

ESTUDO DE METODOLOGIA NÃO INVASIVA PARA IDENTIFICAÇÃO HUMANA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA EM PAPEL FTA® CLASSIC

Study of Non-Invasive Methodology for Human Identification from saliva samples storage on FTA® Classic paper

Ludmila Alem¹

Caleb Guedes Miranda dos Santos²

Marcos Dornelas Ribeiro³

Dayse Aparecida da Silva⁴

Tatiana Lucia Santos Nogueira⁵

¹ Biomédica - Habilitação em Biociência Legal (UFRJ); Mestranda em Ciências da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ)

² Capitão Farmacêutico; Adjunto à Subdivisão de Pesquisa e Biodefesa do Instituto de Biologia do Exército; Doutor em Ciências Biológicas - Biofísica (UFRJ)

³ Major Farmacêutico; Chefe da Subdivisão de Pesquisa e Biodefesa do Instituto de Biologia do Exército; Membro da Comissão de Biossegurança do Ministério da Defesa; Membro da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio; Doutor em Ciências Biológicas - Microbiologia (UFRJ)

⁴ Professora Adjunta da Universidade do Estado do Rio de Janeiro; Doutora em Biologia - Biociências Nucleares (UERJ)

⁵ Major Farmacêutica; Chefe da Seção de Genética do Instituto de Biologia do Exército; Mestre em Patologia - Análises Clínicas (UFF); Doutoranda em Biociências - Genética Molecular e Biotecnologia (UERJ)

Endereço para Correspondência: Ludmila Alem
Rua Francisco Manuel, 102 - Benfica - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20911-270
Instituto de Biologia do Exército, Seção de Genética.
Tel.: (21) 3890-2135 - Ramal 2133
E-mail: ludmila.alem@msn.com

RESUMO

Introdução: A análise do material genético desempenha papel essencial nas investigações forenses para a resolução de casos. O estudo da Genética Forense torna-se necessário para o aprimoramento das metodologias utilizadas e melhoria nos serviços prestados à sociedade. Para fins de identificação humana, o uso do DNA nuclear é extensivamente descrito na literatura, assim como os protocolos para sua análise. O DNA mitocondrial representa o genoma extra nuclear da célula de metazoários e

apresenta características que lhe conferem grande aplicabilidade na investigação forense nas situações onde a quantidade de DNA autossômico disponível é baixa e limitada. Outra questão de importância é o armazenamento das amostras biológicas a serem analisadas. Atualmente esse processo pode ser otimizado com a utilização de cartões FTA® Classic, que consistem no armazenamento de DNA em uma matriz sólida quimicamente tratada, assegurando a preservação prolongada do material genético. Além

de tal aplicabilidade, as amostras biológicas transferidas para os cartões FTA® Classic permitem a elaboração de bancos de dados para fins de comparação com amostras provenientes de cenas de crime.

Objetivo: Propor uma padronização de metodologia prática e econômica para amplificação direta de DNA mitocondrial proveniente de amostras biológicas de saliva armazenadas em cartão FTA® Classic.

ABSTRACT

Introduction: The analysis of genetic material has an important role in forensic investigations as a matter for solving cases. The study of Forensic Genetics becomes necessary for the enhancement of methodologies and to improve the services provided to the community. In order to human identification, the use of nuclear DNA is extensively described in the literature as the protocols for its analysis. Mitochondrial DNA represents the extra nuclear genome of metazoans and it has some features that grants it great applicability in Forensic investigations in situation in which the quantity of autosomal DNA is low or limited. Another important issue to the sample analysis is its storage. Nowadays this process may be optimized with FTA® Cards which consist of a solid matrix treated chemically, insuring prolonged preservation of the genetic material. In

Conclusão: Os resultados demonstram que há uma limitação técnica inerente aos cartões FTA® Classic no que se refere à recuperação do DNA armazenado. O armazenamento de saliva em cartões FTA® Classic para subseqüentes análises de mtDNA possivelmente não deve ser recomendado, dada a baixa quantidade de DNA amplificável recuperada de tal matriz.

Palavras-chave: FTA® Classic; PCR direta; saliva; mtDNA; Identificação Humana.

addition to such applicability, biological samples transferred to FTA® cards allow the development of databases that will be valuable for comparison with samples from crime scenes.

Objectives: To propose a practical and economical standardization of direct amplification method for mitochondrial DNA from saliva samples stored in FTA® cards.

Conclusion: Results demonstrated a technical limitation inherent to the FTA® cards regarding the recovery of DNA from the matrix. The storage of saliva in FTA® cards for subsequent mtDNA analysis should not be recommended since the low quantity of amplifiable DNA recovered.

Keywords: FTA®; Direct PCR; saliva; mtDNA; Human Identification.

1. INTRODUÇÃO

No contexto da identificação humana, amostras biológicas como sangue e saliva são fontes de DNA amplamente exploradas. De modo geral, estas podem ser utilizadas como amostras de referência para a comparação com vestígios encontrados em locais de acidentes, para gerar banco de dados e para a realização de exames de paternidade. A coleta e armazenamento de tais materiais biológicos apresenta-

ram-se como um desafio por muito tempo devido a condições estruturais que envolviam a estocagem do material biológico e a do DNA extraído e às possibilidades de contaminação e degradação do material genético visto que as condições ambientais podem variar muito dentro da faixa ótima de conservação do DNA. A necessidade do deslocamento das amostras do campo para os laboratórios também se apresentou como uma dificuldade na conservação de amostras



biológicas¹. Todavia, na década de 80, o desenvolvimento da tecnologia FTA[®] (*Flinders Technology Associates*), veio a modificar o panorama recorrente, introduzindo nova alternativa ao armazenamento de material biológico e sua conservação.

O conceito da tecnologia FTA[®] (cartão FTA[®] Classic) consiste na utilização de uma matriz sólida (celulose ou malha de plástico sintético) para o armazenamento do DNA, que é tratada com uma composição química capaz de proteger o material genético depositado contra a degradação por contaminações diversas como por exemplo fungos ou bactérias, ou ainda devido à desnaturação por variações de temperatura^{2,3} (Figura 1). Inicialmente desenvolvida para o armazenamento de amostras biológicas de sangue, atualmente a tecnologia suporta múltiplos tipos de amostras: bactérias, células bucais, cultura de células, plasmídeos, tecidos, substratos de plantas^{4,5,6,7,8}. Os cartões FTA[®] Classic foram aprimorados para fluídos claros como a saliva com indicador de cor, que delimita a área na qual a amostra foi aplicada⁴. Ainda, a partir da tecnologia original na qual o DNA fica incorporado na matriz, o cartão FTA[®] Elute foi desenvolvido com uma composição química protetiva diferenciada que possibilita a eluição do DNA em solução^{4,9} (Figura 2).

Figura 1: Eletromicrografia da matriz FTA[®]



Fonte: Sigma-Aldrich, 2016

Após transferidas para o papel FTA[®] Classic, as amostras podem ser armazenadas e/ou manipuladas de acordo com a necessidade do operador. Podem ser realizados exames para o diagnóstico de doenças genéticas, monitoramento de parasitoses, estudos

Figura 2: Diversidade de cartões FTA[®]



Fonte: Sigma-Aldrich, 2016

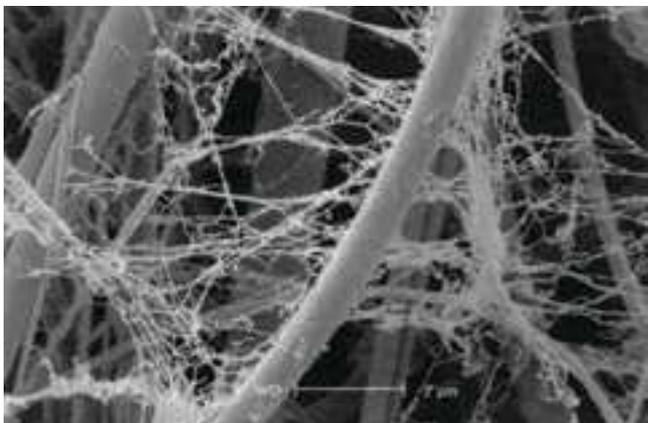
epidemiológicos e ainda, no âmbito das Ciências Forenses, ser utilizado para a identificação humana^{1,10}. De modo geral, dentro do contexto forense, os cartões quando armazenados podem constituir banco de dados, como por exemplo o Banco de Amostras e Repositório de DNA do Exército situado no Laboratório de Genética Forense do Instituto de Biologia do Exército, IBEx. O desenvolvimento deste banco de dados representa uma ferramenta essencial para investigações que tem como objetivo exclusivo a identificação de militares, que por ventura estejam envolvidos em acidentes durante missões. Ainda, existem bancos de dados com o propósito investigativo criminal, como o CODIS (*Combined DNA Index System*) que é um programa desenvolvido pelo FBI (*Federal Bureau of Investigation*), no qual ocorre a comparação de um perfil genético obtido a partir de vestígios provenientes de locais de crimes com perfis genéticos alocados no banco de dados.

Dada a circunstância da necessidade do exame de DNA ou a qualidade da amostra a ser analisada, é possível a realização de análise de DNA autossômico (nuclear) através da análise das sequências *Short Tandem Repeat* (STR) que se configuram como regiões altamente variáveis no genoma nuclear de cada indivíduo^{2,11}. Para amostras degradadas como ossadas antigas, dentes, materiais biológicos oriundos de desastres em massa que se encontram carbonizados, ou quaisquer situações onde a quantidade de DNA autossômico disponível é baixa e limitada, a análise do DNA mitocondrial (mtDNA) através do sequenciamento se torna a abordagem ideal^{1,12,13} devido ao alto número de cópias deste material genético em uma célula somática (2 a 10 cópias por mitocôndria), representando um quanti-

tativo abundante de ácido nucléico¹⁴. Além disso, o DNA mitocondrial não sofre recombinação e é uma herança matrilinear, o que permite que amostras biológicas questionadas de pessoas desaparecidas ou desastres em massa sejam relacionadas com parentes maternos pois estes, mesmo que distantes no segmento genealógico, compartilham da mesma sequência de mtDNA^{15,1}.

O processamento inicial das amostras armazenadas nos cartões FTA[®] Classic inclui as etapas de lavagem, extração, amplificação (PCR - Reação em Cadeia da Polimerase). Todavia, na rotina laboratorial de grande escala, estes processos se tornam laboriosos e economicamente desvantajosos. A padronização de uma amplificação direta para amostras de sangue em papel FTA[®] Classic com a eliminação das etapas de lavagem e extração foi realizada com sucesso anteriormente¹⁶ para DNA mitocondrial (Figura 3) e representou pertinente otimização neste processamento amostral.

Figura 3: Processamento amostral para PCR direta - mtDNA em cartões FTA[®] impregnados com sangue



Fonte: Adaptado de Nogueira *et al.*, 2015

Tradicionalmente amostras de sangue são as amostras biológicas padrão para exames de DNA. Entretanto, a coleta de sangue requer profissional qualificado, é um processo invasivo, possivelmente desconfortável, e de modo geral pode acarretar resistência dos voluntários em participar de tais estudos^{17,18}. Por outro lado, o uso de saliva como fonte de DNA para investigações forenses tornou-se

interessante dada a sua facilidade de coleta sendo um processo não invasivo^{19,8,10}. A coleta consiste da realização de raspagem com suabe diretamente do interior das bochechas do indivíduo favorecendo a coleta de células epiteliais, visto que a saliva pura apresenta baixas quantidades de DNA. Após a coleta, o material biológico pode ser transferido para o papel FTA[®] Classic¹ e após secagem, ser armazenado ou processado de modo semelhante ao aplicado para amostras de sangue.

Assim como as hemácias são uma parte do sangue que podem inibir a PCR, a saliva também apresenta componentes como a amilase, mucinas, proteínas (estaterinas, cistatinas, histatinas e proteínas ricas em prolina PRPs), íons cálcio e fosfato, amônia, compostos nitrogenados, enzimas e imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM)^{14,18} que podem vir a exercer efeito negativo sob a amplificação do DNA. A composição salivar e seu pH variam ao longo do dia e entre os indivíduos, em função de fatores como a dieta, hábitos de higiene bucal, fluxo salivar e ingestão de fármacos. O sucesso na recuperação de DNA a partir de saliva pode ser influenciado por estas características.

O presente trabalho propõe a padronização de metodologia de amplificação econômica e prática (PCR direta) de DNA mitocondrial proveniente de amostras de saliva armazenada em cartão FTA[®] Classic e a investigação de questões inerentes ao processamento deste tipo de espécime.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1

Teste inicial conduzido para verificar o comportamento da amostra biológica escolhida - saliva - no cartão FTA[®] Classic tendo como alvo a região controle do mtDNA e a viabilidade do estudo. Dado o caráter tentativo da abordagem apresentada, optou-se por um espaço amostral reduzido. Amostras de saliva de cinco voluntários foram coletadas com suabe estéril (Absorve[®]) e transferidas para cartões FTA[®] Classic. Pela ausência de coloração da

amostra, convencionou-se iniciar a transferência a partir da região central dos cartões, realizando marcação em lápis ao redor da área coletada. O tempo de secagem dos cartões foi de duas horas à temperatura ambiente⁴. Após a secagem completa dos cartões, três discos de 1,2 mm foram picotados utilizando-se um picotador (*Harris Micro Punch*TM 1,2 mm), e transferidos para tubo cônico 0,2 ml contendo a mistura de reagentes para a realização de PCR direta segundo o protocolo: 5 µl de tampão *GoTaq[®] Flexi Buffer* (5x), 3 µl de $MgCl_2$ a 25 mM, 0,5 µl de mistura de dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados) a 10 mM, 0,125 µl de enzima para PCR *GoTaq[®] Hot Start* (5U/µl), 12,375 µl de H_2O , 2 µl de oligonucleotídeo senso L15879, 2 µl de oligonucleotídeo antisenso H727, com volume final de 25 µl. A combinação de oligonucleotídeos utilizada é correspondente a região controle completa do mtDNA, incluindo as regiões hipervariáveis HVI, HVII e HVIII, e gerando um produto amplificado de 1.417 pares de bases. A reação foi processada no termociclador *VeritiTM Thermal Cycler* (*Applied BiosystemsTM*, Foster City, CA). Foi utilizado para controle positivo células padrão 9947A de perfil genético conhecido e de quantidade determinada previamente. Também foi utilizado controle negativo para monitorar possíveis contaminações.

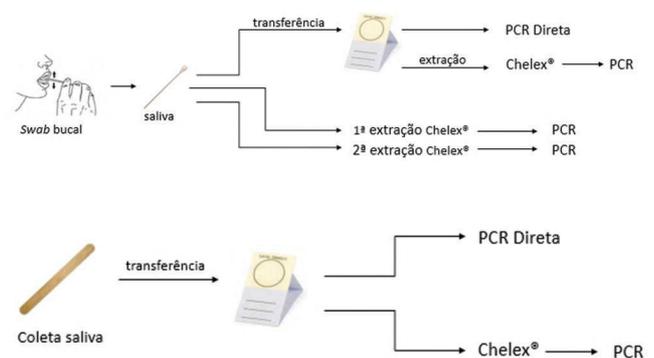
EXPERIMENTO 2

Neste experimento, amostras de saliva coletadas com suabe bucal e amostra de saliva coletada com espátula de madeira¹⁷ foram transferidas para cartões FTA[®] Classic (Figura 4). Após completa secagem, três discos de 3,0 mm foram selecionados dos respectivos cartões e submetidos a PCR direta segundo o protocolo: 10 µl de tampão *GoTaq[®] Flexi Buffer* 5x, 6 µl de $MgCl_2$ a 25 mM, 1 µl de mistura de dNTP a 10 mM, 0,25 µl de enzima para PCR *GoTaq[®] Hot Start* (5U/µl), 24,75 µl de H_2O , 4 µl do oligonucleotídeo senso L15879, 4 µl do oligonucleotídeo antisenso H727. A partir dos mesmos cartões, três outros discos de 3,0 mm foram selecionados e submetidos à extração de DNA realizada pela resina *Chelex[®]* (*Chelex[®] 100 Resin*, *BIO-RAD Laboratories*).

Vinte microlitros do produto extraído foram adicionados a proporcional quantidade de mistura de reagentes (da reação direta) para a PCR. O mesmo suabe utilizado para a transferência inicial de saliva para o cartão FTA[®] Classic, foi submetido a duas extrações de DNA individuais e consecutivas pela resina *Chelex[®]* e posterior reação de PCR nas mesmas condições. Esta abordagem foi realizada a fim de verificar a permanência de DNA no suabe. A amplificação em todas as abordagens foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 6).

EXPERIMENTO 3

Figura 4: Esquema de coleta para o experimento 2



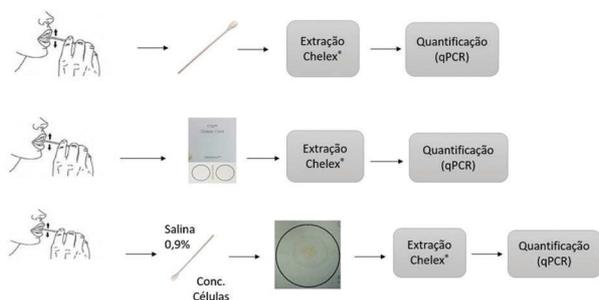
Fonte: Próprio autor

Neste experimento, três amostras de saliva foram coletadas de acordo com o esquema representado na figura 5. O DNA extraído foi analisado quantitativamente através do conjunto de reagentes *Quantifiler[®] Duo*, da *Applied BiosystemsTM*. A primeira amostra coletada¹ através de suabe bucal foi submetida a extração de DNA com o uso da resina *Chelex[®]*, representando o protocolo de processamento tradicional. A segunda amostra coletada² através de suabe bucal foi transferida para cartão FTA[®] e após secagem, foi submetida à extração pela resina *Chelex[®]*. Esta amostra foi desenvolvida objetivando mimetizar as condições da amostra biológica (saliva) em teste neste trabalho e compreender o perfil quantitativo desta. A terceira amostra coletada³ através de suabe

bucal foi eluída em 1 ml de solução salina 0,9% e submetida a centrifugação por 3 minutos, 14.500 RPM em Centrífuga Excelsa® Flex 3400 - Fanem. O sobrenadante foi descartado e o precipitado gerado foi transferido para o mesmo cartão FTA® Classic, representando a deposição de um concentrado de células na matriz FTA®.

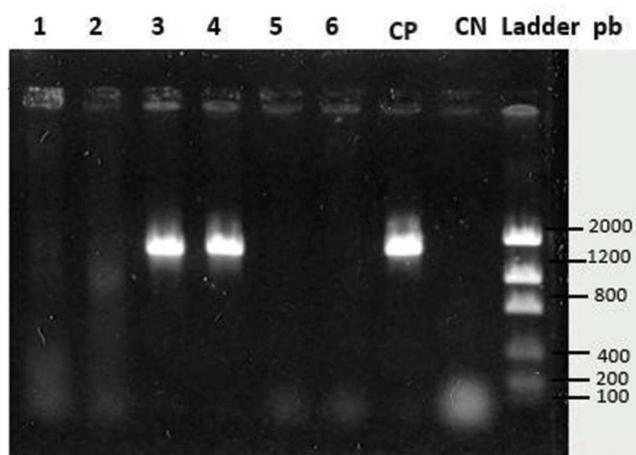
3. RESULTADOS

Figura 5: Esquema de coleta para o experimento 3



Fonte: Próprio autor

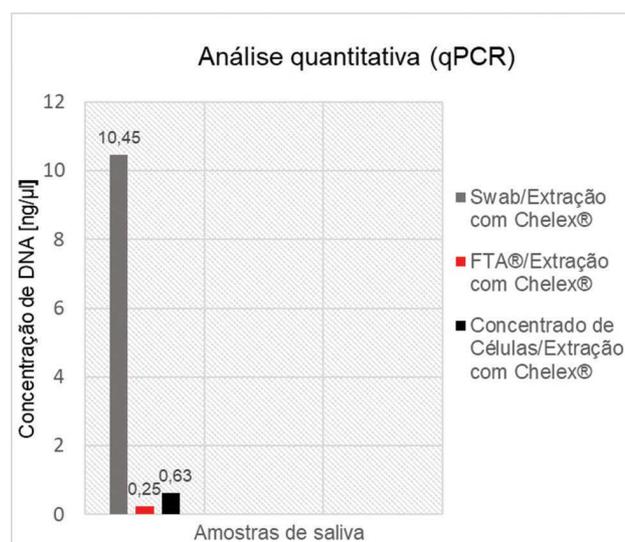
Figura 6: Gel de agarose 1,0% exibindo amplificação de DNA do experimento 2. Amostras 1,2: saliva transferida para FTA® e submetida a PCR direta; 3,4: extrações consecutivas de saliva em swab e submetida a PCR tradicional; 5,6: extração pelo método Chelex® de saliva em FTA® submetida a PCR direta e extração pelo método Chelex® de saliva em FTA submetida a PCR tradicional; CP: controle positivo 9947A; CN: controle negativo; Ladder: padrão de peso molecular



Fonte: Próprio autor

De modo geral, em todos os experimentos conduzidos, foi verificada a ausência de amplificação satisfatória a partir da técnica pretendida (PCR direta) para mtDNA com papel FTA® Classic impregnado com saliva. No experimento 1, verificou-se através de eletroforese em gel de agarose a ausência de amplificação para todas as amostras, exceto para o controle positivo e o padrão de peso molecular, indicando que a reação não apresentava problemas de execução (dados não mostrados). No experimento 2 apenas duas amostras foram amplificadas com sucesso, sendo estas as amostras extraídas diretamente do suabe. As amostras processadas de acordo com a técnica proposta neste estudo apresentaram ausência de amplificação e ainda, apesar das propriedades conservativas e protetoras oferecidas pelos cartões FTA® Classic, um perfil característico de degradação de amostra é observado neste caso em particular (Figura 6). Os resultados da análise quantitativa (experimento 3) são esboçados na figura 7. Foi observado alto rendimento (10 ng/μL de DNA) a partir da extração de DNA do suabe bucal, compatível com a amplificação observada através da eletro-

Figura 7: Quantificação de DNA das amostras do experimento 3 por qPCR. Kit Quantifiler® Duo DNA Quantification, da Applied Biosystems™



Fonte: Próprio autor

forese em gel no experimento 2. O rendimento para as extrações de DNA realizadas a partir dos cartões FTA[®] foi significativamente menos eficiente: para a extração de DNA a partir da região do cartão contendo o precipitado obteve-se 0,63 ng/ μ L de DNA e para a extração de DNA transferido do suabe para o cartão FTA[®] obteve-se 0,25 ng/ μ L de DNA.

4. DISCUSSÃO

A composição química e quantidade de DNA salivar não é homogênea²⁰, assim como a distribuição de DNA pela matriz do papel não é uniforme como demonstrado por Milne e colaboradores (2006)³ ao realizar múltiplas reações de amplificação a partir de uma grande área de papel FTA[®] Indicating, resultando em quantidades diferentes de DNA extraído, bem como por Hall e Roy (2004)²¹, em trabalho similar. Ainda, a permanência de quantidade significativa de material genético em suabes após a primeira extração é descrita na literatura (Adamowicz *et al.*, 2014). No experimento 1, o suabe utilizado inicialmente para transferir as células bucais foi submetido a duas extrações consecutivas pelo método Chelex[®]. Em ambas, amplificação satisfatória é observada (Figura 6). Estas observações poderiam explicar as falhas observadas nas demais reações de amplificação testadas como sendo o resultado de uma transferência insuficiente de material genético entre os suportes utilizados. Tal assertiva é corroborada pelo estudo de Wolfgramm *et al.* (2009)¹⁷, o qual obteve resultados semelhantes.

A diminuição significativa na eficiência da recuperação de DNA da matriz FTA[®] evidenciada pela análise quantitativa (experimento 2) introduz outra perspectiva acerca do insucesso da técnica pretendida. Somada à transferência insuficiente de DNA, sugere-se que o ácido nucléico esteja indisponível para a PCR direta por estar fortemente aderido à matriz. Mediante à deposição de um concentrado de células (precipitado) e processamento específico de tal área (experimento 2), é esperada quantidade de DNA superior à recuperada na quantificação. Entretanto, a diferença nos rendimentos sugere que a

aplicação de um concentrado de células poderia promover efetivamente a transferência de mais células epiteliais para o papel FTA[®].

Stangegaard *et al.* (2013)² atribuem a falha na obtenção de perfil genético completo nas análises de STR a não liberação da quantidade total de DNA dos cartões. O grupo repetiu o protocolo de extração (também pelo método Chelex[®]) até seis vezes para cada amostra e os resultados indicaram que a quantidade total de DNA não é obtida na primeira extração demonstrando que pode ocorrer falha na transferência de DNA. Essas informações podem ser importantes no processamento de amostras únicas que não poderiam ser obtidas novamente, de modo que o armazenamento em FTA[®] pode garantir oportunidade de reprocessamento.

Ademais, segundo os depositantes da patente (US 6746841 B1, ano 2004)¹ da tecnologia FTA[®], após a transferência dos ácidos nucléicos para os filtros FTA[®] e sua imobilização na matriz, estes não podem ser facilmente removidos ou eluídos, o que se revela uma grande desvantagem dada a necessidade de acesso a este material para análises subsequentes como gerar perfil STR ou genotipagem. Além disso, adaptações à tecnologia são sugeridas pelo fabricante para melhor aproveitamento da mesma na área Forense.

Os resultados observados neste trabalho introduzem uma problemática que deve ser analisada com cautela visto que o insucesso no processamento do DNA armazenado em cartões FTA[®] também foi observado para amostras biológicas de sangue antigas^{2, 22, 23, 24} e considerando a empregabilidade da tecnologia para a construção de bancos de dados, as falhas no processamento destas amostras torna-se preocupante.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que existe uma dificuldade na transferência de amostras entre o suabe e o FTA[®], o que implica na permanência de DNA nos suabes e quantidade insuficiente de DNA impregnada nos cartões. Ainda,

há uma limitação técnica inerente à tecnologia no que se refere à recuperação do DNA depositado na matriz, sugerindo-se que este permaneça fortemente aderido.

O armazenamento de saliva em cartões FTA® Classic para subseqüentes análises de mtDNA não

deve ser recomendado, dada a baixa quantidade de DNA amplificável recuperada de tal matriz. Ademais, investigações futuras são recomendadas, no sentido de ampliar o número amostral, a fim de confirmar as observações pontuadas.

REFERÊNCIAS

1. Burgoyne LA. Flinders Technologies Pty Ltd. Solid Medium and Method for DNA Storage. United States Patent US5496562. 5 de março de 1996.
2. Stangegaard M, Børsting C, Ferrero-Miliani L, Frank-Hansen R, Poulsen L, Hansen AJ, Morling N. Evaluation of Four Automated Protocols for Extraction of DNA from FTA Cards. *Journal of Laboratory Automation*. v. 18, n. 5, p. 404-410. 2013.
3. Milne E, Van Bockxmeer FM, Robertson L, Brisbane JM, Ashton LJ, Scott RJ, Armstrong BK. Buccal DNA Collection: Comparison of Buccal Swabs with FTA Cards. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v. 15, n. 4., p. 816-819 2006.
4. GE Healthcare Bio-Sciences ab. FTA™ Forensic References Guide. Buckinghamshire, UK. 2010.
5. Ndunguru J, Taylor NJ, Yadav J, Aly H, Legg JP, Aveling T, Thompson G, Fauquet CM. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *Virology Journal*. v. 2., p. 1-12. 2005.
6. Ahmed HA, Macleod ET, Hide G, Welburn SC, Picozzi K. The Best Practice for Preparation of Samples from FTA® Cards for Diagnosis of Blood Borne Infections Using African Trypanosomes as a Model System. *Parasites & Vectors*. v. 4., p. 1-7. 2011.
7. Izadi S, Mirhendi H, Jalalizand N, Khodadadi H, Mohebbali M, Nekoeian S, Jamshidi A, Ghatee MA. Molecular Epidemiological Survey of Cutaneous Leishmaniasis in Two Highly Endemic Metropolises of Iran, Application of FTA Cards for DNA Extraction from Giemsa-Stained Slides. *J Microbiol*. v.9. 2016.
8. Beckett SM, Laughton SJ, Pozza LD, McCowage GB, Marshall G, Coh RJ, Milne E, Ashton LJ. Buccal Swabs and Treated Cards: Methodological Considerations for Molecular Epidemiologic Studies Examining Pediatric Populations. *American Journal of Epidemiology*. v. 167., p. 1260-1267. 2008.
9. Jignal P, Shaikh MG, Darshan M. Forensic Conception: DNA Typing of FTA Spotted Samples. *J App Biol Biotech*. v. 2, n. 4, p. 21-29. 2014.
10. Tredoux S, Mfoloji S, Shires K. Efficiency of Buccal DNA Sampling Device in the Mortuary. *J Forensic Investigation*. vol. 3. Agosto, 2015.
11. Carey L, Mitnik L. Trends in DNA Forensic Analysis. *Electrophoresis*. v.23, p. 1386-1397. 2002.
12. Fernández C. Microchip Capillary Electrophoresis Protocol to Evaluate Quality and Quantity of mtDNA Amplified Fragments for DNA Sequencing in Forensic Genetics. In: Antonio Alonso (ed.), *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics, Methods in Molecular Biology*. © Springer Science Business Media, vol. 830, p. 367-379. LLC 2012.
13. Melton T, Holland C, Holland M. Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current practice and future potential. *Forensic Sci Rev*. v.24, p. 102-122. 2012.

14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4ª edição. Nova Iorque: Garland Science; 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>
15. Ginther C, Issel-Tarver L, King MC. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. Nat. Genet. V.2, P.135-38. 1992.
16. Nogueira TLS, Oliveira TP, Braz EBV, Santos OCL, Silva DA, Amaral CRL, Carvalho EF. Mitochondrial DNA Direct PCR Sequencing of Blood FTA Paper. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. v.5, p. 611-613. 2015.
17. Wolgramm EV, Carvalho FM, Aguiar VRC, Sartori MPN, Hirschfeld-Campolongo, GCR, Tsutsumida, WM, Louro, ID. Simplified Buccal DNA Extraction with FTA Elute Cards. Forensic Science International: Genetics. Brasil. v.3, p. 125-127. 2008.
18. Quinque D, Kittler R, Kayser M, Stoneking M, Nasidze I. Evaluation of Saliva as a Source of Human DNA for Population and Association Studies. Anal. Biochem. v. 353, p. 272-277. 2006.
19. Mulot C, Stücker I, Clavel J, Beaune P, Lorient MA. Collection of Human Genomic DNA from Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. J Biomed Biotechnology. v.3, p. 291-296. 2005.
20. Park SJ, Kim JY, Yang YG, Lee SH. Direct STR Amplification from Whole Blood and Blood- Or Saliva-Spotted FTA® Without DNA Purification. J Forensic Sci. v. 53, n.2, p. 335-341. 2008.
21. Hall DE and Roy R. An Evaluation of Direct PCR Amplification. Croat Med J. EUA. v. 55, p. 655-661. 2014.
22. Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Linacre A, Lapwong Y, Chotigeat W. Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample analysis. Forensic Sci. Int. Genetics: Supplement Series 4 (2013) e71-e72.
23. Rahikainen, A-L., *et al.*, DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. Forensic Science International 261 (2016) 148-153.