

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MESTRADO

FERNANDA GIRARDI DA COSTA CHASSOT

**ESTOJOS DE CARTUCHOS DEFLAGRADOS COMO FONTE DE DNA:
OBTENÇÃO DE PERFIL STR A PARTIR DE
CÉLULAS EPITELIAIS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DE ESTOJOS.**

Porto Alegre
Agosto 2012

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

FERNANDA GIRARDI DA COSTA CHASSOT

**ESTOJOS DE CARTUCHOS DEFLAGRADOS COMO FONTE DE DNA:
OBTENÇÃO DE PERFIL STR A PARTIR DE
CÉLULAS EPITELIAIS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DE ESTOJOS.**

**Porto Alegre
Agosto 2012**

FERNANDA GIRARDI DA COSTA CHASSOT

**ESTOJOS DE CARTUCHOS DEFLAGRADOS COMO FONTE DE DNA:
OBTENÇÃO DE PERFIL STR A PARTIR DE
CÉLULAS EPITELIAIS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DE ESTOJOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito parcial e último para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Clarice Sampaio Alho

**Porto Alegre
Agosto 2012**

"Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho."

Clarice Lispector

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais e ao meu marido, que fizeram de mim o que sou e dividiram comigo as vitórias e obstáculos desta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Doutora Clarice Sampaio Alho por me encorajar a não desistir nos momentos em que nada parecia dar certo e por me emprestar sua expertise.

Ao colega, amigo, ouvidor de meus lamentos e apoiador de minhas decisões, Doutor Paulo Raimann.

Às colegas Juliane Picanço pela dedicação e ajuda, você foi colega e amiga, me deu força nos momentos difíceis. Obrigadão!

À colega de longa data, Francielle Mayer, florzinha, você é demais!

Aos demais professores, funcionários e colegas da Faculdade de Biociências da PUCRS.

À amiga Fernanda Rodrigues, graduanda do curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, que me deu uma ajuda e tanto aos 45 min do segundo tempo!

Aos peritos do Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, especialmente às peritas Trícia Albuquerque, Cecília Matte, Joseli Baldasso e aos peritos Gustavo Kortmann e Renato Ferraz.

Aos meus colegas de trabalho pelos conselhos que sempre foram muito importantes, especialmente ao Wesley Tsutsumida, pela impagável ajuda com análise de dados e escolha de métodos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela oportunidade de estudar em uma das melhores universidades da América Latina, gratuitamente.

À minha família, meu maior motivo para seguir em frente! Pai, mãe e marido, amo vocês!

Aos meus pitoquinhos por aliviarem meu estresse cada dia que cheguei cansada de tudo!

À Deus, meu maior orientador.

Abreviaturas

°C	graus Celsius
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotreitól
EXO I	Exonuclease I – <i>E. coli</i>
6FAM	fluoróforo na cor azul
H ₂ O	água
LIZ	fluoróforo na cor laranja
M	molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	mili molar
µL	micro litro
ng	nano grama
nm	nanômetro
OL	<i>Overlapping</i>
pb	par de bases
pg	pico grama
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (em português: Reação em Cadeia da Polimerase)
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i> (em português: Unidades Relativas de Fluorescência)
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (em português: Fosfatase alcalina de camarão)
SEB	Stain Extraction Buffer
STR	<i>Short tandem repeats</i> (em português: Repetições curtas em Tandem)

RESUMO

Apresento esta dissertação, a qual atende aos propósitos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com o propósito de corroborar com a rotina de práticas em genética forense.

Estojos resultantes da deflagração de cartuchos são vestígios comumente presentes em cenas de crime com armas de fogo e, por vezes, únicos indícios de que se dispõe para a elucidação de um fato, o que os torna peças chave em uma investigação.

Ao municiar uma arma de fogo é necessário que o indivíduo toque a munição, resultando na deposição de células epiteliais na superfície dos cartuchos. Entretanto, na rotina de laboratórios de genética forense, testes de DNA não são requeridos para estes indícios com tanta frequência quanto são encontrados. A justificativa para a subutilização destes materiais é a baixa concentração e a alta taxa de degradação do DNA, que ocorre devido ao superaquecimento do cartucho que pode chegar a 1800°C, além disso, a inibição da PCR, os poucos relatos de sucesso na obtenção de perfil genético a partir de estojos deflagrados e os exíguos estudos que verificam a viabilidade de amostras como estas, são fatores que desestimulam esta prática.

Com o intuito de corroborar com a rotina de investigação genética, estabeleceu-se uma parceria entre os Setores de Genética Forense e de Balística Forense do Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul (IGP/RS) e o Laboratório de Genética Humana e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (LGHM-PUCRS). O presente estudo desenvolveu uma pesquisa controlada para obtenção e análise de DNA nuclear oriundos de estojos de cartuchos deflagrados.

O estudo foi realizado adaptando-se protocolos padrão e/ou indicados pelo Departamento de Ciências Forenses da Virgínia.

Este estudo demonstrou que é possível utilizar estojos deflagrados ou não, como fonte de DNA com a finalidade de identificar os envolvidos com o seu manuseio. Contudo, considerando o rendimento limitado, a eficácia restrita e, sobretudo, o custo-benefício, entende-se que a estratégia de análise de DNA oriundo de células deixadas em cartuchos/estojos não seja a prioritária na rotina do Laboratório Forense. Mas, em muitas situações, essa pode ser a única opção dos investigadores e, nesse momento, nossos resultados e protocolos aqui apresentados terão importância fundamental.

Com este estudo concluímos que seguindo os protocolos aqui apresentados é possível produzir dados para fins de identificação humana. O uso destes protocolos, e de seus resultados, poderá ser definitivo quando usados como elemento adicional de um inquérito policial e/ou como prova em um processo penal.

Palavras-chave: estojos deflagrados, balística forense, genética forense

ABSTRACT

I offer this thesis, which serves the purposes of the Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), in order to corroborate the routine practice in forensic genetics.

Fired cartridge cases are commonly present in crime scenes with firearms and sometimes they are the only evidence available for the elucidation of a fact, which makes them investigation key players.

To load a firearm the individual has to touch the ammunition, resulting in deposition of epithelial cells on the surface of the cartridges. However, in forensic genetic laboratories routine, DNA tests are not required for these signs as often as they are found. The reason for the underuse of these materials is the low concentration and high rate DNA degradation which occurs due to overheating of the cartridge that can reach 1800°C. Besides that, the inhibition of PCR, few reports of success in obtaining genetic profiles from fired cases and the scarce verifying feasibility studies of these samples are factors that discourage this practice.

In order to corroborate the genetic research routine, we have established a partnership between the sectors of Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul (IGP/RS) Forensic Genetics and Ballistics and Laboratório de Genética Humana e Molecular da PUCRS (LGHM-PUCRS). The present study developed a controlled research to obtaining and analysis of nuclear DNA from fired cartridge cases.

The study was based on standard protocols and/or indicated by the Forensic Science Department of Virginia.

This study demonstrated that is possible to use fired, or not, cartridge cases as source of DNA to identify individuals who involved with its handle. However, considering the limited efficiency, the restricted effectiveness and the cost-benefit, means that the DNA analysis strategy from cells left in cartridges/cases is not priority in forensics lab routine. But, in many situations it could be the only option to investigators and, at this moment, our results and protocols herein will have main importance.

This study concluded that following protocols here presented it is possible to produce data for human identification. The use of these protocols and their results will be definitive when used as an additional part of a police investigation and/or as evidence in criminal proceedings.

Keywords: fired cartridges, forensic ballistics, forensic genetics

SUMÁRIO

Capítulo I - Apresentação do Tema	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Histórico.....	2
1.2. Preservação do local de crime	2
1.3. Armas de Fogo	3
1.4. Carregamento de pistola semi-automática	4
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	5
Capítulo II - Artigo submetido ao Periódico	6
Capítulo III - Manual Explicativo e Protocolos de Trabalho para o IGP-RS	18
Capítulo IV - Considerações Finais	33
BIBLIOGRAFIAS CITADAS NESTE TRABALHO	35

Capítulo I
Apresentação do Tema

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Segundo estudo técnico desenvolvido pela Confederação Nacional de Municípios, no Brasil 70% dos homicídios ocorridos entre os anos de 1999 e 2008 foram praticados com armas de fogo. Este mesmo estudo revela ainda que 76,2% dos óbitos ocorridos no Rio Grande do Sul entre os anos de 2007 e 2008 empregaram o uso de arma de fogo e que há um crescimento constante deste tipo de crime no estado (Estudo Técnico Homicídios por Armas de Fogo no Brasil, 2010).

O crime com arma de fogo envolve indivíduos de idades variadas, entre homens e mulheres, que possuem ou não porte legal de arma e se apresentam em diversas formas: pode ou não haver disparo, vítimas fatais ou lesão corporal, comércio ilegal, tráfico de armas etc.

Apesar destas constatações, e de outros estudos e levantamentos indicando o crescente uso de armas de fogo em diversos tipos de crimes, a pesquisa acadêmica e aplicada envolvendo o tema balística e investigação com uso de DNA é bastante restrita e pouco explorada no Brasil, comparativamente a outros tipos de pesquisa que envolvem DNA.

Atualmente, a identificação de possíveis atiradores envolvidos em crimes dá-se pelo uso de ferramentas e metodologias tais como impressões digitais, reconhecimento por testemunhas oculares, retrato falado, identificação da arma, etc. Todas as metodologias utilizadas são válidas e padronizadas, entretanto, nem sempre são suficientes ou possíveis para identificar o indivíduo que manuseou a munição.

Há relatos de casos investigados em que apenas se dispunha dos estojos de cartuchos deflagrados deixados no local de crime, sem qualquer outro objeto ou vestígio que pudesse ser utilizado, exceto o indício de alguns suspeitos devido às circunstâncias. Em casos como esse, seria possível empregar a técnica de identificação humana realizando-se o confronto entre perfil genético encontrado no estojo e a amostra biológica do suspeito. No entanto, para realizar uma correta investigação genética de um indício, alguns aspectos são extremamente relevantes, tais como a conservação do local de crime, a identificação do tipo de arma e de cartuchos utilizados ou a possível contaminação das amostras.

1.2. Preservação do local de crime

Preservar o local de crime é manter o ambiente o mais inalterado possível, não mover ou subtrair objetos de suas posições originais, para que o trabalho dos peritos seja realizado com maior segurança, e que o resultado seja positivo na elucidação do fato criminoso.

O local do crime para Rabello (Rabello, 1996) é resumido com muita propriedade, como sendo:

"Local de crime é a porção do espaço compreendida num raio que, tendo por origem o ponto no qual é constatado o fato, se entenda de modo a abranger todos os lugares em que, aparente, necessária ou presumivelmente, hajam sido praticados, pelo criminoso, ou criminosos, os atos materiais, preliminares ou posteriores, à consumação do delito, e com este diretamente relacionado".

O trabalho de preservação do local de crime é, fundamentalmente, de responsabilidade da Polícia Militar, que é o primeiro agente de segurança a chegar ao local, e que deverá tomar as providências necessárias no intuito de preservar o local do fato, nas mesmas condições em que foi encontrado.

1.3. Armas de Fogo

As armas de fogo são aquelas que possuem arremesso complexo capaz de expelir projetis a partir de gases que resultam da combustão da pólvora contida no estojo. São armas que, diferente das armas ditas "brancas", não dependem da força física do homem para sua utilização. São consideradas por muitos autores como máquinas térmicas e projetadas por engenheiros que se utilizam dos princípios da termodinâmica e termoquímica para seu desenvolvimento. As armas de fogo possuem partes essenciais que são: o aparelho arremessador, ou arma propriamente dita, a carga de projeção (pólvora) e o projétil, estes dois últimos integrando o cartucho. A inflamação da pólvora origina gases que expandem e pressionam, resultando na ejeção do projétil.

Armas de fogo podem ser classificadas, dentro do conjunto de armas portáteis, em curtas e longas (Tocchetto, 2003). O objeto de estudo desta pesquisa trata de cartuchos ejetados de armas curtas, mais especificamente de pistolas semi-automáticas.

Segundo Tocchetto (2003), pistolas semi-automáticas não disparam continuamente, ou seja, seu tiro não é em rajada, mas sim um tiro de cada vez, inteiramente dependente da vontade do atirador. Sua automatização está na substituição dos cartuchos dentro da pistola, que ocorre logo após o disparo anterior.

O cartucho (Fig. 1), mais especificamente, o estojo do cartucho deflagrado, é o objeto de estudo desta pesquisa. Durante o disparo as partes do cartucho se soltam e, devido ao seu contato prévio com o indivíduo que carregou a arma, o estojo pode ser fonte de informação revelando o seu perfil genético. O estojo é o componente externo e de maior dimensão do cartucho. Sua forma e material de confecção são bastante variados. Em geral, são feitos de latão 70:30 (70% cobre e 30% zinco), mas há cartuchos de cobre e alumínio e com banhos de níquel. O quanto à composição do material que constitui o cartucho influencia na obtenção de DNA não é conhecido e não é foco desta pesquisa.

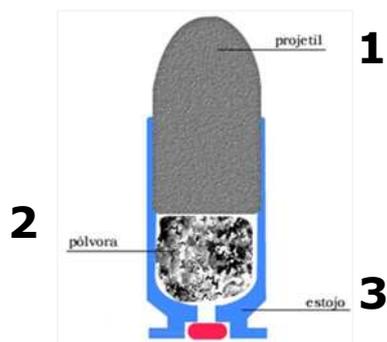


Figura 1. Partes básicas de um cartucho. 1) Projétil. 2) Pólvora. 3) Estojo.
Adaptado de Domingos Tochetto, *Balística Forense*, 2003.

1.4. Carregamento de pistola semi-automática

Durante o carregamento de uma pistola semi-automática, o indivíduo entra em contato direto com cada cartucho, individualmente, conforme mostra a figura 2. Neste processo, ocorre a fricção e deposição de células da epiderme na superfície do estojo.



Figura 2. Carregamento do pente de uma pistola semi-automática. Fonte: cedida pela Perita Joseli Baldasso do IGP/RS, 2009.

Este fenômeno por si já foi explorado por diversos cientistas, gerou inclusive a Teoria de Locard, que exprime o seguinte: do contato entre dois itens, irá haver uma permuta (Thorton, 1986).

Lowe e colaboradores (2002) e Phipps e Petricevic (2006) descreveram a habilidade da transferência de DNA de um indivíduo para um objeto tocado. Em seus estudos, os autores caracterizaram os indivíduos como "*shedders*", em uma tradução apropriada, como o indivíduo que transferiu DNA para o material em questão. Classificaram os indivíduos em *good shedders* e *bad shedders*, de acordo com a qualidade do perfil obtido de cada amostra.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Na rotina forense frequentemente são coletados estojos, deflagrados ou não, que podem servir para a identificação de indivíduos envolvidos nos casos em investigação. As metodologias de análise de DNA hoje empregadas nos variados tipos de amostras forenses poderiam ser testadas também em amostras ainda pouco utilizadas, como nos cartuchos/estojos, com a intenção de incluí-las na rotina.

O objetivo central deste trabalho foi adaptar protocolos de técnicas de obtenção de DNA e de perfil genético para serem usados como rotina na identificação humana a partir de células epiteliais presentes na superfície de estojos/cartuchos de pistola.

Especificamente, se pretendeu:

1. Adaptar protocolos de coleta, extração e amplificação de DNA para que sejam eficazes a fim de gerar perfil para identificação humana em células epiteliais deixadas na superfície de estojos/cartuchos.
2. Preparar um Manual Explicativo acerca deste trabalho, em língua portuguesa, para ser divulgado e distribuído aos peritos que atuam em Local de Crime, bem como preparar cinco Roteiros de trabalho (1- Coleta de estojo deflagrado; 2- Coleta de DNA de estojo deflagrado; 3- Extração de DNA de estojo deflagrado; 4- Quantificação de DNA com kit comercial; 5- Amplificação de DNA com kit comercial) para serem oferecidos aos peritos atuam em Local de Crime e no Laboratório de Análise de DNA.

Capítulo II

**Artigo a ser submetido ao Periódico
Internaltional Journal of Legal Medicine (IF 2.587)**

Title: Fired cartridge cases as a DNA source: miniSTR profiles from epithelial cells.

Authors names and affiliations:

Fernanda Girardi da Costa Chassot^{a,*}, Francielle Mayer Guimarães^a, Juliane Bentes Picanço^a, Joseli Baldasso^c, Cecília Helena Fricke Matte^b, Trícia Kommers Albuquerque^b, Gustavo Lucena Kortmann^b, Paulo Eduardo Raimann^a, Clarice Sampaio Alho^a

^aPontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90.619-900.

^bSetor de Genética Forense, Laboratório de Perícias, Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, Secretaria de Segurança Pública do Estado do Rio Grande do Sul. Av. Azenha, 255, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90.160-004.

^cSetor de Balística Forense, Departamento de Criminalística, Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, Secretaria de Segurança Pública do Estado do Rio Grande do Sul. Av. Princesa Isabel, 1056, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90.620-000.

*** Corresponding author**

Fernanda Girardi da Costa Chassot

Laboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências.

Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90.619-900

+55 51 33203545

fernanda.girardi@acad.pucrs.br

ABSTRACT

Criminal cases where fired cartridge cases are present in crimes scenes are very common, and sometimes they are the only evidence available for elucidation of the crime. To load a firearm, the individual has to touch the ammunition, resulting on the deposition of epithelial cells on the surface of the cartridges. However, in the forensic laboratories routine, DNA tests are not required for these evidences as often as they are found. The reason for the underuse of these materials is the low concentration and the DNA degradation due to overheating inside the gun, which can reach 1800°C, PCR inhibition and the few reports of success in obtaining profiles from fired cases. The present research aimed to obtain nuclear DNA profiles from fired cartridges cases samples using AmpFISTR® Minifiler™ kit. Random individuals loaded cartridges into a firearm. After, DNA was recovered using double swab technique and extracted using the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit and the organic method. We concluded that PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit was better than the organic method and it can be useful to obtained DNA from swabbed cartridges. However, the DNA obtained had concentration below the necessary to the complete success of DNA profile by AmpFISTR® Minifiler™ kit. Even though, we concluded that fired cartridges can be used as a source of DNA in order to provide some information about the person who handled it. In many situations, this strategy could be the only choice for forensic investigators.

KEYWORDS:

Fired cartridges cases / Minifiler / PrepFiler / firearm

INTRODUCTION

Investigated cases have reported that a few fired cartridge cases left at the crime scene, with no other trace, or any other object that could be used, except for the appointment of some suspects due to circumstances. In these cases, it would be possible to employ the technique of human identification doing the comparison of genetic profile found in the fired cartridge case with suspect biological sample profile. Authors [1, 2] have already described the ability of transferring DNA from an individual to a touched object. In these studies, the subjects were classified as good and bad shedders, according to the quality of the profile obtained in each sample. Nevertheless, in many situations, DNA sample collected at the crime scene is not only degraded, but it is also found in very low concentrations [3]. These conditions could interfere with the recovering of DNA, especially for this type of overheated sample, known as degraded [4]. In addition to degradation and low concentration, inherent characteristics of this type of sample such as inhibitors may be found due to metallic composition of the cartridges and the powder waste that came from the shooting [5]. Allying sensitive and inhibitors resistant methods for extraction and amplification seems to be an alternative to obtain the best DNA template and profile. Here, we used the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit, especially recommended for samples with inhibitors, helping to improve performance, concentration and purity of DNA isolated from challenging forensic samples. In addition, we used organic extraction method to compare results. The chosen firearm for this experiment was a Taurus Pistol - PT58S 380acp, one of the most common weapons found in South Brazilian crime cases (data from Criminal Department of the forensic investigation institute - Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, Brazil), and the ammunition used was suitable for this type of weapon.

MATERIALS AND METHODS

DNA Collection

All ammunition used was previously cleaned with Extran® Neuter (MA 02) to reduce contamination by extraneous DNA and paper was laid on the floor of the firing range. No device was used to block the cartridge cases trajectory.

We studied 3 shooters who were tested in two different moments under the same conditions. In each moment, each shooter handled the ammunition (3 cartridges to be fired) which was fired, and handled in both hands for 15 seconds another 3 cartridge to be unfired. From the two moments and 3 shooters, we obtained a total of 36 samples (2 moments, 3 shooters, each one with 3 fired cartridges and 3 unfired cartridges; Fig. 1). The 3 first cartridges were immediately loaded in the gun and fired. After firing, an examiner, wearing gloves, mask and cap, collected all fired and unfired cartridge cases with the help of a swab. Each cartridge case was swabbed using the double swab technique [6]. This technique consists in swabbing first with a sterile wet swab followed by swabbing with a sterile dry swab. Then swabs were placed into individually labeled paper envelopes until the swabbing and extraction process.

This project was approved by the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (tel. +55 51 33203345; protocol #11/05523) and the informed written consent or assent to participate was obtained from all subjects.

DNA extraction methods

Our 36 samples were divided in two groups according to the methodology used to obtain the DNA: Group 1-PrepFiler™ Forensic DNA Extracted methodology (9 fired cartridges and 9 unfired cartridges) and Group 2-Organic methodology, also with eighteen samples (9 fired cartridges and 9 unfired cartridges).

The samples of Group 1 were extracted following PrepFiler™ Forensic DNA Extraction protocol [7], recommended by the manufacturer. In PrepFiler™ Forensic DNA Extraction methodology, swab samples were digested with 300 µL of PrepFiler™ Lyses Buffer and 3 µL of DTT at 70°C for 40 minutes in a thermal shaker. Following digestion, the entire content was placed in a spin basket and centrifuged at 12,000 rpm for 2 minutes, separating all solid portions to collect liquid. Sample lysate tubes were allowed to come to room temperature, 15 µL of magnetic particles were pipetted into the tubes and centrifuged at low speed for 10 seconds. 180 µL of isopropanol were added to the sample lysate tubes, vortexed and centrifuged at low speed for 5 seconds. Then, sample lysate tubes were placed on a vortexer and mixed at room temperature at 1,000 rpm for 10 minutes. Samples were placed in a magnetic stand for 2 minutes and it was observed that the magnetic particles formed a pellet against the back of the tube. With a pipette, all visible liquid phase was carefully removed and discarded. 300 µL of prepared PrepFiler™ Wash Buffer was added to the sample DNA tube and it was removed from the magnetic stand, vortexed and centrifuged at 10,000 rpm for 5 seconds. Samples were placed in the magnetic stand again for 60 seconds. This procedure was repeated three times. With the remaining sample tubes in the magnetic stand, all visible liquid phase was removed and discarded and with the tube open, the bound-DNA magnetic particles were allowed to air-dry for 10 minutes. Then, 50 µL of PrepFiler™ Elution Buffer was added to the sample DNA tubes that were capped, vortexed, centrifuged at 10,000 rpm for 5 seconds and incubated at 70 °C in a thermal shaker at 900 rpm for 5 minutes. Samples were vortexed and centrifuged at 10,000 rpm until there was no visible magnetic particle pellet on the side of the tube. Then, samples were placed for 1 minute in the magnetic stand again, until the size of the pellet at the side of the tube stopped to increase. The liquid, which contained the isolated genomic DNA, was pipetted to a new tube for storage.

In the organic methodology (samples of Group 2), swab cells were digested with adding 300 µL of SEB, 24 µL of Proteinase K and 48 µL of DTT and incubated at 56 °C for 24 hours. More 2 µL was added into the sample tubes, 2 hours before the next steps. 500 µL of phenol chloroform solution was added and samples were vortexed and centrifuged at 12,000 rpm for 7 minutes. All the liquid phase was then pipetted into the Microcon 100 concentrating units containing 100 µL of ultra pure water and centrifuged at 2,700 rpm until all volume was filtrated. After that, 400 µL of ultra pure water (2 x 200 µL) was pipetted into the membrane and they were centrifuged at 2,700 rpm until all volume was filtrated. 50 µL of ultra pure water was added into the membrane that was turned upside down and the genomic DNA was recovered by centrifuging at 3,700 rpm for 7 minutes. The tubes were incubated at 95°C for 10 minutes and stored.

DNA quantitation

Quantitation was performed using the Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) and 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), following the manufacture's specifications [8].

PCR amplification and genotyping

The AmpFISTR® Minifiler™ kit (Applied Biosystems, Inc. ABI) was used following the manufacture's specifications [9]. Ten microliters of sample extracted using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction and organic methodologies were used in a total reaction volume of 25 µL. Thermocycling was performed on a Veriti® thermocycler (ABI) following the manufacture's protocol. Samples were analyzed on a 3130xl Genetic Analyzer using POP-4 polymer (ABI), 1 x Genetic Analysis Buffer with EDTA (ABI), a 12 s, 3,0 kV injection, with a 10 RFU threshold at an oven temperature of 60 °C with a 36cm capillary, 50 µm i.d. bare silica capillary. Data was collected with Data Collection Software v.3.0 (ABI) and analyzed with GeneMapper® ID v.3.2 Software (ABI).

STR profile types

As suggested, [5] short tandem repeat (STR) profiles were divided into four categories. A full profile was defined as all of donor's alleles detected, strong partial profile as 50% or more of the expected alleles observed and a weak partial profile was defined as less than 50% of

the expected alleles. No profile was determined as no alleles present. The percentage was calculated dividing the number of the donor's alleles observed divided by the total number of alleles expected and multiplying it by 100.

RESULTS AND DISCUSSION

The purpose of this research was to observe if the DNA present in fired and unfired cartridge cases was recoverable, amplifiable and useful in forensic lab routine. In order to find the best one, two types of extraction methods were tested. Three known shedders handled the ammunition, which were fired or just handled and swabbed to show the presence of DNA. The samples were amplified and analyzed.

In both Goups (1-PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit; 2-Organic), the DNA concentration varies among fired and unfired cartridge, but it was not significant. In Tables 3 and 4 there are the P values calculated between the total DNA concentration (pg) obtained from fired and unfired cartridges inside the Group 1 ($P=0.0611$) and Group 2 ($P=0.2539$). However, the comparison between methods showed significant differences in total DNA concentration (pg) according to the cartridge types. From fired cartridges, it was possible to have higher DNA concentration with the PrepFiler™ kit ($468\pm364\text{pg}$) than with the organic method ($90\pm10\text{pg}$) ($P<0.001$). From unfired cartridges, it was possible to have higher DNA concentration with the PrepFiler™ kit ($339\pm228\text{pg}$) than with the organic method ($106\pm99\text{pg}$) ($P=0.02$).

We analyzed the profiles success with the use of AmpFISTR® Minifiler™ kit obtained from DNA obtained from different methodologies. The AmpFISTR® Minifiler™ commercial kit can amplify a total of 8 no coding regions plus amelogenin, with a total of 18 alleles. Table 3 shows that the P value calculated between the total number of alleles obtained from fired and unfired cartridges inside the Group 1 was not different ($P=0.4415$), but there was a significant difference inside the Group 2 ($P=0.0015$) ones. The comparison between DNA extraction methodologies showed that there was no significant difference in the total number of alleles in the fired cartridge cases ($P=0.1255$), but from unfired cartridges it was possible to have a higher allele number with the PrepFiler™ kit ($7.5\pm3.2\text{pg}$) than with the organic method ($1.1\pm1.6\text{pg}$) ($P<0.001$).

Finally, we compared the 3 shooters because gender, ethnicity, characteristics of the skin (oily, normal or dry) and/or sweating could be important. We noticed that there were no differences among the 3 shooters by DNA concentration ($P=0.6602$; Kruskal-Wallis Test) or by the number of obtained alleles ($P=0.9394$; Kruskal-Wallis Test).

It is interesting to point out that there is a lack of STR profile from both unfired and fired cartridge cases, as also observed in previous research [5]. This fact provides evidence for the presence of inhibitors in this type of samples. It is known that DNA degradation resulting from the heat could damage its integrity, but it is not the only way to interfere with the amplification reaction and the sample quality. Working with poor DNA samples is challenging and the data presented here suggests the presence of inhibitors, but further work is essential. The initial concentration of DNA template is also a challenge. To use the kit AmpFISTR® Minifiler™, one of the most sensitive ones, an ideal initial concentration of $0.05\text{ng}/\mu\text{l}$ is needed, almost 10x more than what we found in some of our samples.

With this investigation, we concluded that the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit was better than the organic method and it can be useful to obtained DNA from swabed cartridges. However, the DNA obtained had concentration below the necessary to the complete success of DNA profile using the AmpFISTR® Minifiler™ kit.

This study demonstrated that fired cartridges can be used as a source of DNA in order to provide some information about the person who handled it. However, considering the cost-effective analysis of the strategy it is not the priority in the routine of the Forensic Laboratory. In many situations, though, this may be the only option for researchers and at that time, the results and protocols presented here could be fundamental.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul (IGP/RS). Special thanks to the team of IGP/RS, Setor de Balística Forense, for volunteering their time to be a part of this work.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL STANDARDS

This investigation was approved by the Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil. (CEP Resolution no. 11/05523).

REFERENCE

- [1] Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int* 129:25–34. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00207-4
- [2] Petricevic SF, Bright JA, Cockerton SL (2006) DNA profiling of trace DNA recovered from bedding. *Forensic Sci Int* 159:21–26. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.06.004
- [3] van Hoofstat DE, Deforce DL, Hubert De Pauw IP, Van den Eeckhout EG (1999) DNA typing of fingerprints using capillary electrophoresis: effect of dactyloscopic powders. *Electrophoresis* 20:2870–2876. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:14<2870::AID-ELPS2870>3.0.CO;2-V
- [4] Zhang L, Wu Q (2005) Single gene retrieval from thermally degraded DNA. *J Biosci* 30:599–604.
- [5] Horsman-Hall KM, Orihuela Y, Karczynski SL, Davis AL, Ban JD, Greenspoon SA (2009) Development of STR profiles from firearms and fired cartridge cases. *Forensic Sci Int Genet* 3:242–250. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.02.007
- [6] Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villaneuva E (1997) An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J Forensic Sci* 42:320–322.
- [7] Applied, Biosystems, PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit User's Manual, Applied Biosystems, Foster City, CA, 2008.
- [8] Applied, Biosystems, Quantifiler™ Kits User's Manual, Applied Biosystems, Foster City, CA, 2010.
- [9] Applied, Biosystems, AmpFISTR® Minifiler™ Amplification Kit User's Manual, Applied Biosystems, Foster City, CA, 2006.

TABLE CAPTIONS

Table 1. Results obtained using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit for extraction (Group 1 samples).

Table 2. Results obtained using Organic method for extraction (Group 2 samples).

Table 3. DNA Quantitation using Quantifiler® Human DNA Quantification kit from samples extracted using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (Group 1 samples).

Table 4. DNA Quantitation using Quantifiler® Human DNA Quantification kit from samples extracted using Organic methodology of extraction (Group 2 samples).

FIGURE CAPTIONS

Fig.1. This figure shows one shooter who were tested in a moment, whose was obtained six cartridges (3 cartridges to be fired and 3 cartridge to be unfired). We analyze 3 shooters in two different moments under the same conditions. We obtained a total of 36 samples (3 shooters X 2 moments X 6 cartridges).

Table 1. Profiles obtained using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit for extraction (Group 1 samples).

FIRED																			
SHOOTER	D13		D7		CSF		FGA		D16		D18		D2		D21		AM		Profile quality
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A	•	•	•	•								•		•					Weak Partial
1B	•	•				•					•		•	•	•	•	•	•	Strong Partial
1C	•	•		•	•						•				•		•	•	Weak Partial
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A			•	•	•		•				•	•			•	•	•		Strong Partial
2B																			No Profile
2C	•		•								•	•	•				•	•	Weak Partial
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A		•			•		•			•				•				•	Weak Partial
3B																•	•	•	Weak Partial
3C	•	•		•			•		•	•					•	•	•	•	Strong Partial
UNFIRED																			
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A	•		•	•	•				•	•	•				•		•	•	Strong Partial
1B	•		•		•												•	•	Weak Partial
1C					•		•							•					Weak Partial
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A	•		•		•				•	•						•			Weak Partial
2B	•						•	•	•		•	•	•				•		Weak Partial
2C											•	•		•				•	Weak Partial
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A	•	•	•			•	•	•	•	•			•		•	•			Strong Partial
3B	•	•	•		•	•	•	•	•	•					•	•	•	•	Strong Partial
3C		•	•	•					•	•			•		•	•			Weak Partial

Table 2. Profiles obtained using Organic methodology of extraction (Group 2 samples).

FIRED																			
SHOOTER	D13		D7		CSF		FGA		D16		D18		D2		D21		AM		Profile quality
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A	•		•		•			•	•						•		•	•	Weak Partial
1B	•	•	•	•							•		•				•	•	Weak Partial
1C									•	•									Weak Partial
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A	•						•										•	•	Weak Partial
2B		•	•				•	•	•		•	•					•	•	Strong Partial
2C			•						12	12		15					•		Weak Partial
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A	•		•			•											•		Weak Partial
3B		•			•	•											•	•	Weak Partial
3C					•	•													Weak Partial
UNFIRED																			
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A											•						•	•	Weak Partial
1B																			No Profile
1C																			No Profile
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A																			No Profile
2B	•	•						•	•										Weak Partial
2C																			No Profile
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A		•											•				•		Weak Partial
3B																			No Profile
3C																			No Profile

Table 3. DNA Quantitation using Quantifiler® Human DNA Quantification kit from samples extracted using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (Group 1 samples).

FIRED			
SHOOTER	Total DNA (pg)	DNA Concentration (pg/μl)	# Alleles
1A	125.7434	5.03	6
1B	1428.2675	57.13	10
1C	509.0622	20.36	8
2A	548.1391	21.93	9
2B	355.1700	14.21	0
2C	315.7337	12.63	7
3A	200.0989	8.00	6
3B	466.8818	18.68	3
3C	271.6133	10.86	10
MEDIA	468.9677		6.5
SD	364.1746		3.1
UNFIRED			
1A	75.41611	3202	10
1B	224.2046	8.97	5
1C	214.8579	8.59	3
2A	522.9472	20.92	6
2B	91.3145	3.65	8
2C	649.5819	25.98	4
3A	298.6398	11.95	11
3B	98.6637	3.95	13
3C	199.2710	7.97	8
MEDIA	339.2935		7.5
SD	228.8880		3.2
P value*	0.0611		0.4415

*P value was calculated between total DNA concentration (pg) obtained from fired and unfired cartridges with Mann-Whitney Test.

Table 4. DNA Quantitation using Quantifiler® Human DNA Quantification kit from samples extracted using Organic methodology of extraction (Group 2 samples).

FIRED			
SHOOTER	Total DNA (pg)	DNA Concentration (pg/μl)	# Alleles
1A	123.9300	4.96	8
1B	83.5572	3.34	8
1C	43.8075	1.75	2
2A	106.8321	4.27	4
2B	115.2435	4.61	9
2C	57.8210	2.31	5
3A	58.4372	2.34	4
3B	280.0420	11.20	5
3C	38.8948	1.55	2
MEDIA	90.8565		5.2
SD	10.0951		2.4
UNFIRED			
1A	104.2899	4.17	3
1B	38.9587	1.56	0
1C	16.3457	0.65	0
2A	344.0670	13.76	0
2B	30.1327	1.21	4
2C	36.3335	1.45	0
3A	200.5836	3.18	3
3B	109.0408	4.36	0
3C	79.5290	8.02	0
MEDIA	106.58677		1.1
SD	99.70702		1.6
P value*	0.2539		0.0015

*P value was calculated between total DNA concentration (pg) obtained from fired and unfired cartridges with Mann-Whitney Test.

Shooter 1; Moment 1 (DNA extration To Group 1)

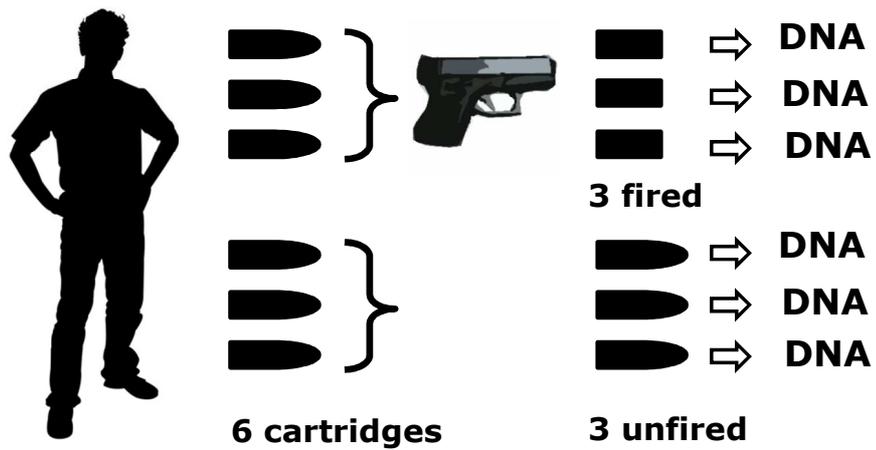


Fig.1. This figure shows one shooter who were tested in a moment, whose was obtained six cartridges (3 cartridges to be fired and 3 cartridge to be unfired). We analyze 3 shooters in two different moments under the same conditions. We obtained a total of 36 samples (3 shooters X 2 moments X 6 cartridges).

Capítulo III

Manual Explicativo e Roteiros de Trabalho para o IGP-RS

- 1- Coleta de estojo deflagrado**
- 2- Coleta de DNA de estojo deflagrado**
- 3- Extração de DNA de estojo deflagrado**
- 4- Quantificação de DNA com kit comercial**
- 5- Amplificação de DNA com kit comercial**

APRESENTAÇÃO

O primeiro crime solucionado com auxílio de ferramentas moleculares de que se tem notícia foi o "Caso Leicester", em 1986 (Watson, 2005). Este caso mostrou aos órgãos de segurança do mundo inteiro que a identificação genômica representava o futuro da ciência criminal. Desde então, amostras de diversos tipos foram incorporadas à rotina forense, e também os problemas inerentes a este tipo de amostra foram surgindo. O laboratório de DNA forense precisa lidar muitas vezes com amostras que se apresentam aquém das condições ideais de armazenamento e conservação. Este material biológico pode ter sido exposto a condições ambientais severas, como calor intenso ou umidade, por segundos, dias, meses ou anos, o que pode ocasionar sua degradação. Especificamente, para o caso dos cartuchos deflagrados, a exposição à alta temperatura no momento do disparo é breve, mas pode degradar o DNA extensivamente, resultando na baixa eficiência da tipificação forense convencional. A exposição a altas temperaturas quebra a molécula de maneira aleatória em pedaços muito pequenos, dificultando a amplificação das regiões específicas utilizadas para a identificação humana de rotina.

Ainda, em muitas situações, a amostra de DNA recolhida na cena do crime em cartuchos/estojo não está somente degradada, mas em concentrações muito baixas (Van Hoofstat et al, 1998; Lowe et al, 2003). Entretanto, é esperado que perfis de DNA sejam obtidos a partir das células que são deixadas nos estojos/cartuchos. As atuais tecnologias permitem extrair DNA e obter perfil de ferramentas manuseadas, tais como facas e armas, permitindo indicar os indivíduos que os manusearam. Lowe e colaboradores (2003) e Phipps e Petricevic (2006) descreveram a presença de DNA passível de análise em diversos tipos de materiais. Naquele momento, estes autores classificaram os indivíduos como good shedders e bad shedders, de acordo com a qualidade do perfil genético obtido de cada doador.

SOBRE O PRESENTE TRABALHO

Disparo e Coleta dos Estojos/Cartuchos

Neste trabalho, o local de simulação dos disparos foi controlado sob condições que previnem a contaminação dos objetos de estudo por DNA que não fosse do atirador. Nesse sentido, as superfícies dos estojos foram previamente limpas com uma solução de detergente Extran® Neutro (MA 02) foram expostas à luz UV por 10min. Estes passos reduziram os riscos de contaminação por DNA estranho. Além disto, toda a área do solo onde caíram os estojos foi protegida com papel craft (tipo pardo).

Coleta de cartuchos deflagrados: Cada examinador manipulou três cartuchos, por 15s e imediatamente após municiou a arma. Foram produzidos três disparos em sequência. Efetuados os disparos, cada estojo deflagrado foi coletado. Com auxílio de uma pinça estéril descartável foi coletado, por outro examinador, e armazenado em envelope de papel, individual e estéril. A arma de fogo utilizada foi do tipo pistola semi-automática, (Figura 3),

disponibilizada pelo Setor da Balística do Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, onde também foram realizados os disparos.



Figura 3. Pistola semi-automática 0.380, Modelo PT 58S, Marca Taurus. Fonte: cedida pela Perita Joseli Baldasso do IGP/RS, 2009.

Coleta de cartuchos deflagrados: Os mesmos três examinadores manusearam mais três cartuchos que não foram deflagrados ou municidados, totalizando mais nove amostras. Ao todo, três examinadores foram submetidos aos processos descritos acima, totalizando nove amostras.

Ao todo, os três examinadores foram submetidos aos processos descritos acima, por duas vezes: a primeira vez para a coleta de células para a extração de DNA com o kit comercial e a segunda vez para a coleta de células para extração de DNA com o método orgânico. Totalizaram nove amostras por examinador para cada vez, o que soma 36 amostras.

Os envelopes contendo os estojos permaneceram em temperatura ambiente até o momento da coleta de DNA. A coleta de estojos manuseados pelos mesmos examinadores foi realizada para a comparação entre a eficiência de obtenção de DNA e de perfis genéticos com ou sem a exposição à temperatura elevada. Ainda outros fatores, como características da pele, poderiam influenciar na quantidade de DNA deixada no estojo.

Foram coletadas amostras da mucosa oral com *swab* dos examinadores para servir de referência no momento das análises.

Coleta e Extração de DNA dos Estojos

Para a coleta de DNA dos estojos, deflagrados ou não, utilizou-se a técnica do duplo *swab* descrita por D. Sweet e colaboradores em 1997 e utilizada por outros autores (Pang et al, 2007). Esta técnica consiste em passar primeiramente um *swab* estéril, umedecido com água ultra pura, em toda a superfície do estojo e em seguida um *swab* seco também estéril. Os dois *swabs* foram utilizados na extração visando aumentar a concentração de DNA no tubo. Esta etapa da pesquisa foi realizada no Setor de Balística do Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul, 20 minutos após efetuarem-se os disparos ou os manuseios.

A quantidade e a qualidade do DNA extraído de uma amostra forense podem ter um alto impacto no sucesso do resultado final. Amostras forenses como estas são especialmente difíceis de se processar, pois suas quantidade e qualidade são limitadas. Buscando minimizar as variantes naturais decorrentes das rotinas de análises laboratoriais, optou-se nesta investigação pela utilização de kit comercial para extração de DNA PrepFiler™ Forensic DNA Extraction, da Applied Biosystems, (Brennov et al, 2009).

Paralelamente foi realizada a extração orgânica das amostras coletadas.

MiniSTRs

STRs são regiões do DNA com seqüências que se repetem adjacentes uma a outra cujo tamanho da unidade de repetição varia de dois a seis pares de base. O perfil de DNA baseado em STR é o método mais popular de identificação devido à natureza altamente polimórfica e sua fácil genotipagem quando em condições adequadas (Edwards *et al.*, 1991, Hammond et al, 1994). A amplificação do DNA ocorre através da técnica conhecida com reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), onde milhões de cópias de STR são feitas com alta especificidade e sensibilidade. Muitos *kits* comerciais de análise de STR têm um limite de sensibilidade inferior a 250 pg e uma eficiência ótima quando 1ng de DNA é amplificado (Sparkes et al, 1996), concentração que muitas vezes não é obtida.

Entretanto, amplificações com STR podem falhar com produtos de PCR de tamanho entre 300 a 500 pares de bases, quando o DNA é degradado (Findlay et al, 1997; Grubwieser et al, 2006). Em amostras superaquecidas, a molécula de DNA pode estar bastante degradada, reduzindo a eficácia de obtenção de perfil genético completo com regiões de STR como alvo.

Os ensaios com miniSTR têm sido uma alternativa para os laboratórios que lidam com amostras com baixíssimas concentrações de DNA íntegro. Diferente dos STR padrão, cujas seqüências são mais longas, o alvo dos miniSTR são menores, aumentando as chances de sucesso na amplificação total.

As amostras desta pesquisa foram amplificadas para o DNA nuclear com o *kit* comercial *AmpFISTR*® Minifiler™, da *Applied Biosystems*. O protocolo utilizado para estas reações seguiu orientações do fabricante. Os perfis foram classificados de acordo com a porcentagem de alelos obtidos em relação aos esperados, assim, um perfil completo corresponde a um perfil com 100% dos alelos esperados, perfil forte, 50% ou mais dos alelos esperados, perfil fraco, menos de 50% dos alelos esperados e No Profile, ou nenhum alelo esperado (Horsmann et al, 2009) e os resultados são apresentados nas tabelas 1 à 4.

Quantificação de DNA

Foi realizada a quantificação de DNA para fins de comparação entre a quantidade de DNA presente em dois grupos, o grupo de estojos deflagrados e o grupo de estojos não deflagrados. Usou-se o *kit* comercial Quantifiler® Human DNA Quantification, da Applied

Biosystems. No total, DNA de trinta estojos foram utilizados. O equipamento de PCR em tempo real utilizado foi o 7500 Real-Time PCR System, da Applied Biosystems . Todos os procedimentos seguiram os protocolos apresentados no Guia do usuário dos *kits* Quantifiler da Applied Biosystems. Os resultados da quantificação foram analisados com auxílio do pacote de softwares instalado no equipamento. Os resultados da quantificação são apresentados nas tabelas 3 e 4.

Genotipagem do amplificado

A genotipagem das amostras amplificadas foi realizado no sequenciador automático *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer*, da Applied Biosystems, disponibilizado pelo Setor de Genética Forense do IGP/RS, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. Os genótipos são apresentados em eletroferogramas que mostram, em gráficos, os picos correspondentes às regiões que foram amplificadas e detectadas na eletroforese capilar. O padrão de picos apresentados gera um perfil e identifica geneticamente cada indivíduo. As análises foram realizadas com *GeneMapper® Software 4.0*, utilizando-se um *threshold* de 10 unidades relativas de fluorescência e para facilitar a interpretação todos os *overlappings* foram removidos. Os resultados dos perfis genéticos obtidos são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Table 1. Profiles obtained using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction kit for extraction (Group 1 samples).

FIRED																			
SHOOTER	D13		D7		CSF		FGA		D16		D18		D2		D21		AM		Profile quality
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A	•	•	•	•								•		•					Weak Partial
1B	•	•				•					•		•	•	•	•	•	•	Strong Partial
1C	•	•		•	•						•				•		•	•	Weak Partial
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A			•	•	•		•				•	•			•	•	•		Strong Partial
2B																			No Profile
2C	•		•								•	•	•				•	•	Weak Partial
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A		•			•		•			•				•				•	Weak Partial
3B																•	•	•	Weak Partial
3C	•	•		•			•		•	•					•	•	•	•	Strong Partial
UNFIRED																			
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A	•		•	•	•				•	•	•				•		•	•	Strong Partial
1B	•		•		•												•	•	Weak Partial
1C					•		•							•					Weak Partial
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A	•		•		•				•	•						•			Weak Partial
2B	•						•	•	•		•	•	•				•		Weak Partial
2C											•	•		•				•	Weak Partial
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A	•	•	•			•	•	•	•	•			•		•	•			Strong Partial
3B	•	•	•		•	•	•	•	•	•					•	•	•	•	Strong Partial
3C		•	•	•					•	•			•		•	•			Weak Partial

Table 2. Profiles obtained using Organic methodology of extraction (Group 2 samples).

FIRED																			
SHOOTER	D13		D7		CSF		FGA		D16		D18		D2		D21		AM		Profile quality
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A	•		•		•			•	•						•		•	•	Weak Partial
1B	•	•	•	•							•		•				•	•	Weak Partial
1C									•	•									Weak Partial
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A	•						•										•	•	Weak Partial
2B		•	•				•	•	•		•	•					•	•	Strong Partial
2C			•						12	12		15					•		Weak Partial
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A	•		•			•												•	Weak Partial
3B		•			•	•											•	•	Weak Partial
3C					•	•													Weak Partial
UNFIRED																			
Reference 1	11	13	10	11	9	11	22	25	11	11	15	17	21	25	29	31	X	X	Full
1A											•						•	•	Weak Partial
1B																			No Profile
1C																			No Profile
Reference 2	12	13	12	12	13	14	20	21	12	12	12	15	22	23	28	29	X	Y	Full
2A																			No Profile
2B	•	•						•	•										Weak Partial
2C																			No Profile
Reference 3	11	12	10	12	12	12	23	25	10	13	11	11	19	21	29	31.2	X	Y	Full
3A		•											•				•		Weak Partial
3B																			No Profile
3C																			No Profile

Table 3. DNA Quantitation using Quantifiler® Human DNA Quantification kit from samples extracted using PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (Group 1 samples).

FIRED			
SHOOTER	Total DNA (pg)	DNA Concentration (pg/μl)	# Alleles
1A	125.7434	5.03	6
1B	1428.2675	57.13	10
1C	509.0622	20.36	8
2A	548.1391	21.93	9
2B	355.1700	14.21	0
2C	315.7337	12.63	7
3A	200.0989	8.00	6
3B	466.8818	18.68	3
3C	271.6133	10.86	10
MEDIA	468.9677		6.5
SD	364.1746		3.1
UNFIRED			
1A	75.41611	3202	10
1B	224.2046	8.97	5
1C	214.8579	8.59	3
2A	522.9472	20.92	6
2B	91.3145	3.65	8
2C	649.5819	25.98	4
3A	298.6398	11.95	11
3B	98.6637	3.95	13
3C	199.2710	7.97	8
MEDIA	339.2935		7.5
SD	228.8880		3.2
P value*	0.0611		0.4415

*P value was calculated between total DNA concentration (pg) obtained from fired and unfired cartridges with Mann-Whitney Test.

Table 4. DNA Quantitation using Quantifiler® Human DNA Quantification kit from samples extracted using Organic methodology of extraction (Group 2 samples).

FIRED			
SHOOTER	Total DNA (pg)	DNA Concentration (pg/μl)	# Alleles
1A	123.9300	4.96	8
1B	83.5572	3.34	8
1C	43.8075	1.75	2
2A	106.8321	4.27	4
2B	115.2435	4.61	9
2C	57.8210	2.31	5
3A	58.4372	2.34	4
3B	280.0420	11.20	5
3C	38.8948	1.55	2
MEDIA	90.8565		5.2
SD	10.0951		2.4
UNFIRED			
1A	104.2899	4.17	3
1B	38.9587	1.56	0
1C	16.3457	0.65	0
2A	344.0670	13.76	0
2B	30.1327	1.21	4
2C	36.3335	1.45	0
3A	200.5836	3.18	3
3B	109.0408	4.36	0
3C	79.5290	8.02	0
MEDIA	106.58677		1.1
SD	99.70702		1.6
P value*	0.2539		0.0015

*P value was calculated between total DNA concentration (pg) obtained from fired and unfired cartridges with Mann-Whitney Test.

DISCUSSÃO

O objetivo central desta pesquisa foi verificar a viabilidade de se utilizar uma amostra coletada a partir de estojo/cartucho deflagrado e sua inclusão na rotina de um laboratório forense. Foi possível concluir que sim, é viável obter um perfil autossômico que permita análise do DNA do indivíduo envolvidos que manipulou o estojo/cartucho.

Testamos duas metodologias diferentes de extração: orgânica e com *kit* comercial PrepFiler™ Forensic DNA Extraction. Concluímos que o kit de extração PrepFiler™ Forensic DNA foi melhor do que o método orgânico e pode ser útil para o DNA obtido a partir de células deixadas em cartuchos deflagrados. No entanto, o DNA obtido teve concentração abaixo do necessário para o sucesso completo do perfil de DNA analisado pelo kit AmpFISTR® Minifiler™ kit.

Este estudo demonstrou que é possível utilizar estojos deflagrados ou não, como fonte de DNA com a finalidade de identificar os envolvidos com o seu manuseio. Contudo, considerando o rendimento limitado, a eficácia restrita e, sobretudo, o custo-benefício, entende-se que a estratégia de análise de DNA oriundo de células deixadas em cartuchos/estojos não seja a prioritária na rotina do Laboratório Forense. Mas, em muitas situações, essa pode ser a única opção dos investigadores e, nesse momento, nossos resultados e protocolos aqui apresentados terão importância fundamental.

ROTEIRO PARA COLETA DE ESTOJO DEFLAGRADO

(Adaptado com base em Horsman-Hall et al. 2009)

Material necessário

- EPI's
 - Touca
 - Máscara
 - Pró-pé
 - Jaleco
 - Luvas descartáveis
- Material para coleta do estojo
 - Pinças ou ponteiros para pipeta descartáveis
 - Envelopes tamanho A7 ou A6 autoclavados/banhos de UV
- Outros materias
 - Fita Adesiva
 - Lápis ou caneta
 - Termômetro de ambiente

Organizar todo o material em uma maleta ou caixa plástica.

Procedimento

1. **Antes** de entrar no local delimitado contendo os estojos deflagrados, coloque touca, máscara, jaleco, pró-pé e luvas descartáveis.
2. Identifique apenas **visualmente** onde estão os estojos, isso facilita a dinâmica da coleta;
3. **Manuseie** todos os seus objetos de coleta **com cuidado** e delicada e calmamente, evitando que caiam ou se contaminem;
4. Separe em maleta ou caixa de coleta, um envelope e uma pinça ou ponteiro descartável para cada estojo encontrado no local, é importante **coletá-los e armazená-los individualmente**;
5. Se dirija, com o envelope, para um dos estojos e o recolha com o auxílio da pinça ou ponteiro. Tome cuidado para não pisar ou derrubar os demais estojos ou outros vestígios presentes;
6. Retorne ao local onde estão está sua maleta ou caixa de coleta, feche o envelope com fita adesiva o envelope e o identifique com um lápis ou caneta. Evite chacoalhar o envelope;
7. Troque de luvas a cada novo estojo;
8. Repita os mesmos procedimentos para cada um dos estojos encontrados.
9. Ao término de suas coletas, armazene cuidadosa e ordenadamente todos os envelopes em um recipiente plástico ou de isopor.

Recomendações

1. Não é necessário armazenar os envelopes contendo os estojos em ambiente refrigerado desde que sejam entregues ao Setor de Genética Forense dentro de do período de uma hora.
2. Caso note que contaminou sem intenção o estojo, faça uma observação no envelope.
3. Faça anotações como temperatura e condições (preservado ou não) do local de coleta.

ROTEIRO PARA COLETA DE DNA DE ESTOJO DEFLAGRADO

(Técnica do Duplo Swab - Sweet et al, 1997)

Material necessário

- EPI's
 - Touca
 - Máscara
 - Jaleco
 - Luvas descartáveis
- Material para coleta de DNA do estojo
 - *Swabs* estéreis
 - Microtubos de 2,0ml estéreis
 - *PrepFiler™ Lysis Buffer*
 - Lâmina de bisturi tamanho 10
 - Água ultrapura
- Outros materiais
 - Hipoclorito 10%
 - Toalhas de papel
 - Estante para os microtubos
 - Caneta para escrever em microtubos
 - Removedor de grampos
 - Pinça/ponteira de pipeta estéril

Procedimento

1. **Antes** de iniciar a coleta de DNA, coloque touca, máscara, jaleco e luvas descartáveis.
2. Limpe toda a superfície da bancada que será utilizada com auxílio das toalhas de papel e **hipoclorito 10%**;
3. Identifique os microtubos de acordo com as identificações dos envelopes;
4. Remova os grampos do envelope e retire cuidadosamente o estojo com auxílio da pinça ou ponteira;
5. **Embeba um *swab* em água ultrapura** de maneira que fique ensopado e o esfregue por toda a superfície do estojo. Tenha cuidado para que não pingue ou escorra água do estojo. Esta etapa hidrata as células que possam estar presentes;
6. Reserve o estojo.
7. Corte, com auxílio da lâmina de bisturi, todo o algodão mais externo do *swab* e o coloque no respectivo microtubo. Reserve a lâmina.
8. Com um novo *swab* seco esfregue novamente, desta vez apenas a ponta, toda a superfície do mesmo estojo, coletando por capilaridade as células que foram hidratadas;
9. Guarde o estojo, ele não será mais utilizado;
10. Corte, com auxílio da mesma lâmina de bisturi, apenas a ponta do algodão do *swab* e o coloque no mesmo tubo que já está o primeiro *swab* (úmido).
11. Armazene em local refrigerado até o momento da extração de DNA. Não é aconselhável armazenar por períodos maiores do que 12h.

ROTEIRO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE ESTOJO DEFLAGRADO

(Segundo PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit User's Manual)

Material necessário

- EPI's

- Touca
- Máscara
- Jaleco
- Luvas descartáveis

- Material para extração de DNA

- Microtubos de 2,0ml estéreis
- Estante magnética
- Cestas para microtubo de 2,0ml
- *PrepFiler™ Lysis Buffer*
- *PrepFiler™ Magnetic Particles*
- *PrepFiler™ Wash Buffer Concentrate*
- *PrepFiler™ Elution Buffer*
- Isopropanol PA
- DTT 10M

- Outros materiais

- Hipoclorito 10%
- Toalhas de papel
- Estante para os microtubos
- Caneta para escrever em microtubos
- Ponteiras e pipetas

- Equipamentos necessários

- *Vortex*
- Agitador térmico
- Agitador
- Centrífuga
- Bloco térmico

Procedimento

1. **Antes** de iniciar a extração de DNA, coloque touca, máscara, jaleco e luvas descartáveis.
2. Limpe toda a superfície da bancada que será utilizada com auxílio das toalhas de papel e **hipoclorito 10%**;
3. Adicione 300µL de *PrepFiler™ Lysis Buffer* e 3µL DTT ao tubo contendo os *swabs*. Agite em um *vortex* e dê um *spin* rápido;
4. Incube por 40min à 70°C em um agitador térmico;
5. Identifique um novo tubo de 2,0ml e coloque nele uma cesta compatível com o tubo.
6. Com auxílio de uma ponteira estéril ou pinça, **passar todo o conteúdo** do primeiro tubo para a cestinha e centrifugar a 12.000 rpm por 2min, separando todo o sólido;
7. Deixar à temperatura ambiente por 5min enquanto descongela e dá um rápido *vortex* no tubo com as partículas magnéticas;
8. Adicionar ao novo tubo 15µL das partículas magnéticas, dar *vortex* e *spin* breves;
9. Adicionar 180µL de isopropanol, dar *vortex* e *spin* breves;
10. Deixar a tubo em um agitador por 10min a 1 rpm;
11. Dar um *vortex* e *spin* e colocar na estante magnética e aguardar de 2 a 5 min ou até que se forme um *pellet*;
12. Sem retirar o tubo da estante magnética, com uma ponteira pequena, até 200µL, retirar todo o líquido sem tocar o *pellet*. Tomar muito cuidado para não pipetar o *pellet*;
13. Adicionar 300µL de *PrepFiler™ Wash Buffer*, dar *vortex* até sumir o *pellet* e colocar novamente na estante magnética;
14. Aguarde formar novamente o *pellet* e repita os passos 12 e 13 por mais 2 vezes;
15. Com o tubo na estante magnética, retirar todo o líquido e deixar o tubo aberto por 10min a temperatura ambiente;
16. Adicionar 50 µL de *PrepFiler™ Elution Buffer*, dar *vortex* e *spin*;
17. Incubar por 5min à 70°C, dar *vortex* levemente e recolocar na estante magnética;
18. Aguarde formar o *pellet* e passe todo o líquido para um novo tubo identificado;
19. DNA extraído, armazenar à 8°C se for utilizar dentro de 48h ou à -20°C para maior período de tempo.

Recomendações

- Ao todo são usados 3 microtubos de 2,0ml por amostra. Identifique-os previamente para evitar troca de tubos.
- O uso de alguns equipamentos pode ser substituído, conforme recomendação no manual do usuário do *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit*.
- Troque de luvas com frequência, este *kit* é bastante sensível e uma contaminação se dá facilmente.

ROTEIRO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA COM KIT COMERCIAL

(Segundo Quantifiler® Human DNA Quantification Kit User's Manual)

Material necessário

- EPI's

- Touca
- Máscara
- Jaleco
- Luvas descartáveis

- Material para quantificação de DNA

- Microtubos de 0,2ml estéreis
- Microtubos de 0,5ml estéreis
- Microplacas de 96 poços, 0,2ml
- Adesivo Óptico
- Água Ultra Pura
- *Quantifiler Human Primer Mix*
- *Quantifiler PCR Reaction Mix*

- Outros materiais

- Hipoclorito 10%
- Toalhas de papel
- Estante para os microtubos
- Caneta para escrever em microtubos
- Ponteiras e pipetas

- Equipamentos necessários

- *Vortex*
- Centrífuga
- Bloco térmico
- Real Time

Procedimento

1. **Antes** de iniciar a amplificação de DNA, coloque touca, máscara, jaleco e luvas descartáveis.
2. Limpe toda a superfície da bancada que será utilizada com auxílio das toalhas de papel e **hipoclorito 10%**.
3. Separe todas as amostras extraídas que serão utilizadas, incluindo os controles.
4. Dê *vortex* e *spin* em todas as amostras.
5. Prepare o *mastermix* conforme quadro abaixo:

Reagente	Volume por reação (µL)
<i>Quantifiler Human Primer Mix</i>	10,5
<i>Quantifiler PCR Reaction Mix</i>	12,5
Amostra, controle ou padrão	2,0

6. O volume final é de 25µL.

7. Prepare e pipete na placa a curva padrão conforme a quadro abaixo:

Padrão	Concentração (ng/µL)	Volumes	Fator de diluição
1	50,00	10 µL padrão estoque + 30 µL água ultra-pura	4x
2	16,7	10 µL Padrão 1 + 20 µL de água ultra-pura	3x
3	5,56	10 µL Padrão 2 + 20 µL de água ultra-pura	3x
4	1,85	10 µL Padrão 3 + 20 µL de água ultra-pura	3x
5	0,62	10 µL Padrão 4 + 20 µL de água ultra-pura	3x
6	0,21	10 µL Padrão 5 + 20 µL de água ultra-pura	3x
7	0,068	10 µL Padrão 6 + 20 µL de água ultra-pura	3x
8	0,023	10 µL Padrão 7 + 20 µL de água ultra-pura	3x

8. Dê *vortex* e *spin* em todas as amostras novamente e leve a placa para o qPCR.

Recomendações

- Verifique demais recomendações no manual do *kit* disponível no site www.lifetechnologies.com
- Troque de luvas a cada etapa e mantenha sua área de trabalho sempre limpa.

ROTEIRO PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM KIT COMERCIAL

(Segundo AmpFISTR® MiniFiler™ User's Manual)

Material necessário

- EPI's

- Touca
- Máscara
- Jaleco
- Luvas descartáveis

- Material para amplificação de DNA

- Microtubos de 0,2ml estéreis
- Microtubos de 0,5ml estéreis
- Água Ultra Pura
- Control DNA 007
- AmpFISTR® MiniFiler™ Master Mix
- AmpFISTR® MiniFiler™ Primer Set

- Outros materiais

- Hipoclorito 10%
- Toalhas de papel
- Estante para os microtubos
- Caneta para escrever em microtubos
- Ponteiros e pipetas

- Equipamentos necessários

- Vortex
- Centrífuga
- Bloco térmico
- Termociclador

Procedimento

1. **Antes** de iniciar a amplificação de DNA, coloque touca, máscara, jaleco e luvas descartáveis.
2. Limpe toda a superfície da bancada que será utilizada com auxílio das toalhas de papel e **hipoclorito 10%**.
3. Separe todas as amostras extraídas que serão utilizadas, incluindo os controles.
4. Dê *vortex* e *spin* em todas as amostras.
5. Prepare os controles conforme abaixo:

Controle Positivo	Misture 5µL do controle positivo do <i>kit</i> , Control DNA 007 à 5µL de água ultra pura.
Controle Negativo	Adicione 10µL de água ultra pura no tubo de amplificação com o <i>mastermix</i> na amostra de controle negativo.

6. Separe e identifique a quantidade necessária de microtubos de 0,2ml estéreis que serão utilizados na PCR.
7. Calcule os volumes necessários de cada reagente da seguinte forma:

Número de amostras x 10µL de AmpFISTR® MiniFiler™ Master Mix	+	Número de amostras x 5µL AmpFISTR® MiniFiler™ Primer Set
--	---	--

8. Retire o *kit* do *freezer* e deixe descongelar, agite e centrifugue brevemente.
9. Dentro de uma capela previamente limpa, prepare o *mastermix* em um microtubo de volume maior, dê *vortex* e centrifugue brevemente.
10. Pipete 15 µL deste *mastermix* em cada um dos microtubos identificados de 0,2ml.
11. Saia da capela e pipete 5µL de cada amostra em cada um dos microtubos. O volume final deve ser 25µL para a reação cheia. Não é aconselhável diminuir este volume para amostras limítrofes.
12. Coloque no termociclador e aplique o seguinte programa de termociclagem:

Passo de Incubação Inicial	Ciclos (36 ciclos)			Extensão Final	HOLD
	Desnaturação	Anelamento	Extensão		
HOLD	Ciclagem			HOLD	HOLD
95°C 11 min	94°C 20 s	59°C 2 min	72°C 1 min	60°C 45 min	4°C ∞

13. Após o término da termociclagem as amostras devem ser armazenadas a 2°C a 8°C por até 2 semanas, ou a -15°C a -25°C por períodos mais longos.

Recomendações

- Verifique demais recomendações no manual do *kit* disponível no site www.lifetechnologies.com
- Troque de luvas a cada etapa e mantenha sua área de trabalho sempre limpa.

Capítulo IV - Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo central desta pesquisa foi verificar a viabilidade de se utilizar uma amostra coletada a partir de estojo/cartucho deflagrado e sua inclusão na rotina de um laboratório forense. Foi possível concluir que sim, é viável obter um perfil autossômico que permita análise do DNA do indivíduo envolvidos que manipulou o estojo/cartucho.

Testamos duas metodologias diferentes de extração: orgânica e com *kit* comercial PrepFiler™ Forensic DNA Extraction. Concluímos que o kit de extração PrepFiler™ Forensic DNA foi melhor do que o método orgânico e pode ser útil para o DNA obtido a partir de células deixadas em cartuchos deflagrados. No entanto, o DNA obtido teve concentração abaixo do necessário para o sucesso completo do perfil de DNA analisado pelo kit AmpFISTR® Minifiler™ kit.

Este estudo demonstrou que é possível utilizar estojos deflagrados ou não, como fonte de DNA com a finalidade de identificar os envolvidos com o seu manuseio. Contudo, considerando o rendimento limitado, a eficácia restrita e, sobretudo, o custo-benefício, entende-se que a estratégia de análise de DNA oriundo de células deixadas em cartuchos/estojos não seja a prioritária na rotina do Laboratório Forense. Mas, em muitas situações, essa pode ser a única opção dos investigadores e, nesse momento, nossos resultados e protocolos aqui apresentados terão importância fundamental.

BIBLIOGRAFIAS CITADAS NESTE TRABALHO

- Baldasso, J., comunicação pessoal, por e-mail, abril de 2010.
- Pang BMC, Cheung BKK (2007) Double swab technique for collecting touched evidence. *J Legal Med.* Vol. 9, 4:181-184.
- Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, Calandro LM, Furtado MR, Shewale JG (2009) Developmental validation of the PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *J Forensic Sci.* 54:3:599-607.
- Buckleton J (2009) Validation issues around DNA typing of low level DNA. *Forensic Sci Int.* 3:4:255-260.
- Carvalho, JL (2006) Fundamentos da perícia criminal. Campinas: Bookseller, 360 p.
- Esslinger KJ, Siegel JA, Spillane H, Stallworth S (2004) Using STR analysis to detect human DNA from exploded pipe bomb devices. *J. Forensic Sci.* 49:481-484.
- Green R, Roinestad I, Boland C, Hennessy, L (2005) Developmental Validation of the Quantifiler Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. *Journal of Forensic Science*, 50, No. 4.
- Horsman-Hall KM, Orihuela Y, Karczynski SL, Davis AL, Ban JD, Greenspoon SA (2009) Development of STR profiles from firearms and fired cartridge cases. *Forensic Sci Int Genet.* 3:4:242-50.
- Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int.* 129:25-34.
- Pena SDJ (2005) Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. *Parcerias Estratégicas*, v. 20, p. 447 - 460.
- Phipps M, Petricevic S (2007) The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int.* 168(2-3):162-8.
- PrepFiler Protocol
https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/web_content/cms_058141.jpg, acesso em julho de 2010.
- Rabello E (1996) Curso de Criminalística. Porto Alegre: Sagra Luzzatto.
- Sparkes R, Kimpton C, Watson S, Oldroyd N, Clayton T, Barnett L, Arnold J, et al. (1996) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. *Mixtures, ageing, degradation and species studies.* *Int J Legal Med* 109 (4): 186-94.
- Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E (1997) An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J Forensic Sci.* Mar 42(2):320-2.
- Tocchetto D (2003) *Balística Forense: Aspectos Técnicos E Jurídicos.* Millennium. 3ª Edição
- User Guide: PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit. Disponível em
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_053966.pdf, acesso em julho de 2010.

User Manual: Quantifiler® Kits. Disponível em

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041395.pdf, acesso em julho de 2010.

Van Hoofstat DE, Deforce DL, Hubert De Pauw IP, Van den Eeckhout EG (1999) DNA typing of fingerprints using capillary electrophoresis: effect of dactyloscopic powders. *Electrophoresis*. 20:2870–2876.

Watson J, Berry A, (2005) DNA - O Segredo Da Vida. Companhia das Letras.

Weiselfs JJ (2003) Mortes matadas por armas de fogo no Brasil - 1979/2003. Organização das Nações Unidas para a Educação UNESCO.