitados para doar suas impressões nos quatro suportes, mas em momentos distintos, já que após a primeira pressão dos dedos, boa parte das células disponíveis já foi deixada e as subseqüentes coletas teriam cada vez menor quantidade de DNA. Variáveis como o doador, atividades anteriores à deposição ou lavagem das mãos, que poderiam influenciar na qualidade do perfil genético obtido foram fixadas – apenas os suportes seriam testados, com o objetivo de determinar qual proporcionaria a melhor recuperação de DNA de impressões digitais.

Neste trabalho, optou-se por utilizar suportes estéreis, mas não foi solicitado que os doadores lavassem as mãos antes da coleta. Desse modo, além de material biológico do próprio doador, é possível que haja células provenientes de outras pessoas com as quais o doador entrou em contato ou até de outros objetos que possuíam células de outras pessoas – transferência secundária. Nesses casos, não

houve contato direto do doador original com a superfície na qual as células foram depositadas.

Em ocorrências criminosas nas quais um grande número de vestígios é submetido à análise, tempo e recursos devem ser investidos em itens com maiores perspectivas de sucesso na obtenção de perfis genéticos que auxiliem na elucidação de autoria (PESARESI et al., 2012). Atualmente, com a maior sensibilidade das técnicas de detecção de material genético, pequenas amostras, antes consideradas inúteis, não podem ser desprezadas.

Os resultados obtidos da análise dos perfis neste trabalho demonstrou sucesso maior obtido na recuperação e amplificação de impressões digitais apostas no alumínio. Maior média de alelos coincidentes (67,33%) e perfis parciais (14) foram obtidos neste suporte. O plástico e a madeira foram suportes que proporcionaram médias bem parecidas de alelos coincidentes com a amostra controle (63,48% e 64,66% respectivamente), mas quando a distribuição dos perfis independentes é observada, é possível concluir que foi possível recuperar maior número de perfis completos do plástico (5), em relação à madeira (2). Os valores de média e distribuição dos perfis de acordo com a porcentagem de alelos coincidentes no vidro representam o pior dos suportes testados. Como foi dito anteriormente, há de se considerar que um suporte rugoso pode, em princípio, proporcionar maior aderência de células, disponibilizando quantidade de material biológico suficiente para genotipagem, mas os métodos de coleta devem ser eficientes o bastante para recuperá-las desse suporte. Com os resultados obtidos neste trabalho, não se pode atribuir a rugosidade do suporte ao sucesso na genotipagem, como em Resende (2013) e Van Hoofstat et al. (1999).

Em trabalho de Daly (2012), desenvolvido no Laboratório de Ciência Forense do Governo da Irlanda, são admitidos como perfis genéticos de vestígios úteis à investigação aqueles que apresentam um mínimo de 6 alelos (supostamente do mesmo indivíduo), no total de 10 marcadores do kit de amplificação AmpFISTR® SGM Plus™. Como neste trabalho, o kit de amplificação utilizado (AmpFISTR® MiniFiler™) só possui 8 marcadores, decidiu-se por considerar como perfis satisfatórios, os que exibiram mais de 60% de alelos corretos (coincidentes com a amostra controle). Considerando apenas os alelos coincidentes, essa porcentagem

seria suficiente para direcionar investigações sobre um fato. Sob esse aspecto, 68% dos perfis obtidos do suporte alumínio, 64% em madeira, 52% em plástico e 32% em vidro seriam úteis para direcionar uma interpretação sobre um fato criminoso. Caso seja considerado como perfil útil, apenas aqueles completos (com 100% dos alelos coincidentes com a amostra controle), o plástico (20%) exibiu o melhor resultado, seguido do alumínio (12%), madeira (8%) e, por último, vidro (4%).

7.3 Estratégias para amplificação *Low Copy Number* (LCN)

Como recurso para amostras degradadas e com pouca quantidade de DNA, o aumento do número de ciclos da PCR também foi empregado (FORSTER et al., 2008). Foram estabelecidos 34 ciclos, em vez de 30 recomendados pelo fabricante, como forma de aumentar a sensibilidade da técnica de amplificação, e permitir a detecção de quantidades cada vez menores de DNA. Em testes iniciais realizados com o kit Amp FISTR MiniFiler, não houve amplificação do material genético com 30 ciclos. Ainda, na amplificação das amostras neste estudo, 0,5 µl de DNA TaqPolimerase (AmpliTaq Gold® - Applied Biosystems) foi adicionada, apesar do mix de reação do kit já conter essa polimerase, como forma de aumentar o sucesso da amplificação. Adytia et al. (2011) relataram análise de um caso forense em que a superfície de uma pá foi analisada e confrontada com o perfil obtido de sangue do suspeito de um assalto e, com o uso da estratégia de aumento de 6 ciclos de PCR com o kit AmpFISTR MiniFiler e adição de 0,5 unidade de Taq DNA polimerase foi possível obter o perfil completo da amostra questionada.

7.4 Amplificação da amelogenina das impressões digitais

Os resultados obtidos demonstraram sucesso maior de amplificação dos alelos corretos da amelogenina (Gráfico 3) comparado ao restante do perfil. O menor tamanho de fragmentos X e Y (107-112pb), em relação aos 8 marcadores aumenta a probabilidade de amplificação em amostras degradadas ou em quantidades ínfimas de DNA.

7.5 Amplificação de alelos extra (*drop-in*)

Os resultados de análise de DNA “low copy number” ou “low template” exibem quantidades maiores de efeitos estocásticos quando comparadas a amostras com quantidades maiores de DNA disponíveis. Esses efeitos apresentam desafios relacionados com a confiabilidade da interpretação de perfis de DNA e validade do significado ou peso do resultado interpretativo (COWEN et al., 2011). Perfis de mistura, que diminuem estatisticamente o poder dos resultados, são provenientes das células do doador principal junto com contaminação oriunda de outras pessoas, ou mesmo de outros objetos que foram tocados anteriormente por uma pessoa e suas células foram transferidas do objeto para o doador principal, ou ainda por contaminação do próprio laboratório. O material biológico estranho na pele da própria pessoa que deixa a impressão digital, impressões pertencentes a mais de uma pessoa, talvez nem participante do crime sob investigação, pode ser detectado devido à grande facilidade de como o material é depositado (PESARESI, 2003).

Estes resultados evidenciam que, quando se amplifica uma amostra em condições LCN, é necessário ter um cuidado extremo com contaminantes; quando se trata de miniSTR, que têm uma sensibilidade superior, esses cuidados devem ser ainda maiores pois, como se verificou, é mais fácil detectar qualquer alelo, inclusive contaminantes. Assim, estes artefatos devem ser levados em consideração, devido à facilidade com que se introduzem erros nos perfis (LAGOA, 2007).

Na literatura, foram descritas duas estratégias de análise de amostras LCN (GE e BUTLER, 2014). Uma delas é a estratégia do consenso, na qual a alíquotas da amostra são amplificadas repetidas vezes, e apenas os alelos consenso são aceitos

como fiéis (COWEN et al., 2011). Já a estratégia completa, analisa o total da amostra extraída, amplificada somente uma vez.

Neste trabalho optou-se pela “estratégia completa” na qual todo ou quase todo o conteúdo extraído da amostra é submetido à amplificação, já que a amostra obtida de ID's tem exígua quantidade de DNA e por demonstrar em LCN (GE e BUDOWLE, 2014) que amostras analisadas por essa estratégia apresentam menor taxa de *drop-outs*.

Em princípio, quando se obtém perfis de misturas, a contribuição principal de alelos é proveniente do doador primário, enquanto os menores picos referem-se a transferências secundárias ou adventícias. Entretanto, quando se analisam amostras LCN e ainda se utilizam recursos como o aumento do número de ciclos de PCR, quantidades ínfimas de DNA são detectadas, dificultando a distinção entre o perfil do indivíduo que realmente tocou em um objeto, daqueles outros alelos provenientes de contaminação ou variações estocásticas (Figura 3).

Em um caso forense, no qual o objetivo da investigação é justamente determinar a identificação do doador de uma amostra, a distinção entre alelos corretos e contaminação é muito mais controversa.

Neste trabalho, a ocorrência de alelos extra (*drop-in*) foi bastante similar em todos os suportes, com exceção do plástico que apresentou resultado aproximadamente 30% menor que no vidro, madeira e alumínio.

Assim como na amplificação dos marcadores, a amelogenina também pode ser afetada pelos efeitos da amplificação preferencial, e mesmo em menor proporção, contaminantes ou células estranhas a dos doadores da ID podem amplificar e serem expressivos no perfil em relação aos outros alelos. Assim como há sucesso na detecção de fragmentos menores como os da amelogenina, fragmentos de contaminação também são detectados. Neste trabalho, como a amelogenina possui apenas dois alelos possíveis, a ocorrência de alelos extras foi menor em relação aos outros marcadores.

7.6 Ocorrência de *allele* e *locus drop-out*

Outro fator que dificulta a análise de amostras LCN é a amplificação preferencial que ocorre quando poucas células estão presentes na amostra e, no momento da pipetagem, nem sempre uma alíquota homogênea dos constituintes da solução é coletada. Alguns alelos podem amplificar em maior número, o que resulta em desequilíbrio heterozigótico nos eletroferogramas, e em casos mais acentuados ocorre *allele drop-out* (supressão de alelos do perfil) (PUCH-SOLIS et al., 2011). Estes artefatos só são visíveis com um número mais elevado de ciclos, porque nestas condições, é possível detectar qualquer molécula de DNA, mesmo quando um dos alelos está sub-representado. Gill et al. (2005) também relatou, por meio de simulação, que a fonte de artefatos provenientes da variação estocástica é a aleatoriedade na seleção de moléculas de DNA, quando este é pipetado para a reação de PCR. O desequilíbrio heterozigótico leva a que dois alelos do mesmo locus possam ter tamanhos muito distintos, sendo por vezes difícil saber se o menor é um alelo. Estes resultados mostram que existe a tendência para um aumento do desequilíbrio heterozigótico com a diminuição da eficiência da amplificação (observada pela altura dos picos) (MULERO et al., 2008). Estas constatações podem levar a conclusão de que quanto mais baixo for o pico, menos confiável é a sua interpretação como pico homozigótico.

É possível observar, de acordo com o Gráfico 5, que o número de *allele drop-out* é significativo em todos os suportes testados, e que a sua ocorrência pode ser determinada pela natureza degradada e exígua das ID's. Os valores de *allele drop-out* e *locus drop-out*, são inversamente proporcionais ao número de alelos corretos detectados nas amostras, por isso seguem ordem inversa de ocorrência. Como neste estudo, os perfis das amostras controle estavam disponíveis para comparação com os perfis das amostras de ID's, obviamente a determinação do que seria um alelo correto, ou *drop-out* é certa.

Para os sistemas homozigóticos, o sucesso é mais elevado do que para os outros sistemas, pelo simples fato de serem homozigóticos. A probabilidade de se observar o genótipo correto (homozigose) é superior à de se observar o genótipo correto para um sistema heterozigótico; porque, nos sistemas homozigóticos, mesmo que ocorra

allele drop-out, o outro alelo é detectado, fornecendo o genótipo correto (LAGOA, 2007). A probabilidade de se observar, pelo menos, um dos alelos (que vai resultar no perfil correto num sistema homozigótico) é superior à de se observar os dois alelos necessários para se obter o perfil correto num sistema heterozigótico.

Observa-se neste trabalho, que o perfil é mais afetado por *allele drop-out* do que por *drop-in* (Gráfico 5), o que ocorreu em todos os suportes considerados. Conclui-se então que o maior problema enfrentado na análise dessas amostras foi a quantidade exígua de amostra, e em menor grau a contaminação, que constitui um problema característico do aumento do número de ciclos da PCR e consequente sensibilidade de detecção.

8. CONCLUSÕES

- O kit de amplificação AmpFISTR MiniFiler™ é capaz de amplificar amostras com supostas quantidades baixas de DNA como as de impressões digitais;
- É possível obter perfis genéticos, parciais e completos, de impressões digitais apostas nos suportes: alumínio, madeira, plástico e vidro;
- Perfis completos foram obtidos com maior sucesso na superfície de plástico, seguido da superfície de madeira, alumínio, e por último, vidro.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA, S.; KALPANA, D.; BHATTACHERJEE, S.; SHARMA, A.K. Low copy number DNA typing of touched evidence by miniSTRs – A case study. Indian Journal of Biotechnology. Vol 10, (147 – 149), 2011.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS J; RAFF, M; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell, 2002.

ALESSANDRINI F.; CECATI M; PESARESI M; TURCHI C; CARLE F. Tagliabracci. A. Fingerprints as Evidence for a Genetic Profile: Morphological Study on Fingerprints and Analysis of Exogenous and Individual Factors Affecting DNA Typing. J Forensic Sci, vol. 48, 2003.

BALDING, D.J. Evaluation of mixed-source, low template DNA profiles in forensic science. PNAS, vol. 110, (12241 – 12246), 2013.

BALOGH, K.M.; BURGER, J.; BENDER, K.; SCHNEIDER P.M.; ALT, K.W. Fingerprints from fingerprints. International Congress Series. Vol. 1239, (953 - 957), 2003.

BHOELAI, B.; JONG, J.; PUIT, M.; SIJEN, T. Effect of common fingerprint detection techniques on subsequent STR profiling. Forensic Science International, 2011.

BØRSTING, C.; MOGENSEN, H.S.; MORLING, N. Forensic genetic SNP typing of low-template DNA and highly degraded DNA from crime case samples. Forensic Science International, vol. 7, (345 – 352), 2013.

BRIGHT, J.; HUIZING, E.; MELIA, L.; BUCKLETON, J. Determination of the variables affecting mixed MiniFiler™ DNA profiles. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 5 (381 – 385), 2011.

BRIGHT, J. e PETRICEVIC, S.F. Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Science International*, vol. 145. (7 – 12), 2004.

BUDOWLE, B.; VAN DAAL, A. Extracting evidence from forensic DNA analysis: future molecular biology directions. *Biotechniques*, vol. 46, 2009.

BUTLER, J.M. *Advanced topics in forensic DNA typing*. Maryland: Elsevier, 2011.

COWEN, S.; DEBENHAM, P.; DIXON, A.; KUTRANOV, S.; THOMSON, J; WAY, K. An investigation of the robustness of the consensus method of interpreting low-template DNA profiles. *Forensic Science International: Genetics*, vol.5, (400-406), 2011.

CROXTON, R.S.; BARON, M. G.; BUTLER. D.; KENT, T.; SEARS, V. G. Variation in amino acid and lipid composition of latent fingerprints, *Forensic Science International*, vol. 199 (93- 102), 2010.

DALY,.DJ; CHARLOTTE, M.; SEAN D. M. The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. *Forensic Science International: Genetics*, vol.6, (41-46), 2012.

FARBER, D.; SEUL, A.; WEISSER, H-J.; BOHNERT, M. Recovery of latent fingerprint and DNA on human skin. *Journal of Forensic Sciences*, Vol, 55, (1457 – 1461), 2010.

FORSTER, L.; THOMSON, J.; KUTRANOV, S. Direct comparison of post-28-cycle PCR purification and modified capillary electrophoresis methods with the 34-cycle “low copy number” (LCN) method for analysis of trace forensic DNA samples. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 2, (318 – 328), 2008.

GEHRIG, C.; TEYSSIER, A. Internal validation of the AmpFISTR MiniFiler kit. *Forensic Science International, Genetic Supplement Series*, vol. 1, (115 – 117), 2008.

GE, J.; BUDOWLE, B. Modeling one complete versus triplicate analysis in low template DNA typing. *Int J Legal Med*. Vol. 128 (259 – 267), 2014.

GIARDINA, E.; SPINELLA, A.; NOVELLI, G. Past presente and future of forensic DNA typing. *Nanomedicine*, vol. 6, (257 – 270), 2011.

GILL, P.; WHITAKER, J.; FLAXMAN, C.; BROWN, N.; BUCKLETON, J. An investigation of the rigor interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International*, vol 112, (17-40), 2000.

GILL, P.; KIRKHAM, A.; CURRAN, J. LoComatioN: a software tool for the analysis of low copy number DNA profiles. *Forensic Science International*. vol. 166 (128-138), 2007.

GILL, P.; JEFFREYS, A.J.; WERRETT, D.J. Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature*. Vol. 318 (577 – 579), 1985.

GORAY, M.; EKEN, E.; MITCHELL, R.J.; VAN OORSCHOT, R.A.H. Secondary DNA Transfer of Biological Substances under Varying Test Conditions. *Forensic Science International: Genetics*, 2009.

GUPTA, K.; BUCKLEY, R; SUTTON, R. Latent fingermark pore area reproducibility. *Forensic Science International*, vol.179, (172 – 175), 2008.

JOBIM, L. F; L. R, COSTA e M, da SILVA. Identificação Humana: Identificação Médico Legal, Perícias Odontológicas, Identificação Humana pelo DNA. 2ª Ed. Editora Millennium. Campinas/ SP. 2012.

KISILEVSKY, A.E.; WICKENHEISER, R.A. DNA PCR profiling of skin cells transferred through handling. *Proceedings of the Annual Meeting of the Canadian Society of Forensic Science*, 1999.

KITA, T.; YAMAGUCHI.H.; YOKOYAMA, M.; TANAKA, T.; TANAKA, N. Morphological Study of Fragmented DNA on Touched Objects. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 3, (32 – 36), 2008.

LADD, C.; ADAMOWICZ, M.S.; BOURKE, M.T.; SCHERCZINGER, C.A.; LEE, H.C. A systematic analysis of secondary DNA transfer. *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 44, (1270 – 1272), 1999.

LAGOA, A. M. Análise genética de impressões digitais – amostras low copy number. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses), Universidade do Porto, Porto, 2007.

LEEMANS, P.; VANDEPUT, A.; VANDERHEYDEN, N. CASSIMAN, J.; DECORTE, R. Evaluation of Methodology for the Isolation and Analysis of LCN – DNA Before and After Dactyloscopic Enhancement of Fingerprints. International Congress Series, vol. 1288, (583 – 585), 2006.

LINACRE, A. Review of low template DNA typing. Forensic Science International: Genetic Supplement Series, vol. 2 (549 – 550), 2009.

LOWE, A.; MURRAY,C.; WHITAKER, J.; TULLY,G.; GILL.P. The Propensity of Individuals to Deposit DNA and Secondary Transfer of Low Level DNA from Individuals to Inert Surfaces. Forensic Science International, vol. 129, (25-34), 2002.

LUCE, C.; MONPETIT, S.; GANGITANO, D.; O'DONNELL, P. Validation of the AmpFISTR®MiniFiler™ PCR amplification kit for use in forensic casework. Journal of Forensic Science, vol. 54, (1046 – 1054), 2009.

MEDEIROS, R.J. A genética na prova penal. Editora Pilares, 2009.

MENNELL, J.; SHAW, I. The future of forensic and crime scene science part I. A UK forensic science user and provider perspective. Forensic Science International (S7–S12), 2006.

MULERO, J.J.; CHANG, C.W.; LAGACÉ, R.E.; WANG, D.Y.; BAS, J.L.; MCMAHON, T.P.; HENNESSY, L.K. Development and validation of the AmpFISTR®MiniFiler™

PCR amplification kit: a miniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *Journal of Forensic Science*, Vol. 53, (838 – 852) 2008.

PESARESI, M.; BUSCEMI, L.; ALESSANDRINI, F.; CECATI, M.; TAGLIABRACCI, A. Qualitative and Quantitative Analysis of DNA Recovered from Fingerprints. *International Congress Series.*, vol. 1239, (947 – 951), 2003.

PHIPPS, M. E. PETRICEVIC, S. The Tendency of Individuals to Transfer DNA to Handled items. *Forensic Science International*, vol. 168, (162 – 168), 2007.

POPA, G.; POTORAC, R.; PREDA, N. Method for Fingerprints Age Determination. *Romanian Society of Legal Medicine*, vol. 2, (149 – 154), 2010.

PROFF, C.; SCHMITT, C.; SCHNEIDER, P.M.; FOERSTER, G.; ROTHSCHILD, M.A. Experiments on the DNA Contamination Risk Via Latent Fingerprint Brushes. *International Congress Series*, vol.1288, (601 – 603), 2006.

PUCH-SOLIS, R.; KIRKHAM, A.J.; GILL, P.; READ, J.; WATSON, S.; DREW, D. Practical determination of the low template DNA threshold. *Forensic Science International*, vol. 5, (422 – 427), 2011.

QUINONES, I. e DANIEL, B. Cell Free DNA as a Component of Forensic Evidence from Touched Surfaces. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 6, (26-30), 2012.

RESENDE, R.V. Extração de DNA de impressões digitais latentes depositadas em diferentes suportes e reveladas com ninidrina e pó preto. Dissertação (Mestrado) em Genética, Pontifícia Universidade Católica, Goiás, 2013.

SCHULZ, M. M.; WEHNER, H.D.; REICHERT, W.; GRAW, M. Ninhydrin – dyed Latent Fingerprint as a DNA Source in a Murder Case. *Journal of Clinical Forensic Medicine*. vol.11 (202 – 204), 2004.

SENGE, T.; MADEA, B.; JUNGE, A.; ROTHSCHILD, M.A.; SCHNEIDER, P.M. STR's mini STR's and SNP's – A comparative study for typing degraded DNA. *Legal Medicine*, vol. 13, (68 – 74), 2011.

SEWELL, J. GUINONES, I.; AMES, C.; MULTANEY, B.; CURTIS, S.; SEEBOURTH, H.; MOORE, S.; DANIEL, B. Recovery of DNA and Fingerprints from touched documents. *Forensic Science International: Genetics*, (281 – 285), 2008.

SODHI, G.S.; KAUR, J. Powder method for detecting latent fingerprints: a review. *Forensic Science International*, vol. 120, (172-176), 2001.

VAN HOOFFSTAT, D.E.O.; DEFORCE, D.L.D.; HUBERT, I.P.; EECKHOUT, E.G. DNA typing of fingerprints using capillary electrophoresis: effect of dactyloscopic powders. *Electrophoresis*, vol. 20, (2870 – 2876), 1999.

VAN OORSCHOT, R. A .H.; PHELAN, D.G.; FURLONG, S.; SCARFO, G.M.; HOLDING, H.L.; CUMMINS. M.J. Are you collecting all the available DNA from touched objects? *International Congress Series*, (803 – 807), 2003.

VAN OORSCHOT, R e JONES, M.K. DNA fingerprints from fingerprints. *Nature*, (387 – 767), 1997.

VAN OORSCHOT, R. A .H; BALLANTYNE, K. N.; MITCHELL, R.J. Forensic Trace: a Review. *Investigative Genetics*, 2010.

WICKENHEISER, R.A.; HORNS, B.S. Trace DNA: A Review, Discussion of Theory, and Application of the Transfer of Trace Quantities of DNA Through Skin Contact. *Journal of Forensic sciences*, 2002.

WIEGAND, P.; KLEIBER, M. Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int. J. Legal Med.*, vol.114 (285-287), 2001.

10. ANEXOS

ANEXO I

Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

ESCOLA SUPERIOR DE
CIÊNCIAS DA SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE VITÓRIA -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de polimorfismos de DNA com utilização de miniSTRs em impressões digitais em suportes variados

Pesquisador: CAROLINA MAYUMI VIEIRA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 27988414.0.0000.5065

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 541.396

Data da Relatoria: 25/02/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma dissertação de mestrado. O estudo visa estabelecer o grau de confiabilidade do exame de DNA em impressões digitais, verificar se é possível a obtenção de perfis completos e conhecer os suportes nos quais este processo possa ocorrer com mais facilidade, tudo isto visando futura incorporação do procedimento de coleta adequada de impressões digitais na rotina de trabalho dos peritos criminais.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

Identificar perfis genéticos de polimorfismos de DNA mediante análise de miniSTRs em impressões digitais.

Específicos:

- Verificar o grau de confiabilidade do exame de DNA em impressões digitais a partir dos seguintes suportes: plástico, vidro, metal e madeira;
- Verificar a possibilidade de obtenção de perfis completos;
- Validar a importância de incluir na rotina de atuação dos peritos criminais a coleta adequada de

Endereço: EMESCAM, Av.N.S.da Penha 2190 - Centro de Pesquisa
Bairro: Bairro Santa Luzia **CEP:** 29.045-402
UF: ES **Município:** VITORIA
Telefone: (27)3334-3586 **Fax:** (27)3334-3586 **E-mail:** comite.etica@emescam.br

ESCOLA SUPERIOR DE
CIÊNCIAS DA SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE VITÓRIA -



Continuação do Parecer: 541.396

impressões digitais nos suportes estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto não implica em riscos de qualquer natureza para os sujeitos de pesquisa.

Benefícios:

Haverá benefícios para a perícia criminal como um todo, na dependência dos resultados obtidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa viável e meritória.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Sugiro explicar melhor a metodologia de análise de dados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

VITÓRIA, 25 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
PATRICIA CASAGRANDE DIAS DE ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: EMESCAM, Av.N.S.da Penha 2190 - Centro de Pesquisa

Bairro: Bairro Santa Luzia

CEP: 29.045-402

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3334-3586

Fax: (27)3334-3586

E-mail: comite.etica@emescam.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA INTITULADO:

Identificação de polimorfismos de DNA com utilização de miniSTR's em impressões digitais em suportes variados

Eu, _____, autorizo a coleta de 4 (quatro) amostras de impressões digitais produzidas pela pressão do dedo indicador direito em momentos diferentes, em quatro suportes diferentes, a saber: metal, vidro, plástico e madeira visando contribuir com amostras para a pesquisa intitulada: "Identificação de polimorfismos de DNA com utilização de miniSTR's em impressões digitais em suportes variados". Afirmando ter tido oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, da ausência de riscos provenientes e da garantia de confidencialidade e de que as amostras não serão usadas para outro fim que não seja a referida pesquisa. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Assinatura de uma testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou de seu representante legal) para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Pesquisadores:

Carolina Mayumi Vieira – carolmayumi@gmail.com Telefone: 99725-5992

Professora Doutora Greiciane Gaburro Paneto – ggpaneto@gmail.com

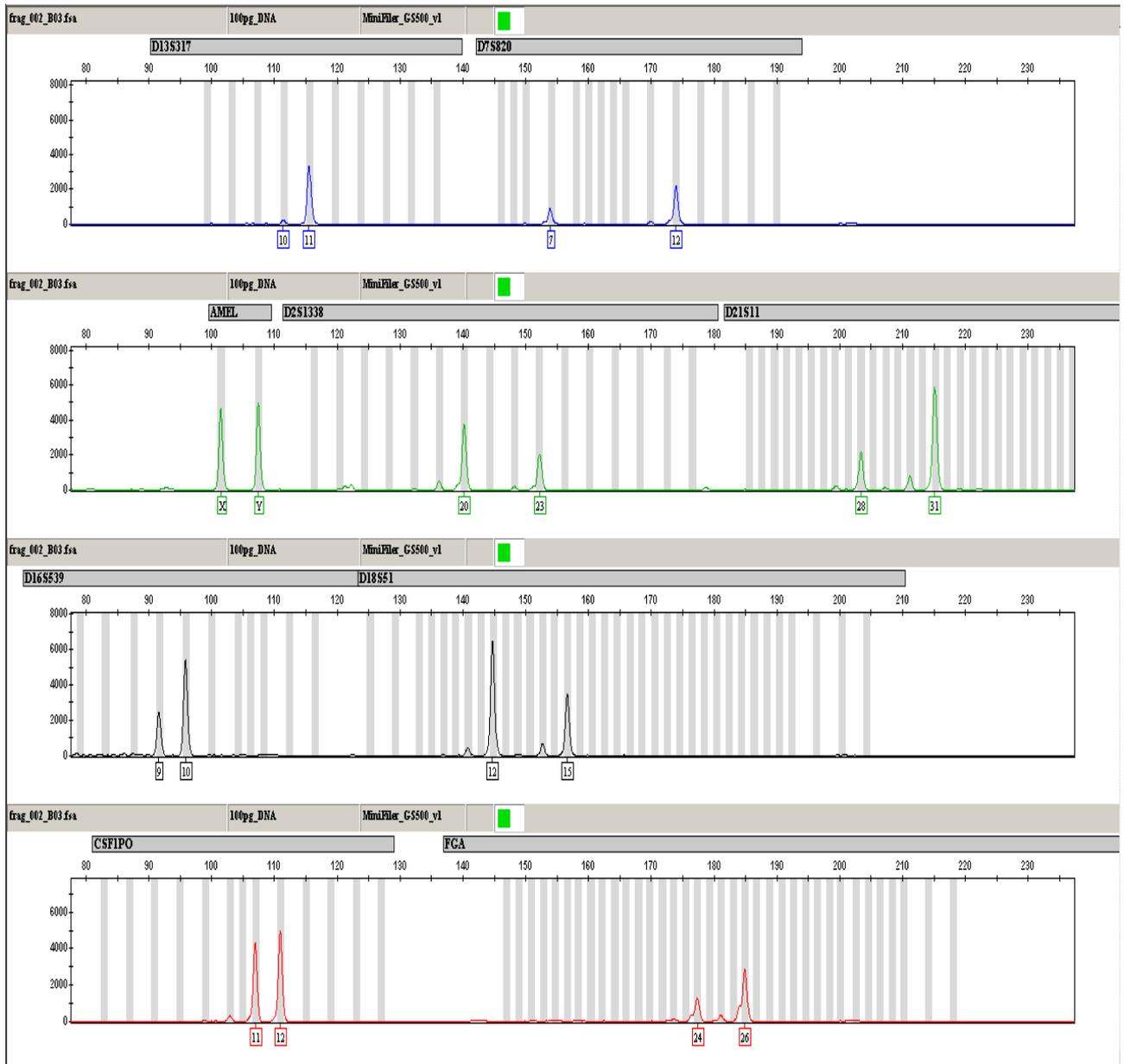
Professor Doutor Luís Renato da Silveira Costa – renatocosta52@hotmail.com

Comitê de Ética da EMESCAM – Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória. Av. N. S. da Penha, 2190, Santa Luiza - Vitória - ES - 29045-402 - Tel.: (27) 3334-3500 – www.emescam.com.br

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa: conep@saude.gov.br

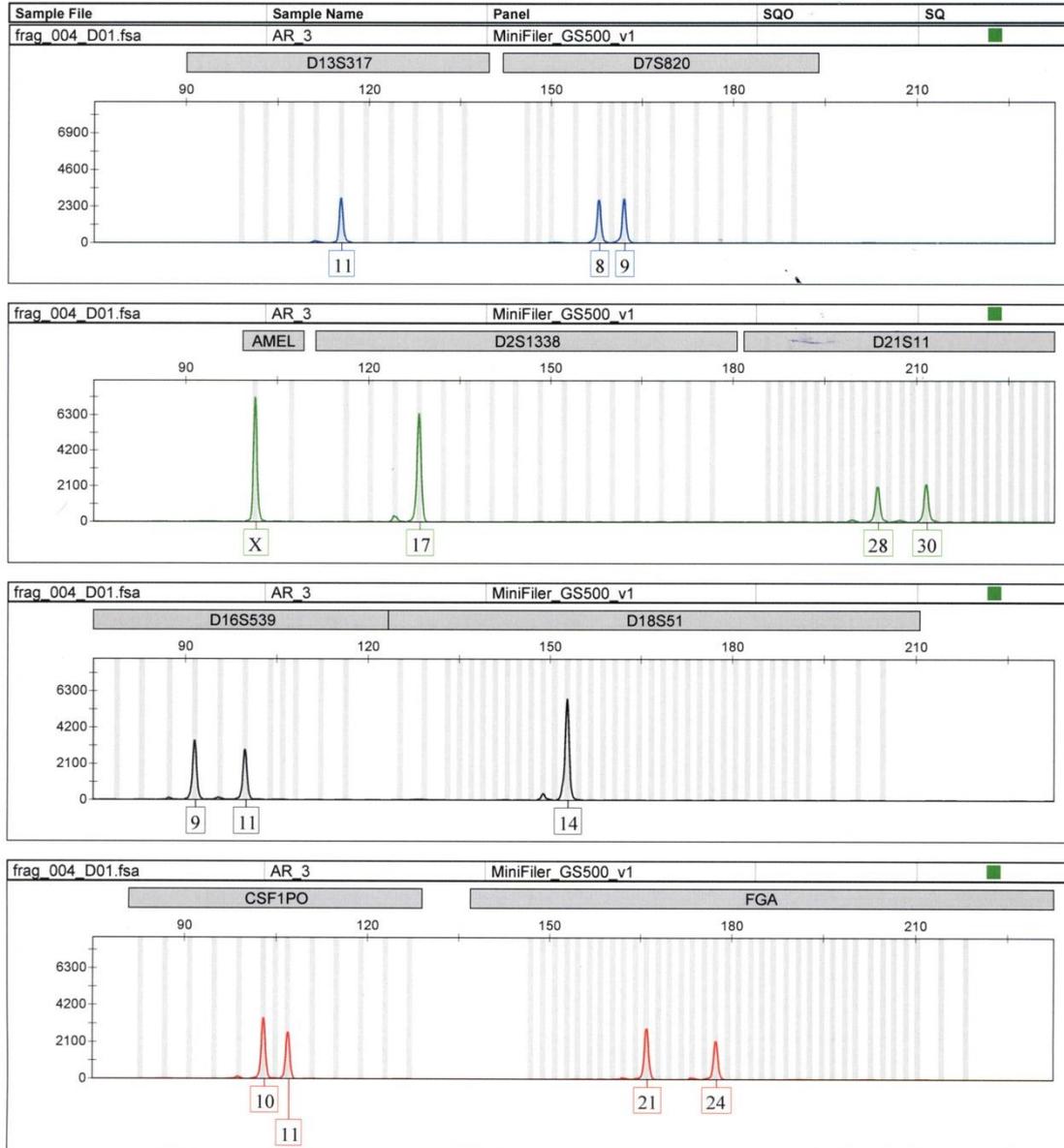
ANEXO III

Teste de sensibilidade com amostra controle de 100pg de DNA (DNA controle 007, Applied Biosystems)



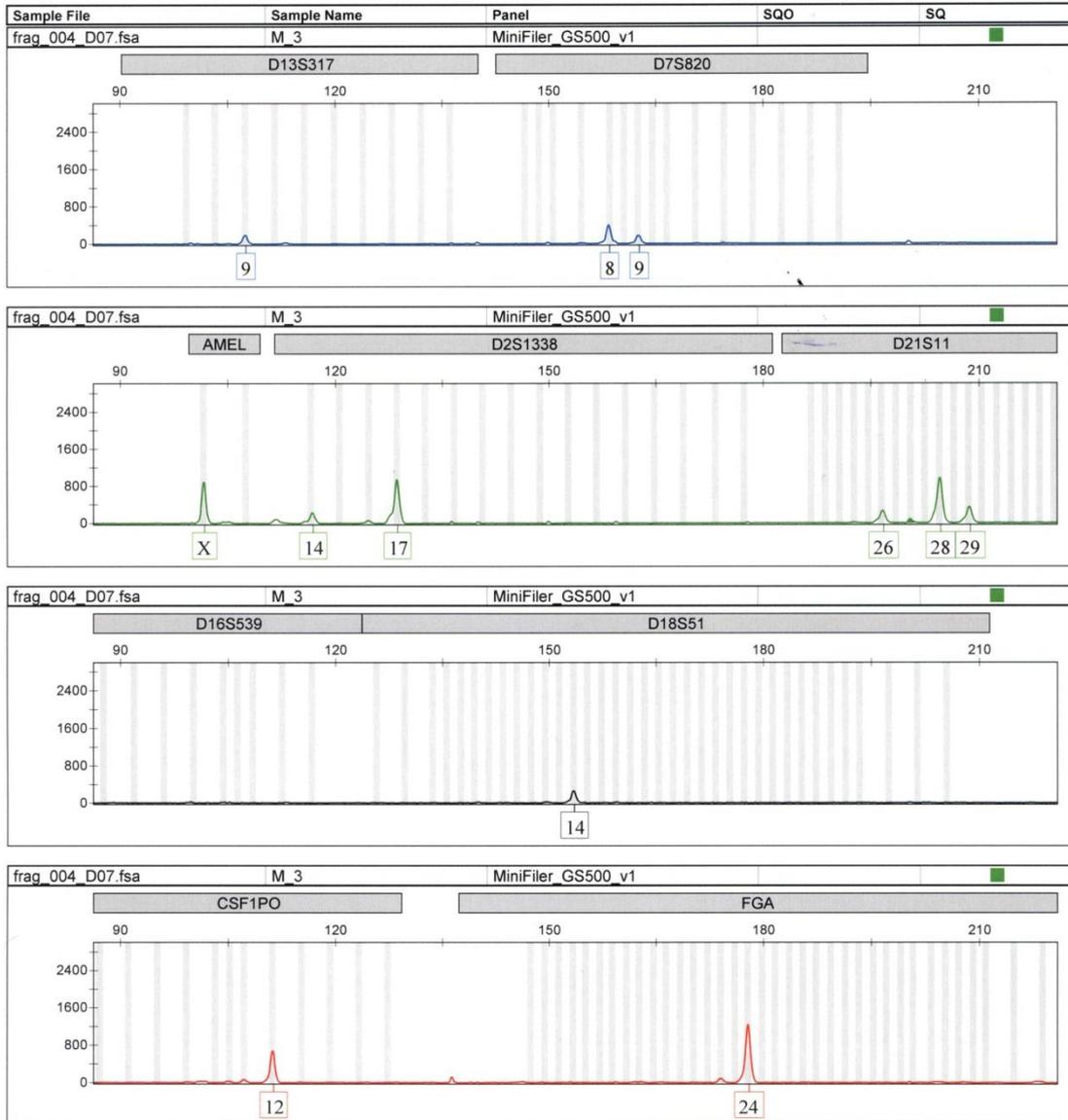
ANEXO IV

Amostra controle (swab bucal) de um dos doadores de impressão digital.



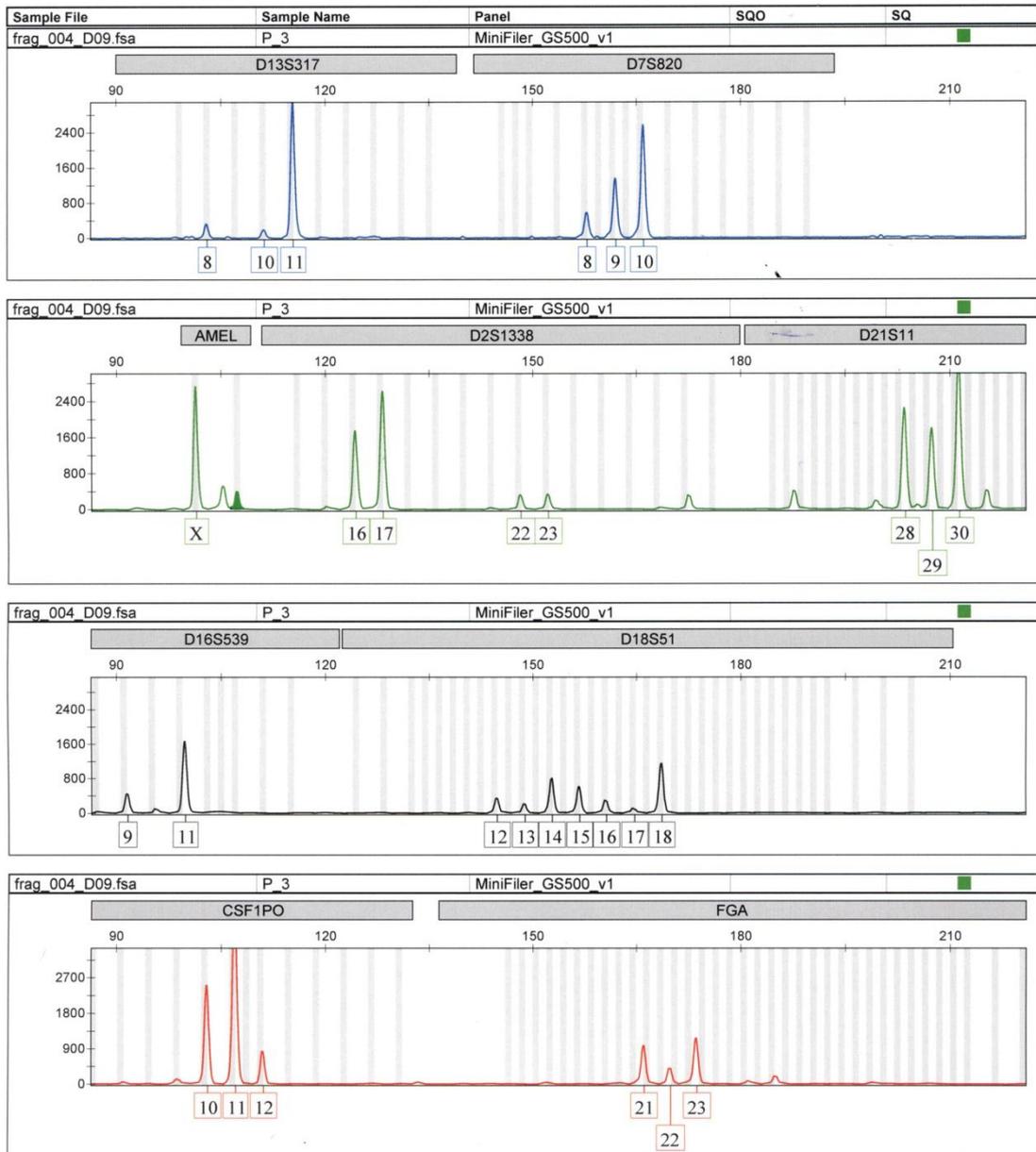
ANEXO V

Amostra de impressão digital coletada em madeira.



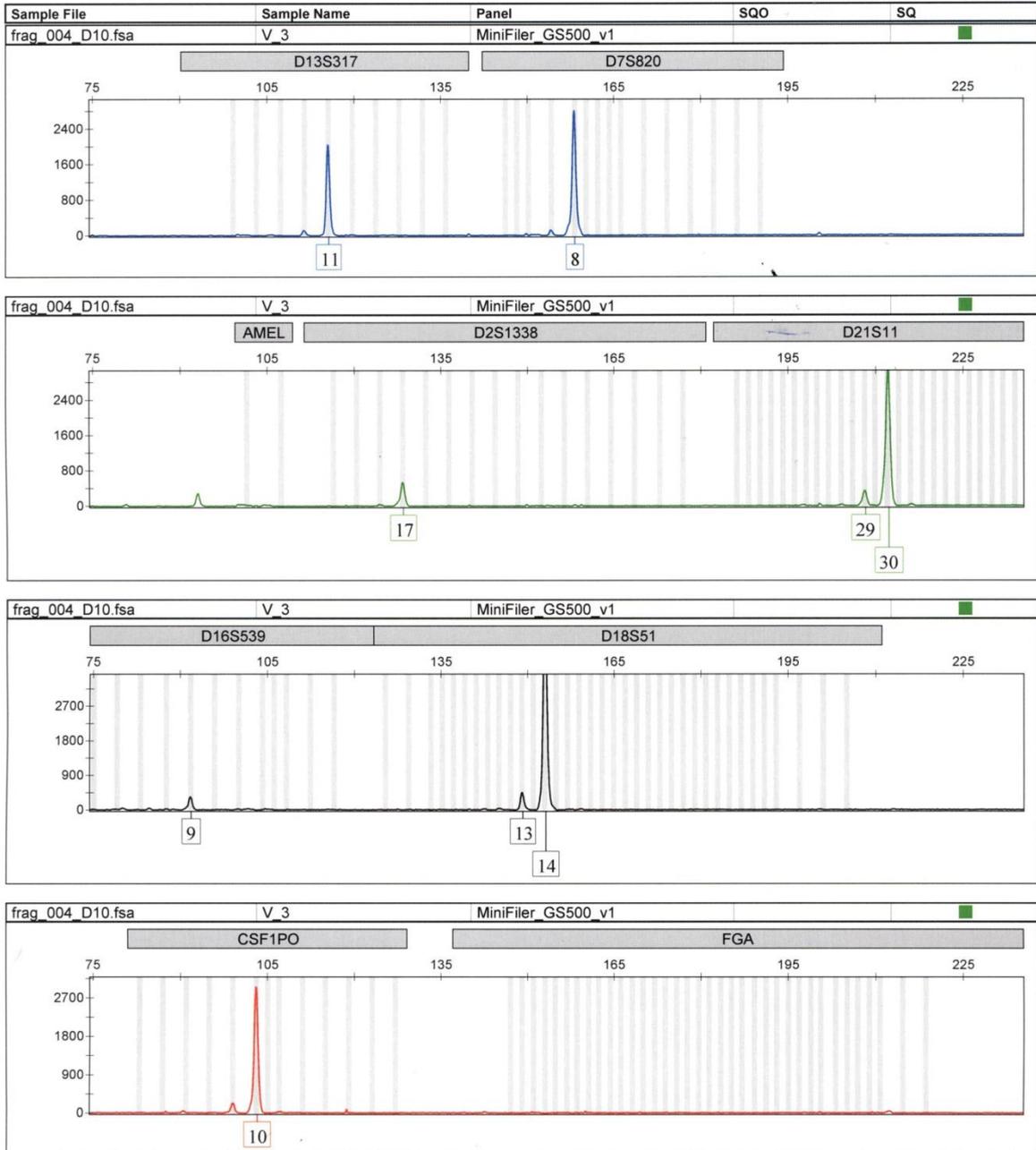
ANEXO VI

Amostra de impressão digital coletada em plástico.



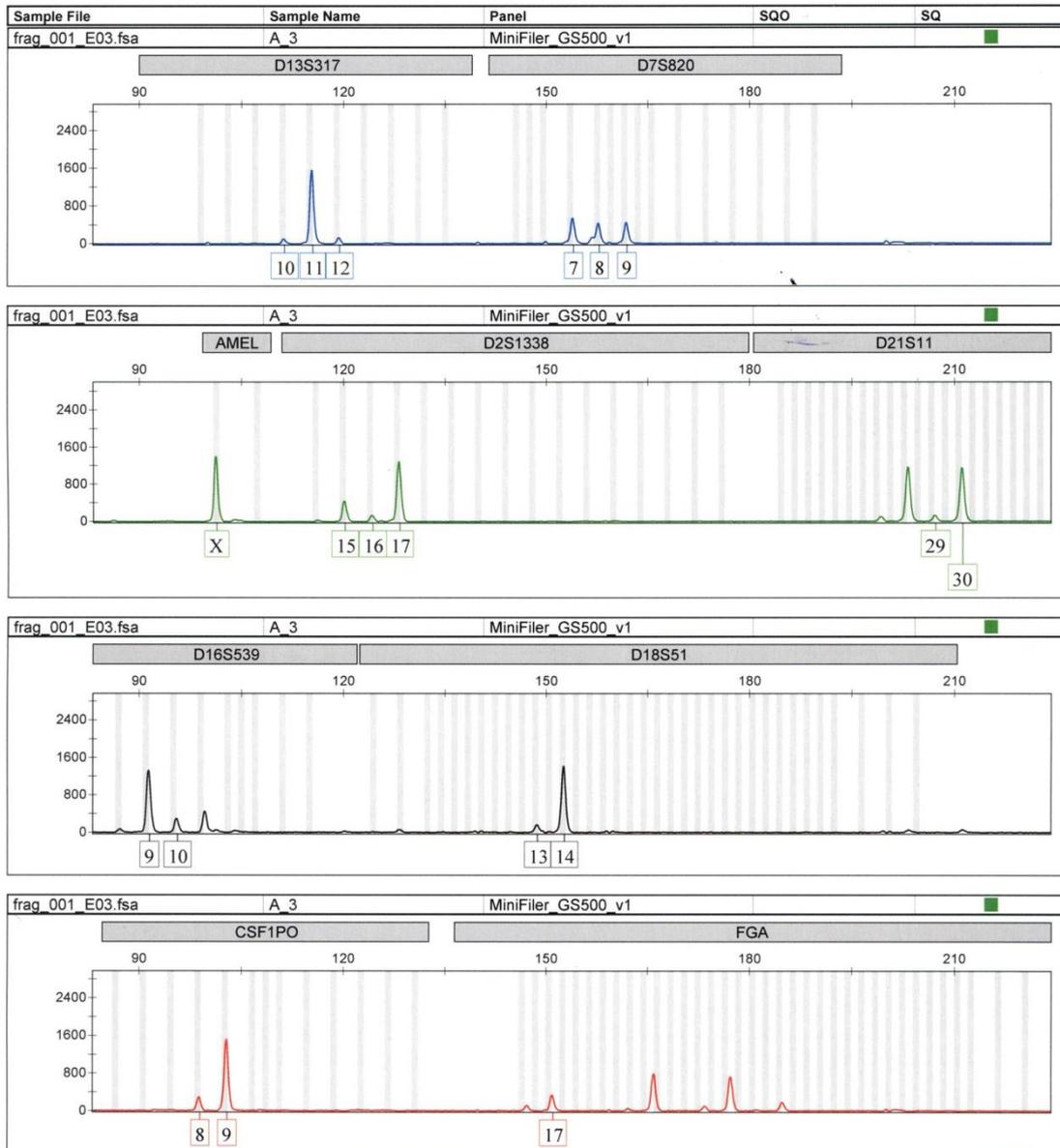
ANEXO VII

Amostra de impressão digital coletada em vidro.



ANEXO VIII

Amostra de impressão digital coletada em alumínio.



ANEXO IX

Relação dos alelos encontrados por marcador do kit AmpFISTR MiniFiler nas amostras de impressões digitais apostas em suporte de alumínio.

AMOSTRA / MARCADOR	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
A1	11 12 13	8 15	23 24	27 28		9 10	11 12	17 22
A2	10	11 12	23	30	9 10	14 16	12	21
A3	11	7 8 9	15 17	28 30	9 11	14	10	21 24
A4	11 14	9 11	17 20		12 13	12 17 23	10 11 10 11 12	25 26
A5	11	8 11	19 25	29 31,2	10 11	13 19	13	23
A6	8 10	8 10	20	31	8 12	13 15	10 13	
A7	10 12	9 10			11		8	19 21
A8	14	10 12	16 17	29	9	13 17	12 13	20 25
A9	8 11	10 11	20 23	30 33,2	9 10 11	18	12	22
A10	13	10	20 22	30 31,2	10 12	13 14	12	
A11	8 12	9 12	21 24	29,2 30	11 12	20	11 12	20 26
A12		13		26	11 13	10 23		22
A13	12 13	8 12	17 24	28	12 14	10 20	12 13	22 21 23
A14	8 12 13	8	17 18 19 22	27 29 33		12 23	10 11	25
A15	8 11 12	8 13	17 24	30 32	11	12 15	13	
A16	8 9 12	6 7 8 12 15	23 28	29 31	7 10	16 17	10 11	20 21
A17	8 11 12 13	7 9 12	17 21	29 30	9 12	15 16	10 12	19
A18	9 12	8 11	17 24	29	11	15 17	11	19 22
A19	11 14	8 9	16 20 25	31		13 15 17	10 12	22 23
A20	11 12	8 10	23 24		9 11	15	11 12	20 22 19 20
A21	12 13 14	8 9 11	25	29 31,2	9	16 17	11	21
A22	12 13	9 10 11	19 26	29 33,2	8 12 13	17	11 12	21 23
A23	12	6 8 11	19 22	24,2 27		10 15	11 13	21 24 20 21
A24	12 13	11	17	29 33,2	12	17	10	25
A25	11 12					12 16	10	25

OBS.: Os alelos marcados em azul são aqueles coincidentes com a amostra referência.

ANEXO X

Relação dos alelos encontrados por marcador do kit AmpFISTR MiniFiler nas amostras de impressões digitais apostas em suporte de madeira.

MARCADOR/ AMOSTRA	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
M1	10 12	8 12	17 23 24	30 30,2 31	11 12	16 18	11 12	23 25
M2	12	11 12	23	30	9 11	14 16	11	20
M3	9	8 9	17	28		14	12	24
M4	11 14	9 11			12 13	17 23	10 11	25 26
M5	11	8	19	28,2 30	10 12	13 17 19	11 13	23 25
M6	8 12	8 10	17 22	28 31	10 12	13 15	10 11 13	21 23
M7	10 12	8 10	18 23	31 32,2	12 14	12 15	12 13	21 23
M8	10 11 12 14	7	16 17	29 30	8 9 13	15 17	10 11	25
M9	10 11	9	20 23	28 30	10 11	18	10 12	22 23
M10	13 14	10 12	10	30	10 11	12	8	21 24
M11	12	8 9 10 12	16 23	29 30	12 13 14	10	10 14	18 21 22
M12	8 13	8 10 11 12	18		12	10,2	10 11	23 24
M13	12	8 12	17 24	28	14	10 20	12 13	22
M14	12		22 27	31,2	9 10 12	10 24	9 10	19
M15	13 14	11		30	9 12	23	12 13	
M16	11	8	17 23	29	13	13 18	10	
M17	8 11	7 8 9 10	18 20	28		13,2 14,2	10 12 13	25
M18	11	10 11	17 24	29	9 11 13	12 15 17	11 12	19 21
M19			16	35	9 12 14	9 10	10 12	30
M20	12	8 11	19 24	29 30 30,2	12	13 14	10 11 12	20
M21	12 13	8 10	25	29 31,2	9	10 13 17	6 11	21 25
M22	12	11 15	19 26	26 29	8 9 13	17 18	11 12	21 23 29 30
M23	12	8 9 11	19 22	24,2 27	11 12	14 15	11 13	21 24
M24	12	11	17	29 33,2	12	17	10	20 21 25
M25	12	8 11	17 22	26	8 11	12	10	25

OBS.: Os alelos marcados em azul são aqueles coincidentes com a amostra referência.

ANEXO XI

Relação dos alelos encontrados por marcador do kit AmpFISTR MiniFiler nas amostras de impressões digitais apostas em suporte de plástico.

MARCADOR/ AMOSTRA	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
P1	11	10 11	23	30	11		10 11	
P2	8	10 12	23	25 30	11 12 13	14 16	10 11	20 23
P3	11	9 10	16 17	28 30	11	18	11	21 23
P4	8	8	19	30,2 34 35,2	12		10 11	21 22
P5	11	8 11	19 25	29 31,2	10 11	13 19	13	25
P6	8 12	8 10	17	31	10 12	13 15	10 13	21 23
P7	10 12	8 10	18 23	31 32,2	12 14	14 15	12 13	21 22
P8	10 14	10 12	16 17	29 30	13	15 17	10 11	25
P9	8 11	10 11	20	30 33,2	10 11	12 18	10 12	22 23
P10	13 14	10 12	10	30	10 11	12	8	
P11	11 12		21 24	30	11	20 24	10 12	26
P12	8 13 15	6	18 25	29 30	10	12 23	8	21
P13	8 11	8 10 12	17 20	28 29	12	20	8 12	22 23
P14	12	11	17 19	28,2	11		11 12	19 22
P15	11	11	18	30	9 11	12 18	10 11	
P16	11	8 12	19 23	29 30	12 13	13 18	10 11	21
P17	8		16 22		8 12			
P18	9 11	8 10	24	30	13	15 17	8 11	19 22
P19	11 12	6 7	24	35,2		10 15	8 10	20
P20	11 12	8 10	23 24	30	9	15	10 11 12	20 22
P21	10 14		17 25	24,2 28,2			11	20 21 30
P22	12 13	9 10	17 19 23 26	29 33,2	8 13	17	11 12	21 23
P23		8		24,2	11 12	14	11 12	21
P24	8 12	11	17	33,2	11 12	17	10	21 25
P25	12	8	17 22	28 30	8 11 13		10	25

OBS.: Os alelos marcados em azul são aqueles coincidentes com a amostra referência.

ANEXO XII

Relação dos alelos encontrados por marcador do kit AmpFISTR MiniFiler nas amostras de impressões digitais apostas em suporte de vidro.

MARCADOR/ AMOSTRA	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
V1	12	8				18	11	30
V2	12			30 34,2 37	9			23
V3	11	8	17	30	9	14	10	
V4	11 14				12 13	12 17 23	10 11	25 26
V5		6 8	17 19		10 11	14 19	10 11	21
V6	12	8 10	17		10		11 12	23
V7	12	10	22 23		14	13 14	12 13	21
V8	10 11		16 17		13 14		10 11	25 28
V9		11	18 23			14	7 10 12	
V10			22					
V11	13 14	12	20	28,2 29	8 9	16	10 13	18,2 21
V12		11	17 24	30 31,2			12	
V13	8 13		17 24	28 30 31,2	9 11 12	10 20	10 11 12	22
V14	11 12	8	22	31,2	11 12	15	9 10	20
V15	12 14	8 9	18 20	32,2 33,2	9 11	12 15	11 13	22 24
V16	11	10 11	19 23	30	11 12	13 15	10 12	21 24
V17	11 12	8		30	11 12	10,2	10 11	23 24
V18	11	10 13		24 30	9 12	20	10 12	
V19	11 14	10	17 20	29 30 31	9	12 15	10 12 13	20 22 23 25
V20	11	8	23	24 30	9	15	11 12	20 22
V21	11 14	9 11	23	31,2	9	17	11 12	20
V22	12	9 10	19 26	29 30 33,2	8 13	17	11	20 21 23
V23	12	8	17 22 25	24,2 27 30	12	14 15	10 11 13	21
V24	8 12	11	17	29 33,2	11 12	17	10	21 25
V25	12	8	22			12		25

OBS.: Os alelos marcados em azul são aqueles coincidentes com a amostra referência.

ANEXO XIII

Relação dos perfis genéticos de todas as amostras referências.

AMOSTRA/ MARCADOR	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
AR 1	10 12	8 12	23 24	30,2 31	11 12	16 18	11 12	23 24
AR 2	8 12	11 12	23	28 30	9 11	14 16	11	20
AR 3	11	8 9	17	28 30	9 11	14	10 11	21 24
AR 4	11 14	9 11	17 20	30,2 31,2	12 13	17 23	10 12	22 26
AR 5	11	8 11	19 25	29 31,2	10 11	13 19	11 13	23 25
AR 6	8 12	8 10	17 22	28 31	10 12	13 15	10 13	21 23
AR 7	10 12	8 10	18 23	31 32,2	12 14	14 15	12 13	21 22
AR 8	10 14	10 12	16 17	29 30	13	15 17	10 11	25
AR 9	8 11	10 11	20 23	30 33,2	10 11	12 18	10 12	22 23
AR 10	13 14	8 10	20 22	30 31,2	10 11	13 14	11 12	21 24
AR 11	12	8 12	16 21	30	11 12	15 20	10 12	26
AR 12	8 13	10 12	18 25	29 33	11 12	12 23	10 11	21 23
AR 13	12 13	8 12	17 24	28	12 14	10 20	12 13	22
AR 14	12	11 13	19 22	31 31,2	11 12	10 15	11 12	23 25
AR 15	11 12	8 9	18 20	30	9 11	12 16	11 13	22 24
AR 16	11	8 12	19 23	29 30	12 13	13 18	10 11	21
AR 17	11 13	9 11	17 21	30 31,2	8 12	16 18	10 12	19 21
AR 18	9 11	8 10	17 24	29	11 13	15 17	11	19 22
AR 19	11 14	9	16 20	29 31	12 14	15 17	10	22 23
AR 20	11 12	8 10	23 24	30	9 11	15	11 12	20 22
AR 21	13 14	8 11	25	29 31,2	9	16 17	11	20 21
AR 22	12 13	9 10	19 26	29 33,2	8 13	17	11 12	21 23
AR 23	12	8 11	19 22	24,2 27	11 12	14 15	11 13	21 24
AR 24	8 12	11	17	33,2	11 12	17	10	21 25
AR 25	12	11 12	17 22	28 30	8 11	16	10	25

ANEXO XIV

Porcentagem dos alelos extras (*drop-in*) para cada marcador genético do kit de amplificação AmpFISTR Mini Filer (Promega) nas amostras de impressões digitais nos diversos suportes.

SUPORE/ MARCADOR	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
ALUMINIO	17,82%	16,83%	7,92%	11,88%	10,89%	13,86%	8,91%	11,88%
MADEIRA	8,57%	17,14%	7,62%	11,43%	11,43%	17,14%	11,43%	15,24%
PLÁSTICO	12,5%	16,66%	18,05%	13,89%	5,55%	5,55%	15,28%	12,5%
VIDRO	9%	10%	13%	15%	10%	11%	19%	13%

ANEXO XV

Porcentagem de alelos nulos (*drop-out*) para cada marcador genético do kit de amplificação AmpFISTR Mini Filer (Promega) nas amostras de impressões digitais nos diversos suportes.

SUPORE/ MARCADOR	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
ALUMÍNIO	10,48%	10,48%	8,96%	17,16%	17,91%	11,19%	9,70%	14,17%
MADEIRA	11,03%	14,71%	11,03%	16,18%	10,30%	14,71%	7,35%	14,71%
PLÁSTICO	10,07%	16,55%	12,95%	12,95%	10,79%	15,11%	9,35%	12,23%
VIDRO	10,19%	14,81%	12,04%	14,81%	11,57%	12,96%	10,65%	12,96%