



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Márcia Isabel Máximo Madureira

**DNA: TRANSFERÊNCIA E/OU
PERSISTÊNCIA**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pela Mestre Ana Margarida Ventura Teixeira Bento e pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Márcia Isabel Máximo Madureira

**DNA: TRANSFERÊNCIA E/OU
PERSISTÊNCIA**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pela Mestre Ana Margarida Ventura Teixeira Bento e pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

DNA: transferência e/ou persistência

*"A dream does not become reality through magic; it takes sweat,
determination, and hard work."*

- Colin Powell

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras suficientes para agradecer a todas as pessoas que fizeram parte de mais uma fase do meu percurso académico.

Um agradecimento especial à Dr.^a Ana Margarida Bento, pela orientação, apoio incansável, confiança, paciência, por todo o conhecimento que me transmitiu, tanto teórico como prático, e pela disponibilidade demonstrada.

À Dr.^a Lisa Sampaio por me ter permitido realizar este projeto no SGBF-C, concretizando um grande sonho.

Aos Drs. Armando Serra, Maria João Porto, Marta São-Bento, Nair Gouveia, Patrícia Cunha, Pedro Brito, Vanessa Bogas, Virgínia Lopes e Alena Shastakova pela forma como me receberam e integraram, pelo apoio científico, pela disponibilidade para responder a qualquer dúvida existente e por participarem no trabalho como voluntários.

Ao Professor Doutor Francisco Corte Real pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo destes dois anos de Mestrado.

Às amigas do Mestrado por estarem ao meu lado, ajudando em tudo o que precisasse; em especial à Joana Ferreira por ser a minha companheira nos bons e maus momentos desde o primeiro ano de faculdade.

À minha amiga de infância Andreia Coutinho, por estar ao meu lado desde que me lembro, sempre pronta a dar uma palavra de conforto, e por ser capaz de me fazer soltar uma boa gargalhada.

À minha mãe, por me dar sempre o seu apoio incondicional para seguir os meus sonhos e por ser o meu pilar ao longo deste caminho, sofrendo comigo e celebrando as minhas conquistas.

À minha irmã e afilhada, por me incentivarem a dar sempre o melhor de mim e por me darem força nos momentos mais difíceis.

Por fim, quero dedicar este projeto ao meu pai. Não teria chegado até aqui sem o teu sacrifício e, mais importante de tudo, sem o teu colinho. Espero que, onde quer que estejas, te sintas orgulhoso do que alcançamos.

RESUMO

A Genética Forense tem vindo a vivenciar um período de grande desenvolvimento técnico-científico, traduzindo-se na possibilidade de analisar quantidades exíguas de DNA e, conseqüentemente, expandir o número de itens de onde é possível obter perfis genéticos. Recentemente acrescentou-se a este grupo, itens tocados pelos indivíduos, sendo possível recuperar o seu material genético, denominado por *touch DNA*. Devido ao seu potencial na investigação criminal, este tipo de amostras tornou-se o foco de vários estudos.

Numa sociedade que está a experienciar uma pandemia, a higienização das mãos é altamente aconselhada. Como as amostras *touch* são caracterizadas pela recuperação de baixos níveis de DNA, adicionando a utilização de soluções alcoólicas como forma de diminuir a quantidade de DNA transferida, a probabilidade de conseguir recolher amostra suficiente para amplificar e gerar perfis de boa qualidade é reduzida. Assim, é importante perceber se a aplicação de soluções alcoólicas nas mãos poderá influenciar a transferência de DNA e, conseqüentemente, ter um grande impacto na investigação criminal.

Devido aos baixos níveis de *touch DNA* normalmente recuperados, previamente ao início do estudo sobre o efeito da higienização das mãos, realizou-se um ensaio para perceber qual a melhor superfície para depositar DNA, e outro para concluir qual o melhor método de recolha de amostras deste tipo. De seguida, prosseguiu-se com o objetivo do trabalho, através da reprodução de cenários de transferência antes, 0, 15 e 60 minutos após higienização das mãos.

Confrontando os níveis de DNA detetados entre dois substratos diferentes e, numa segunda experiência, entre dois métodos de recuperação distintos, não se observaram diferenças que permitissem escolher o design experimental mais eficaz.

Relativamente ao ensaio principal, a diminuição de DNA detetada na maioria das amostras, imediatamente após higienização das mãos, demonstrou não ser significativa, tal como ocorreu nos restantes momentos de transferência, permitindo concluir que a atual popularidade das soluções alcoólicas não afeta a deposição de DNA num contexto forense.

Adicionalmente, verificaram-se certas características do *touch DNA*, como a recuperação de níveis insuficientes de DNA para obter perfis genéticos, a sua degradação e a facilidade de detetar outras origens de DNA não relacionadas com o indivíduo responsável pela transferência, que poderão dificultar a análise deste tipo de amostras.

Palavras-chave: *touch DNA*, transferência, soluções alcoólicas, persistência

ABSTRACT

Forensic Genetics has been experiencing a period of great technical-scientific development, resulting in the possibility of analyzing small amounts of DNA and, consequently, expanding the number of items from which it is possible to obtain genetic profiles. Recently, items touched by individuals were added to this group, making it possible to recover their genetic material, called *touch DNA*. Due to its potential in criminal investigation, this type of samples has become the focus of several studies.

In a society that is going through a pandemic, hand hygiene is highly recommended. As touch samples are characterized by the recovery of low levels of DNA, adding the possibility of using alcoholic solutions as a way to reduce the amount of transferred DNA, the probability of collecting enough sample to amplify and generate good quality profiles is reduced. Thus, it is important to understand whether the application of alcoholic solutions on the hands can influence DNA transfer and, consequently, have a big impact on criminal investigation.

As a result of the low levels of *touch DNA* usually recovered, prior to the beginning of the study on the effect of hand hygiene, an assay was carried out to understand the best surface to deposit DNA, and another to conclude the best method of collecting DNA samples of this type. Then, we proceeded with the project's purpose, reproducing transfer scenarios before, 0, 15 and 60 minutes after hand hygiene.

Comparing the DNA levels detected between two different substrates and, in a second experiment, between two different recovery methods, no differences that would allow choosing the most efficient experimental design were observed.

Regarding the main assay, the decrease in DNA detected in most samples, immediately after hand hygiene, proved to not be significant, as occurred in the remaining time points, leading to the conclusion that the current popularity of alcoholic solutions does not affect DNA deposition.

Additionally, certain characteristics of *touch DNA* were verified, such as the recovery of insufficient levels of DNA to obtain genetic profiles, its degradation and the ease of detecting other DNA origins unrelated to the individual responsible for the transfer, which may make analysis of this type of samples difficult.

Keywords: *touch DNA*, transfer, alcoholic solutions, persistence

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XI
INTRODUÇÃO	1
1. TOUCH DNA	2
1.1. Terminologia	3
1.2. Origem	4
1.2.1. Células com origem endógena às mãos	5
1.2.2. Células com origem exógena às mãos	6
1.2.3. Cell-free DNA	7
2. TRANSFERÊNCIA DE TOUCH DNA	8
2.1. Mecanismos de transferência	8
2.2. Fatores que influenciam a transferência	10
2.2.1. Fatores dependentes do indivíduo	11
2.2.2. Fatores dependentes da superfície/objeto	13
2.2.3. Fatores dependentes do contacto	14
2.3. Relevância da transferência indireta na investigação criminal	16
2.4. O papel do perito na determinação do mecanismo de transferência	17
3. SHEDDER STATUS	18
3.1. Fatores que influenciam o shedder status	20
4. BACKGROUND DNA	21
5. PERSISTÊNCIA DE TOUCH DNA	23
5.1. Objetos não pessoais versus pessoais	23
5.2. Fatores que influenciam a persistência	23
6. CONTAMINAÇÃO	25
JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJETIVOS	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
1. AMOSTRAGEM	29
2. DESIGN EXPERIMENTAL	29
2.1. Escolha do substrato e método de recuperação	29

2.1.1. Substrato	29
2.1.2. Método de recuperação.....	30
2.2. <i>Recolha de amostra</i>	31
3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	32
3.1. <i>Extração de DNA</i>	32
3.2. <i>Quantificação de DNA</i>	34
3.3. <i>Amplificação de DNA</i>	37
3.4. <i>Separação eletroforética e detecção dos fragmentos de DNA</i>	39
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
1. ESCOLHA DO SUBSTRATO SECUNDÁRIO E DO MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DE DNA.....	44
1.1. <i>Substrato</i>	44
1.2. <i>Método de recuperação</i>	45
2. HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS	46
2.1 <i>Efeito imediato da higienização das mãos na libertação de touch DNA</i>	46
2.2 <i>Influência do tempo entre higienização das mãos e evento de transferência de touch DNA</i>	50
2.3 <i>Relevância dos resultados</i>	53
3. NÍVEIS DE DNA	53
4. NÍVEIS DE DEGRADAÇÃO E IPC	55
5. AMOSTRAS AMPLIFICADAS	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
1. CONCLUSÕES.....	63
2. PERSPETIVAS FUTURAS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	75
ANEXO I	75
ANEXO II	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Fatores que afetam a transferência de touch DNA</i>	11
Tabela 2. <i>Composição química da solução alcoólica utilizada para desinfetar as mãos</i>	30
Tabela 3. <i>Preparação da solução de lise para extração do DNA com o kit PrepFiler Express BTA™</i>	34
Tabela 4. <i>Preparação das amostras para quantificação, conforme o protocolo</i> . 36	
Tabela 5. <i>Preparação das amostras para amplificação com o kit GlobalFiler (AB), conforme o protocolo</i>	39
Tabela 6. <i>Programa de ciclos térmicos para o GlobalFiler™ PCR Amplification Kit</i>	39
Tabela 7. <i>Níveis de touch DNA (ng/μL) detetados nas amostras depositadas pelos voluntários A e G em dois substratos secundários distintos</i>	44
Tabela 8. <i>Níveis de touch DNA (ng/μL) detetados nas amostras depositadas em lâminas de vidro pelos voluntários A e B</i>	45
Tabela 9. <i>Níveis de touch DNA (ng/μL) detetados nas amostras depositadas em lâminas de vidro pelos voluntários A-F</i>	48
Tabela 10. <i>Índices de degradação obtidos durante o processo de quantificação do DNA</i>	56
Tabela 11. <i>Comparação dos alelos detetados na amostra A#3 (AT) com o perfil genético de referência do indivíduo que participou no estudo – voluntário A</i>	59
Tabela 12. <i>Comparação dos alelos detetados na amostra F#3 (0 minutos) com o perfil genético de referência do indivíduo que participou no estudo – voluntário F</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos polimorfismos utilizados em Genética Forense: minissatélites (VNTRs) e microssatélites (STRs)	2
Figura 2. Representação da composição dos depósitos de touch DNA sugerida atualmente.....	5
Figura 3. Esquema representativo dos mecanismos de transferência de touch DNA.....	9
Figura 4. Método de transferência de touch DNA.....	31
Figura 5. Ligação de DNA a partículas magnéticas.....	33
Figura 6. Esquema representativo da técnica de RT-PCR.....	35
Figura 7. Fases dos ciclos térmicos da PCR.....	38
Figura 8. Esquema representativo da separação eletroforética e subsequente detecção dos fragmentos.	41
Figura 9. Representação ilustrativa da genotipagem	41
Figura 10. Concentração de touch DNA (ng/μL) calculada através da média dos resultados da quantificação dos 3 dias, juntamente com o desvio padrão.	49
Figura 11. Concentração de DNA (ng/μL) calculada através da média dos resultados da quantificação dos 3 dias, depositada por cada voluntário nos time points AT, 0, 15 e 60 minutos.....	51

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

± - mais ou menos

% - percentagem

°C - grau Celsius

µL- microlitro

AB - *Applied Biosystems*

cfDNA – *cell-free DNA*

CT - *Cycle Threshold*

DI - índice de degradação

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxinucleótidos trifosfatados

DTT - ditioneitol

et al. - e outros (do latim *et alia*)

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

INMLCF - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

IPC - controlo interno de PCR

LA – *Large Autosomal Target*

LR – *likelihood ratio*

M - molar

min – minuto

mg - miligrama

mL - mililitro

ng – nanograma

pb – pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RFU - unidades de fluorescência relativa

rpm - rotações por minuto

RT-PCR – *real-time PCR*

s - segundo

SGBF-C – Serviço de Genética e Biologia Forenses – Delegação do Centro

SA - *Small Autosomal Target*

STR - *Short Tandem Repeat*

UV - ultravioleta

VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats*

INTRODUÇÃO

A área das Ciências Forenses, mais especificamente a Genética Forense, tem evoluído drasticamente ao longo dos últimos anos. Inicialmente, os cientistas forenses utilizavam técnicas que incidiam em marcadores moleculares proteicos (serologia), que originavam resultados muitas vezes limitados, ou mesmo inconclusivos. Como o DNA (ácido desoxirribonucleico) é uma molécula mais informativa que as proteínas, sendo necessária uma menor quantidade de material biológico e sendo possível obter resultados mesmo tendo material biológico degradado, a introdução de marcadores moleculares genéticos rapidamente ganhou popularidade, tendo atualmente um papel cada vez mais relevante no que toca à identificação de criminosos e exoneração de inocentes (Lagoa *et al.*, 2008; van Oorschot *et al.*, 2019; Wickenheiser *et al.*, 2002).

Em 1985, Alec Jeffreys e colegas observaram a presença de certas regiões do nosso código genético que possuem várias repetições contíguas de sequências de DNA. O número de repetições destas sequências, num determinado *locus*, é variável de indivíduo para indivíduo, sendo possível gerar perfis genéticos únicos - *DNA fingerprinting* (Jeffreys *et al.*, 1985). A descoberta destas regiões de repetições, denominadas por minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) – figura 1A - estabeleceu a individualidade genética, revolucionando, assim, a maneira como se efetua a identificação com o objetivo de auxiliar a investigação criminal. Todavia, a análise destes minissatélites não está isenta de problemas. Para além da interpretação dos perfis ser complicada, os VNTRs possuem um leque limitado de amostras possíveis de analisar, uma vez que o DNA precisa de ter um peso molecular elevado, ou seja, DNA não degradado. Adicionalmente, é necessário que esteja presente em elevadas quantidades (Butler, 2010; Goodwin *et al.*, 2011).

Em 1993, Kary Mullis ganhou o Prémio Nobel da Química pelo desenvolvimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), processo responsável por amplificar regiões específicas do DNA, sendo possível produzir várias cópias do DNA de interesse. Esta técnica aumentou a sensibilidade da análise do DNA, resolvendo os problemas anteriormente descritos. Rapidamente, começou-se a aplicar PCR à análise de STRs (*Short Tandem Repeats*) (Goodwin *et al.*, 2011; Pinheiro, 2010).

Atualmente, STRs, também denominados por microssatélites (figura 1B), são os polimorfismos mais comumente analisados em Genética Forense, uma vez que possuem menor tamanho, comparado com VNTRs, o que permite uma análise mais eficiente de amostras degradadas, por serem facilmente amplificadas por PCR. Para além disso, o número de repetições deste tipo de marcadores é altamente variável de

indivíduo para indivíduo, oferecendo um maior poder de discriminação (Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011).

Estes avanços científicos permitiram gerar perfis a partir de quantidades exíguas de DNA, sendo possível recuperar DNA de determinados itens que não era possível anteriormente, incluindo DNA depositado em objetos manuseados (*touch DNA*) (van Oorschot *et al.*, 2010).

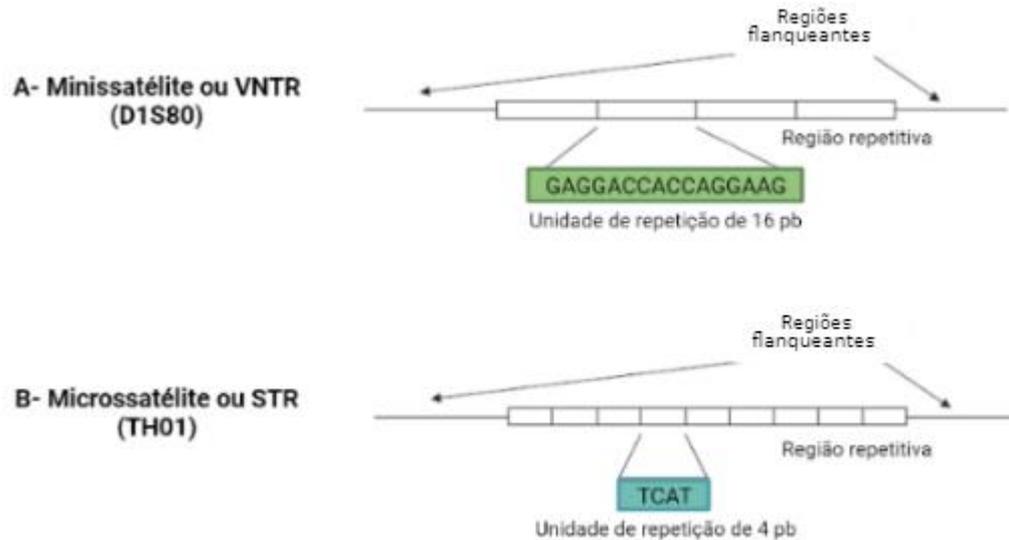


Figura 1. Esquema representativo dos polimorfismos utilizados em Genética Forense: minissatélites (VNTRs) e microssatélites (STRs). O número de repetições destas sequências de DNA variam de indivíduo para indivíduo, sendo essa a razão pela qual são usadas como marcadores de identificação. Baseado em (Butler, 2010). Created with BioRender.com

1. Touch DNA

A análise de manchas de sangue, fios de cabelo, ossos, urina, zaragatoas vaginais, é uma prática comum em Genética Forense. Em 1997, van Oorschot e Jones demonstraram, pela primeira vez, que também seria possível obter um perfil genético a partir de DNA depositado em objetos, superfícies ou indivíduos, através do toque, mais comumente denominado por *touch DNA* (van Oorschot *et al.*, 1997), embora inicialmente muitos céticos pertencentes à comunidade científica duvidassem desta possibilidade e da sua utilidade (van Oorschot *et al.*, 2010).

A descoberta do *touch DNA*, assim como a extrapolação desta observação para o contacto com a pele em geral, aumentaram drasticamente o tipo de itens de onde se pode detetar DNA, ganhando assim a atenção dos cientistas forenses (van Oorschot *et al.*, 2019).

A procura deste tipo de vestígios pode ser essencial para a investigação criminal, sendo particularmente importante na ausência de fluidos corporais, tornando-se a única fonte de informação no domínio da Criminalística Biológica (Ostojic *et al.*, 2017; Sessa *et al.*, 2019). Por este motivo, a recolha de amostras de áreas que os investigadores suspeitam que tenham sido contactadas pelo criminoso constitui, atualmente, uma prática comum do processamento do local do crime, mesmo não havendo qualquer vestígio visível (EUROFORGEN, 2017; Gosch *et al.*, 2019; Hartless *et al.*, 2019).

Geralmente, a tipagem de DNA a partir de amostras de sangue, saliva e sémen é uma tarefa simples, contrariamente às amostras de *touch DNA*. Estas últimas poderão apresentar um maior desafio para os peritos devido às baixas quantidades de DNA que normalmente possuem, à sua degradação, assim como à contribuição de vários indivíduos para a mesma amostra (Ostojic *et al.*, 2017).

O estudo do *touch DNA*, incluindo os desafios que este tipo de amostra apresenta, bem como a delineação de um fluxo de trabalho que os aborde e a eventual aplicação destes conhecimentos adquiridos na própria investigação criminal, poderão contribuir para a melhoria da qualidade dos perfis genéticos obtidos e, conseqüentemente, facilitar a identificação de determinado indivíduo.

1.1. Terminologia

Para compreender melhor este tema complexo é necessário esclarecer alguns conceitos relacionados com o *touch DNA*.

Como foi dito anteriormente, o termo “*touch DNA*” é utilizado, geralmente, para descrever o DNA depositado através das mãos em objetos, superfícies ou indivíduos. Este termo pode também abranger DNA obtido de marcas resultantes do contacto com outras partes do corpo (testa, pés, orelhas, nariz, braços, etc.) ou de objetos pessoais. (van Oorschot *et al.*, 2019; Wickenheiser *et al.*, 2002).

Por vezes, ao analisar amostras recolhidas do local do crime, a fonte é uma incógnita, mas determina-se que não é saliva, sangue e/ou sémen. Assim, tratando-se de DNA de material biológico não visível, supõe-se ser proveniente de células ou

glândulas presentes na pele. Porém, parece ser mais correto referir-se à amostra recolhida como “*touch DNA*” quando se tem a certeza de que o DNA foi depositado através do toque, pela aplicação de metodologias de *fingerprinting*. Mesmo nestes casos, pode estar presente *background DNA* depositado anteriormente à ação de interesse ou DNA transferido indiretamente, durante o toque. Logo, nem todo o DNA recolhido deve ser denominado por “*touch DNA*”. Uma outra situação onde é aceitável a utilização deste termo é em projetos de investigações ou cenários simulados, uma vez que se conhece a fonte e/ou modo de deposição das amostras estudadas (van Oorschot *et al.*, 2019).

Se a utilização de “*touch DNA*” transmite a ideia de que o DNA encontrado foi o resultado do contacto direto da pele com um determinado item, o que nem sempre é possível verificar (Cale, 2015; Gosch *et al.*, 2019), o termo “*trace DNA*” é, frequentemente, associado a amostras com nível de DNA inferior a um determinado limite em qualquer uma das fases do processamento (deteção, recolha, extração, amplificação e interpretação), e que não está, geralmente, atribuído a um qualquer fluido corporal identificável (Burrill *et al.*, 2019; Meakin *et al.*, 2013; van Oorschot *et al.*, 2010). Portanto, caso a fonte celular e/ou modo de ação associada à deposição seja desconhecida, será mais prudente utilizar um termo menos descritivo como “*trace DNA*” (van Oorschot *et al.*, 2019).

1.2. Origem

A investigação da origem do *touch DNA* é essencial para compreender este tipo de evidências, cada vez mais comuns no contexto forense e, assim, otimizar os métodos de recolha e obtenção dos perfis genéticos. Todavia, a maior parte dos estudos realizados nesta área focam-se na demonstração da existência de DNA depositado através do toque, sendo a sua caracterização celular ou microscópica um tanto negligenciada (Burrill *et al.*, 2019; Quinones *et al.*, 2012).

Inicialmente, acreditava-se que o *touch DNA* teria origem exclusiva em células epiteliais removidas da camada mais externa da pele (Bright *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 1997), ideia que, apesar da ausência de evidências que a comprovem, persiste na comunidade científica (Burrill *et al.*, 2019; Ehrhardt *et al.*, 2015). Estudos morfológicos de impressões digitais demonstraram que as células detetadas são, maioritariamente, corneócitos anucleados, possuindo uma quantidade limitada de núcleos livres e células

nucleadas (Alessandrini *et al.*, 2003; Balogh *et al.*, 2003). Assim, tem-se vindo a descobrir que o *touch DNA* pode ter origem num conjunto de componentes, concluindo-se que a ideia inicial de que depósitos de *touch DNA* são o resultado da libertação de células epiteliais é uma hipótese simplista (figura 2) (Burrill *et al.*, 2019; Quinones *et al.*, 2012; van Oorschot *et al.*, 2019).

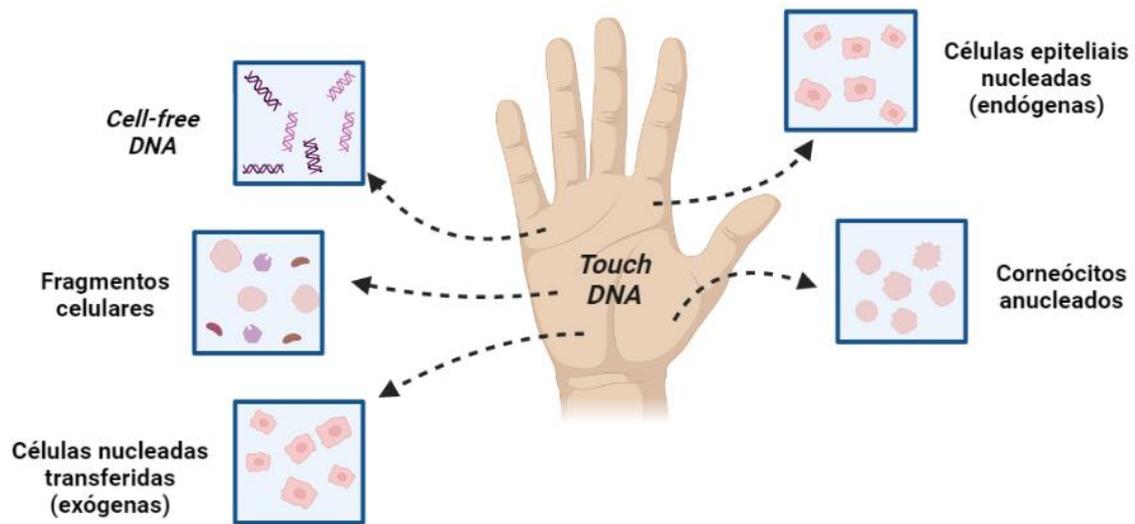


Figura 2. Representação da composição dos depósitos de *touch DNA* sugerida atualmente. Enquanto a transferência de DNA para objetos, superfícies ou outros indivíduos, através do toque, é um facto aceite e estudado extensivamente, a origem destes depósitos é ainda uma incógnita, sendo necessário alargar a sua pesquisa. Baseado em (Burrill *et al.*, 2019). Created with BioRender.com.

1.2.1. Células com origem endógena às mãos

A camada mais externa da epiderme é constituída por queratinócitos diferenciados, denominados por corneócitos, que perdem o seu núcleo e organelos durante o processo de queratinização. Assim, considera-se que estas células estão livres de DNA nuclear (Quinones *et al.*, 2012). Por essa mesma razão, alguns autores afirmam que os corneócitos não deveriam ser considerados uma fonte significativa de *touch DNA*. No entanto, existem ainda incertezas relativamente à possibilidade destas células reterem uma quantidade residual de DNA, visto que já foi possível obter tanto níveis detetáveis como insignificantes de DNA (Burrill *et al.*, 2019; Ehrhardt *et al.*, 2015). Portanto, não podemos descartar a possibilidade dos corneócitos anucleados serem uma fonte de *touch DNA*.

Porém, é necessário considerar a existência de células nucleadas endógenas às mãos que poderão ser responsáveis pela libertação de *touch DNA*.

As secreções produzidas pelas glândulas sudoríparas deslocam-se através de ductos, deparando-se com células que possuem DNA e, conseqüentemente transportam-nas consigo no sentido da superfície das mãos (Burrill *et al.*, 2019; Quinones *et al.*, 2012; Wickenheiser *et al.*, 2002). Estas células epiteliais nucleadas encontram-se, muitas vezes, em menor número comparativamente aos corneócitos anucleados ou aos seus fragmentos celulares (Balogh *et al.*, 2003). No estudo realizado por Alessandrini e colaboradores, a quantidade de DNA demonstrou ser proporcional aos núcleos livres, mas não às células nucleadas, sugerindo que estas poderão não contribuir tanto para o *touch DNA* como os núcleos livres (Alessandrini *et al.*, 2003). Porém, como os métodos utilizados são bastante sensíveis, até mesmo uma quantidade limitada de células nucleadas poderá ser um componente importante dos depósitos de *touch DNA* para posteriormente obter um perfil genético (Burrill *et al.*, 2019).

Uma outra fonte possível de *touch DNA* são as células degradadas e os seus fragmentos, inclusive núcleos livres, resultantes da apoptose celular ou outras vias de morte celular que acompanham a queratinização. Sugere-se que estas estruturas presentes na camada mais externa da pele não são totalmente desprovidas de DNA, contribuindo para o perfil genético obtido de itens manuseados (Burrill *et al.*, 2019; Kita *et al.*, 2008).

Devido ao tamanho da amostra, ao design experimental ou até mesmo à localização corporal, as conclusões obtidas relativamente à possibilidade das células nucleadas, anucleadas e fragmentadas darem origem ao *touch DNA* continuam a ser insatisfatórias. A presença de DNA residual detetável em corneócitos, assim como nos seus fragmentos, apesar da ausência de núcleo, permanece ambígua (Burrill *et al.*, 2019).

1.2.2. Células com origem exógena às mãos

As células epiteliais nucleadas são uma fonte rica de DNA. Portanto, mesmo que não seja possível obter este tipo de células diretamente das mãos, ainda poderão ser uma fonte significativa de *touch DNA* ao serem transferidas de outras partes do corpo para as mãos (Burrill *et al.*, 2019). Estas células podem ter origem no indivíduo responsável pelo depósito de DNA (*self DNA*), nomeadamente da cara, corpo ou roupas deste, provenientes das glândulas sebáceas ou de fluidos biológicos (Kanokwongnuwut

et al., 2018; Zoppis *et al.*, 2014). Para além disso, podem ser o resultado de um contacto externo, sendo esta a razão pela qual se deteta DNA exógeno ao indivíduo em questão (*non-self DNA*) (Burrill *et al.*, 2019).

Zoppis e colaboradores observaram que, após passarem as mãos lavadas em zonas sebáceas da pele de um segundo indivíduo, foi possível detetar o *non-self DNA* transferido, o que não se observou quando passou as mãos lavadas em zona não sebácea da pele. Assim, conclui-se que o sebo pode ser uma fonte de *touch DNA* exógena às mãos, uma vez que não existem glândulas sebáceas nas palmas das mãos. (Zoppis *et al.*, 2014)

Mesmo não estando presente em maioria, é possível que a porção do depósito não proveniente das mãos contribua para o DNA de melhor qualidade (Lacerenza *et al.*, 2016).

1.2.3. Cell-free DNA

A presença de *cell-free DNA* ou DNA extracelular (cfDNA) no plasma foi descrita pela primeira vez por Mandel e Metais, que observaram diferenças nos níveis de cfDNA entre indivíduos saudáveis e doentes (Mandel *et al.*, 1948). Atualmente, a sua pesquisa é maioritariamente utilizada para realizar diagnóstico de cancro e exame pré-natais não-invasivos (Burrill *et al.*, 2019; Vandewoestyne *et al.*, 2012).

Para além de já ter sido detetado em saliva, sémen, suor e urina, o cfDNA é a adição mais recente e menos compreendida do conjunto de potenciais origens de *touch DNA*, podendo mesmo constituir grande parte do DNA recuperado (Burrill *et al.*, 2019).

O cfDNA pode ser transferido das mãos para os itens através do suor, contribuindo para os depósitos de *touch DNA* (Linacre *et al.*, 2010; Quinones *et al.*, 2012; Zoppis *et al.*, 2014). Também a presença de cfDNA na saliva suscita curiosidade visto que este fluido corporal poderá ser transferido através do contacto para uma superfície (Ehrhardt *et al.*, 2015). Observou-se que a maioria do cfDNA presente em depósitos de *touch DNA* é derivado de suor ou saliva (Quinones *et al.*, 2012).

A identificação da origem de depósitos da pele é possível através de técnicas mRNA (Akutsu *et al.*, 2018) ou análise do microbioma (Tims *et al.*, 2010). No entanto, como as amostras *touch* não são exclusivamente constituídas por células da pele, a caracterização do material recolhido torna-se mais difícil. O estudo da origem biológica

ou celular do *touch DNA* poderá auxiliar na interpretação dos perfis obtidos, informar das probabilidades de transferência, persistência ou recuperação ou fornecer informações relativamente à atividade em questão (van Oorschot *et al.*, 2019).

2. Transferência de *touch DNA*

Segundo o eminente Princípio de Locard, o criminoso deixará evidências da sua presença no local do crime e/ou levar consigo algo desse mesmo local (Locard, 1930). Portanto, ao ocorrer um contacto entre o indivíduo e um substrato secundário, na maioria dos casos, vai acontecer uma troca de material biológico, podendo resultar no ganho e/ou perda de DNA de ou para o objeto do qual se recolhe a amostra (van Oorschot *et al.*, 2015).

Quando o tema em questão é a transferência de DNA em casos criminais, deve-se ter em consideração que um indivíduo toca em imensas superfícies/objetos, em outros indivíduos ou até em si mesmo, num curto espaço de tempo, estimando-se que realiza cerca de 15 toques a cada 60 segundos. Logo, é fácil deduzir que as mãos são um vetor comum de transferência de DNA (van Oorschot *et al.*, 2015).

Visto que a composição de depósitos recolhidos de objetos manuseados é diferente à do sangue ou saliva, o que pode afetar a transferência de DNA, é importante estudar este processo (Goray, Mitchell, *et al.*, 2010).

2.1. Mecanismos de transferência

A transferência direta e indireta são mecanismos através dos quais o DNA pode ser transferido para um determinado item (figura 3). Havendo um contacto direto entre a origem do DNA e uma superfície, objeto ou indivíduo, há uma transferência primária ou transferência direta, sendo estes termos permutáveis. Quando existe uma pessoa, objeto ou superfície que funciona como um intermediário, transferindo DNA de um local para outro, trata-se de uma transferência indireta. Neste mecanismo, não há contacto direto entre a fonte original de DNA e o item onde é detetado (van Oorschot *et al.*, 2019).

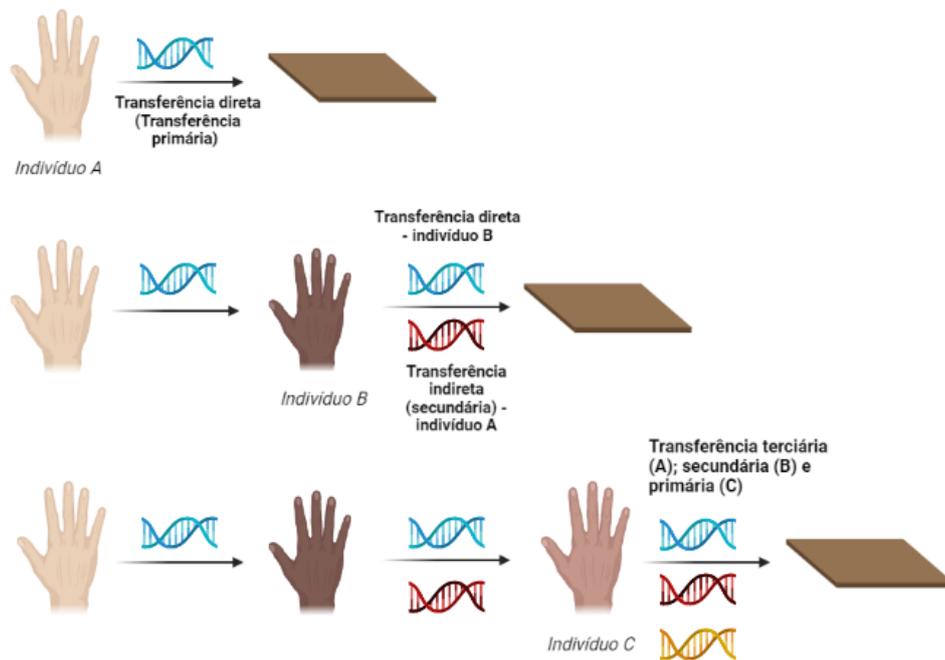


Figura 3. Esquema representativo dos mecanismos de transferência de touch DNA. Baseado em (Dash *et al.*, 2020). Created with BioRender.com

Um único contacto pode provocar simultaneamente a transferência direta e indireta de DNA (figura 3), resultando na detecção de *self DNA* do indivíduo que realizou o contacto (transferência direta), assim como *non-self DNA* adicional presente nas mãos deste, pertencente a um segundo indivíduo (transferência indireta) (van Oorschot *et al.*, 2019).

A transferência indireta pode ser constituída por vários passos intermediários, ou seja, a fonte original de DNA pode ser transferida várias vezes até ocorrer o contacto final. Havendo apenas um passo intermediário é uma transferência secundária, havendo dois passos de transferência trata-se de transferência terciária, e assim sucessivamente – transferência *multi-step* (figura 3) (Meakin *et al.*, 2013). É de notar que a possibilidade de transferência de DNA presente num objeto para uma outra superfície, através de um segundo indivíduo (transferência terciária), foi demonstrada em diversos estudos (Fonneløp *et al.*, 2015; Helmus *et al.*, 2016).

Muitas vezes, o termo “transferência secundária” é utilizado como sinónimo de “transferência indireta”, referindo-se a qualquer evento que ocorra após a transferência primária. Porém, como “transferência secundária” também pode ser referente ao passo singular de transferência que ocorre logo após a deposição inicial, deve-se tornar claro o significado dado num contexto em específico. Para além disso, como na maioria dos

casos forenses não é possível saber quantos passos de transferência ocorreram, é mais correto utilizar o termo “transferência indireta” (van Oorschot *et al.*, 2019).

É possível recuperar uma quantidade considerável de DNA quando se retira amostras diretamente das mãos, quantidade que diminui à medida que se transfere o material biológico para outras superfícies. Assim, ocorre um decréscimo da quantidade de DNA da fonte original quando se efetua uma transferência primária e, subsequentemente, transferência secundária (Samie *et al.*, 2020; van Oorschot *et al.*, 2021). Porém, o aumento da sensibilidade das técnicas utilizadas e do tipo de objetos de que é possível recuperar DNA permite que seja possível obter um perfil genético das amostras deixadas por transferência secundária, terciária e, até mesmo, transferências de ordem mais elevadas, proporcionando ainda mais evidências da existência da transferência indireta (Burrill *et al.*, 2019; Cale *et al.*, 2016).

2.2. Fatores que influenciam a transferência

Um evento de transferência de *touch DNA* é marcado pela imprevisibilidade. A qualidade do perfil obtido pode ser inexistente ou completa e a quantidade depositada e recuperada é igualmente inconstante, dependendo dos fatores envolvidos (Fonneløp *et al.*, 2015; Helmus *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2016). Como é de esperar, a quantidade e qualidade do DNA inicialmente depositado influenciam também o DNA que é detetado nas superfícies subsequentes, ou seja, os fatores que afetam a deposição de DNA, afetam igualmente a transferência indireta desse material biológico (Meakin *et al.*, 2013). Assim, é importante perceber que a transferência é um processo complexo, que não deve ser menosprezado, sendo necessário conhecer a multiplicidade de variáveis que a afetam (tabela 1).

Tabela 1. Fatores que afetam a transferência de touch DNA. Estes fatores podem depender do indivíduo, do objeto/superfície ou do contacto realizado entre as duas partes envolvidas no evento de transferência. Adaptado de (Gosch et al., 2019).

 Indivíduo	Localização corporal Atividades prévias Shedder status Background DNA
 Superfície	Substrato Background DNA
 Contacto	Natureza do contacto Duração Área de contacto Condições ambientais

2.2.1. Fatores dependentes do indivíduo

A transferência de *touch DNA* pode ser condicionada por fatores que dependem exclusivamente do indivíduo, como sendo a localização corporal, as atividades que realizou previamente à transferência, o seu *shedder status*, bem como o *background DNA* existente no próprio indivíduo.

Como referido anteriormente, poderá haver uma maior quantidade de DNA em áreas sebáceas da pele comparativamente às zonas não sebáceas. Assim, para além da relevância da atividade das glândulas sebáceas, como estas são mais abundantes na face, também o local do corpo que o indivíduo toca com as mãos influencia a quantidade de *touch DNA* transferida (Zoppis et al., 2014).

O DNA depositado é também influenciado pela parte da mão que contacta com a superfície, pois as diferentes regiões da mão irão contactar de forma diferente com diferentes objetos/superfícies, dependendo do seu tamanho, utilização ou da sua forma. Para além disso, objetos idênticos podem ser manuseados de maneira diferentes por diferentes pessoas. É também de notar que, apesar das diferenças de área, mais DNA é transferido pelo conjunto das falanges distais dos dedos anelar e médio que da área palmar total. Esta distinção entre as pontas dos dedos e a região palmar estende-se à

quantidade de DNA, ao *non-self DNA* e também à capacidade de captar DNA (McColl *et al.*, 2017; Oleiwi *et al.*, 2015).

Apesar de, teoricamente, a mão dominante e a mão não dominante possuírem o mesmo *shedder status*, certos autores continuam a questionar se existem diferenças de libertação de DNA entre as mãos. Phipps e Petricevic observaram que, se as mãos são lavadas recentemente, a mão não dominante deposita mais DNA relativamente à mão dominante, enquanto que à medida que as mãos ficam sujas, a mão dominante liberta mais DNA (Phipps *et al.*, 2007). Um outro estudo concluiu que, nos homens, a mão não dominante liberta mais DNA que a mão dominante, enquanto, nas mulheres, não se detetaram diferenças significativas (Manoli *et al.*, 2016). Todavia, estudos recentes demonstram que a mão utilizada não afeta significativamente a quantidade de DNA depositada no substrato secundário (Goray *et al.*, 2016; Kanokwongnuwut *et al.*, 2018; Tanzhaus *et al.*, 2021)

As atividades realizadas anteriormente ao evento de transferência, principalmente aquelas que envolvem as mãos, alteram a quantidade de DNA disponível para deposição.

Diferentes atividades resultam em distintas quantidades de DNA depositado durante um contacto. Assim, atividades como usar luvas, lavar as mãos ou tocar em objetos sem DNA podem reduzir a quantidade de DNA transferido, enquanto tocar no cabelo, o contacto repetido com o mesmo objeto ou atividades físicas que causam a produção de suor aumentam quantidade de DNA transferida (Gosch *et al.*, 2019).

Geralmente, há um decréscimo da quantidade de DNA depositada quando o indivíduo manuseia um grande número de itens antes de tocar na superfície analisada, ocorrendo uma diminuição após cada contacto realizado. Se esta perda for de elevada magnitude, o DNA presente na superfície final pode nem sequer ser detetado. Portanto, a deteção de níveis baixos de DNA pode indicar um contacto limitado ou o manuseamento de outros objetos (Burrill *et al.*, 2019; van Oorschot *et al.*, 2019).

A deposição de DNA depende também de algo intrínseco ao indivíduo, a sua capacidade de libertar DNA (*shedder status*). O *shedder status* tem impacto na quantidade do DNA do indivíduo que vai ser transferido, assim como a sua contribuição para um perfil de mistura. Portanto, um *good shedder* libertará maiores quantidades de DNA que um *poor shedder*, depositando mais *touch DNA* para ser detetado e, possivelmente, transferido novamente. O *shedder status* depende de vários fatores que serão explorados *a posteriori* (van Oorschot *et al.*, 2019).

Por último, a existência de *background DNA* vai igualmente afetar a transferência de DNA.

Como apenas uma parte do DNA vai ser transferido para o substrato final, a quantidade de material presente nas mãos do indivíduo que inicia a cadeia de transferência é um fator importante neste processo (Fonneløp *et al.*, 2015; Goray, Mitchell, *et al.*, 2010).

É frequente detetar nas mãos de um indivíduo, DNA de uma outra pessoa (*non-self DNA*) com quem este partilha um espaço, normalmente a habitação ou local de trabalho (Bowman *et al.*, 2018; Lacerenza *et al.*, 2016). O *non-self DNA* poderá ser transferido juntamente com o DNA do indivíduo que contacta diretamente com o substrato secundário, funcionando regularmente, mas não exclusivamente, como contribuinte menor da amostra resultante (Fonneløp *et al.*, 2017; Meakin *et al.*, 2015; Szkuta *et al.*, 2017).

Indivíduos classificados como *good shedders*, depositando elevadas quantidades do seu DNA, parecem capturar menores quantidades de DNA estranho presente no seu meio ambiente (Goray *et al.*, 2016).

2.2.2. Fatores dependentes da superfície/objeto

Também as características da superfície ou objeto vão afetar o processo de transferência de DNA.

O material e a textura do substrato afetam a transferência, persistência e até mesmo a recuperação do DNA. A transferência de DNA e a capacidade de o recolher da superfície depende não só do tipo de substrato onde vai ser depositado (substrato secundário), mas também onde se encontra o depósito inicial que vai ser transferido (substrato primário) (Goray, Eken, *et al.*, 2010; Goray, Mitchell, *et al.*, 2010; van Oorschot *et al.*, 2019).

Pesaresi e colaboradores demonstraram que um substrato não poroso e liso, como o vidro e plástico, retém mais DNA que um substrato poroso e rugoso, como a madeira não tratada (Pesaresi *et al.*, 2003). Porém, estudos mais recentes solidificaram a ideia de que um substrato poroso e rugoso transfere menor quantidade de DNA que uma superfície não porosa e lisa, mas ao funcionar como substrato secundário, recebe melhor o DNA transferido. Portanto, a deslocação de material biológico de um substrato primário não poroso e liso para um substrato secundário poroso e rugoso parece ser a combinação perfeita para ocorrer uma transferência de DNA eficiente (Goray, Eken, *et al.*, 2010; Goray, Mitchell, *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2013; Pfeifer *et al.*, 2017; Verdon *et al.*, 2013). Isto também se aplica quando o substrato primário são as mãos, sendo

possível transferir maiores quantidades de DNA e obter perfis genético mais úteis quando o substrato secundário é madeira ou tecido (Daly *et al.*, 2012; Fonneløp *et al.*, 2015; Helmus *et al.*, 2016). Wickenheiser e colaboradores apontaram que, apesar de se depositar uma maior quantidade de DNA numa superfície porosa, consegue-se recuperar uma pequena porção deste, uma vez que os métodos de recolha utilizados demonstram ser ineficazes para este tipo de substratos (Wickenheiser *et al.*, 2002).

Os estudos acima referidos utilizaram um tamanho de amostra reduzido, sendo necessário realizar mais investigações que incidam nos tipos de substrato envolvidos num evento de transferência.

Tal como acontece com as mãos, a quantidade de DNA disponível numa superfície para ser transferido durante o contacto com outro substrato, bem como a quantidade de DNA que o objeto irá adquirir são influenciadas pelo DNA derivado de contactos prévios (*background DNA*) (Gosch *et al.*, 2019).

Para além disso, o *background DNA* poderá sobrepor-se ao DNA que foi transferido durante o evento investigado ou então provocar o aumento da complexidade do perfil por existirem múltiplos contribuintes, dificultando a obtenção do perfil genético procurado (Goray *et al.*, 2015; Lehmann *et al.*, 2015).

2.2.3. Fatores dependentes do contacto

O contacto direto não é uma condição essencial para que um indivíduo deposite DNA. O DNA de um indivíduo pode ser diretamente transferido através de atividades que ocorram perto do objeto e que implicam a transferência de gotículas de saliva de um indivíduo, como tossir, falar ou espirrar, também denominada como transferência por aerossóis (Finnebraaten *et al.*, 2008; Meakin *et al.*, 2013). No entanto, quando a transferência ocorre entre indivíduos e objetos ou quando se trata de cenários de transferência de ordens mais elevadas, o contacto direto parece ser importante (Gosch *et al.*, 2019).

O contacto em si afeta a qualidade e quantidade de DNA depositado. Portanto, variáveis como a natureza, a duração, área e condições ambientais no momento de contacto têm a capacidade de influenciar a transferência de DNA.

Tobias e colaboradores confirmaram que, ao utilizar as pontas dos dedos para tocar numa superfície e, conseqüentemente, aumentando a pressão aplicada, é possível depositar uma maior quantidade de DNA (Tobias *et al.*, 2017). Para além disso, a adição de fricção provoca um drástico aumento de deposição de *touch DNA* na área

de contacto, quando comparado com um contacto passivo ou aplicação de pressão sem fricção (Goray, Eken, *et al.*, 2010; Goray, Mitchell, *et al.*, 2010).

A pertinência do tempo de contacto na quantidade de DNA depositada é ainda um assunto por esclarecer. Durante a sua investigação, Linacre e colaboradores averiguaram que apenas seria necessário um contacto de 5 segundos para obter um perfil completo, apoiando a descoberta de van Oorschot e Jones, que detetaram quantidades idênticas de DNA, independentemente da duração do contacto (Linacre *et al.*, 2010; van Oorschot *et al.*, 1997). Assim, conclui-se que a maioria da transferência ocorre durante o contacto inicial. Contrariando as investigações referidas anteriormente, Oldoni e colaboradores demonstraram que o tempo de contacto influencia a quantidade de DNA na superfície analisada, ocorrendo uma acumulação DNA devido a uma maior duração do contacto (Oldoni *et al.*, 2016). Uma teoria formulada explica que a quantidade de DNA transferido durante o manuseamento de determinado objeto depende do número de contactos realizados e da duração total destes, não se conhecendo a contribuição de cada um dos parâmetros (Gosch *et al.*, 2019).

Apesar do tempo de contacto não parecer ser um fator crítico na transferência de DNA, a sua relevância depende de outros fatores envolvidos no evento, como o tipo de superfície e natureza do contacto (Meakin *et al.*, 2013).

Geralmente, a probabilidade de ocorrer uma transferência de DNA é proporcional à área de contacto. Apesar disto, a área de contacto deve ser analisada juntamente com a área de amostragem. Isto porque, apesar de se transferir uma maior quantidade de DNA quando a área de contacto é maior, este aumento só é notado se também se aumentar a área de amostragem (Dziak *et al.*, 2018; Gosch *et al.*, 2019).

A humidade, quer esteja presente devido ao teor de humidade inerente ao próprio material biológico ou introduzida artificialmente, pode aumentar significativamente a quantidade de DNA transferido. Existem outras condições, como a temperatura, que poderão influenciar a transferência do material biológico. No entanto, estes parâmetros apenas foram estudados no contexto das manchas de sangue (Gosch *et al.*, 2019).

O estudo destas variáveis é desequilibrado. Enquanto que alguns aspetos do processo de transferência de DNA são investigados minuciosamente (*shedder status*), outros, como a avaliação do peso de cada variável, são negligenciados. Alguns fatores, como as condições ambientais exatas ou a pressão aplicada, raramente são conhecidas no decorrer da investigação, o que não exclui a importância do estudo destes fatores (Gosch *et al.*, 2019).

2.3. Relevância da transferência indireta na investigação criminal

A ideia de que o DNA poderá ser transferido de um local para o outro foi descrito no mesmo artigo onde se demonstrou a existência de *touch DNA*. Para além de descreverem o mecanismo de transferência direta, também detetaram DNA não pertencente ao indivíduo que utilizou as luvas analisadas no estudo (*non-self DNA*), levantando a possibilidade de um evento de transferência indireta (van Oorschot *et al.*, 1997). Esta descoberta gerou um grande debate, dividindo opiniões. Alguns autores refutaram a existência e impacto da transferência indireta, destacando-se o trabalho de Ladd e colaboradores, que argumentaram que este tipo de mecanismo não ocorre assim com tanta frequência para que possa comprometer a investigação criminal (Ladd *et al.*, 1999). Apesar do ceticismo, e fruto dos avanços tecnológicos e científicos na área da Genética Forense, a existência da transferência indireta de DNA foi extensamente comprovada (Farmen *et al.*, 2008; Goray, Mitchell, *et al.*, 2010).

Não descreditando o valor da identificação, torna-se cada vez mais imprescindível investigar como é que o DNA do indivíduo foi depositado em determinado local (Goray *et al.*, 2015; Taroni *et al.*, 2013). O progresso técnico-científico observado nos últimos anos facilitou a tarefa de identificação a partir de quantidades mínimas de DNA. Porém, os peritos devem ter em atenção a possibilidade de transferência indireta pois, para além de permitir o aparecimento de DNA exógeno na amostra, dificultando a sua análise, pode levar à acusação de um indivíduo inocente, visto que o verdadeiro culpado poderá ter transferido DNA de outro indivíduo que nunca esteve no local do crime (Cale *et al.*, 2016). Por esta razão, a transferência indireta tem a capacidade de gerar dúvidas quanto à origem do DNA em questão e, conseqüentemente, quanto à importância da restante evidência de DNA encontrada no local do crime (Farmen *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2002; Verdon *et al.*, 2013).

A presença de apenas um perfil completo pode levar a que se façam conclusões erradas quanto à identidade do indivíduo que manipulou o objeto, visto que se provou possível obter-se o perfil completo de um indivíduo que nunca contactou com o objeto e não recuperar o perfil da pessoa que o manuseou. No entanto, no contexto desta mesma investigação, os eventos de deposição de DNA foram realizados sequencialmente, indicando que, para que isto acontecesse num caso criminal, os dois indivíduos teriam que estar próximos um do outro. Aplicando-se um intervalo de tempo entre o contacto entre os indivíduos e o contacto com o objeto, foi possível detetar o perfil de ambos, sugerindo que, quando estão envolvidas situações de transferência indireta, muitos dos perfis obtidos são misturas (Lowe *et al.*, 2002).

Um dos exemplos que encapsula a relevância de um evento de transferência indireta de DNA é o caso de Lukis Anderson que, em 2013, foi falsamente acusado de homicídio, uma vez que encontraram o seu perfil debaixo das unhas da vítima. Para além de não conhecer a vítima, Lukis encontrava-se no hospital no momento em que ocorreu o homicídio. Concluiu-se que, muito provavelmente, os paramédicos que o transportaram para o hospital e que também estiveram com a vítima, serviram como intermediário, transferindo o DNA deste indivíduo para a vítima (Cale, 2015).

Portanto, a transferência de *touch DNA*, especialmente a que ocorre através de intermediários, não deve ser desvalorizada, sendo essencial o seu estudo aprofundado.

2.4. O papel do perito na determinação do mecanismo de transferência

A principal função do perito é aferir o valor dos seus resultados, oferecendo uma razão de verossimilhança ou *likelihood ratio* (LR), determinado pela razão entre a probabilidade dos resultados, se a proposição da acusação é verdadeira, e a probabilidade dos resultados, se a proposição da defesa é verdadeira. Portanto, o perito não deve oferecer uma opinião quanto às proposições, mas sim aferir o valor dos seus resultados tendo em conta as proposições. As proposições, sumários do que é defendido por cada uma partes envolvidas no processo, devem abordar questões a um nível específico dentro da hierarquia de proposições (Gill *et al.*, 2020).

Não havendo dúvidas quanto à identidade do indivíduo cujo DNA foi recuperado do local do crime (proposições de sub-nível I), as atividades que provocaram a sua deposição são particularmente importantes (proposições ao nível da atividade). Assim, este nível da hierarquia de proposições auxilia o tribunal a perceber como é que o DNA foi transferido para o local onde foi detetado, abordando a questão da transferência direta *versus* transferência indireta. O LR será determinado ao nível da atividade, sendo as probabilidades no numerador e denominador dependentes da transferência, assim como da persistência e recuperação do material biológico (Jackson *et al.*, 2019). No entanto, o perito não deve realizar declarações relativamente ao mecanismo de transferência mais provável, visto que estaria a dar uma opinião sobre as atividades. O tribunal é que deve decidir qual a explicação mais plausível através dos resultados fornecidos pelo perito, juntamente com outras informações importantes (Gill *et al.*, 2020).

Será importante o perito explicar ao tribunal que a presença de um perfil de DNA de um indivíduo não significa necessariamente que existe uma atividade associada pois, como já foi explicado anteriormente, o DNA deste indivíduo pode ter sido transferido indiretamente, de forma inocente. Sem este auxílio, o tribunal poderá cometer o erro de dar à atividade que causou a transferência de DNA, o mesmo valor que deu à evidência de DNA relativamente à fonte do perfil encontrado. Se for necessário estudar as atividades realizadas, deve-se realizar uma nova avaliação visto que não se pode transpor o valor do LR derivado de uma proposição de nível mais baixo para um nível mais elevado, como é o caso de proposições ao nível da atividade (Gill *et al.*, 2020).

Em suma, apesar do perito ser, por vezes, confrontado com vários cenários que possam ter resultado na deposição do DNA do indivíduo no local do crime, sendo este convidado a avaliar se a explicação que umas das partes propôs é plausível, isto vai muito para além da sua função (Gosch *et al.*, 2019; Tanzhaus *et al.*, 2021; Taroni *et al.*, 2013). Apenas deve avaliar os resultados segundo as atividades sugeridas, através do LR, tendo em conta fatores como a transferência e persistência, e não as atividades em si. Assim, o perito deve concentrar-se no LR e o tribunal, nas atividades realizadas pelos intervenientes do processo (Jackson *et al.*, 2019).

3. *Shedder status*

Van Oorschot e Jones conjecturaram que a variação dos níveis de DNA recolhidos dos objetos analisados depende do próprio indivíduo que realiza a transferência, ou seja, diferentes quantidades de DNA são depositadas por diferentes indivíduos durante o contacto direto entre a mão e o objeto (van Oorschot *et al.*, 1997).

A capacidade individual de libertar consistentemente maior ou menor quantidade de *touch DNA*, designada por *shedder status*, foi investigada pela primeira vez por Lowe e colaboradores que, em função dos seus resultados, dividiram os seus voluntários em *good* ou *poor shedders*. Segundo a classificação definida por estes autores, um indivíduo *good shedder* deposita uma grande quantidade de DNA, sendo possível obter um perfil genético completo, enquanto que um *poor shedder* deposita baixos níveis de DNA, o que se traduz em perfis genéticos parciais (Lowe *et al.*, 2002). Todavia, apesar de certos indivíduos depositarem consistentemente quantidades elevadas ou reduzidas

de DNA, a maioria da população encontra-se no meio da escala, denominando-se de *intermediate shedders* (Goray *et al.*, 2016; Kanokwongnuwut *et al.*, 2018).

Um *good shedder* transfere uma maior quantidade de *self* DNA comparativamente com a liberação de *non-self* DNA, enquanto que indivíduos que têm tendência a libertar uma menor quantidade de DNA, produzem uma proporção *self* para *non-self* DNA mais baixa. Estes resultados indicam que, para além dos indivíduos classificados como *good shedders* libertarem uma grande quantidade de DNA, grande parte do DNA transferido é do próprio e não de DNA recolhido de situações anteriores. Levanta-se a hipótese dos *good shedders* recolherem o mesmo *non-self* DNA que os *poor shedders* durante as suas atividades, mas o seu DNA sobrepõe-se ao *non-self* DNA. O oposto parece acontecer nos *poor shedders*, em que o *non-self* DNA sobrepõe-se ao DNA do próprio (Goray *et al.*, 2016).

Quando vários indivíduos contribuem para uma amostra, o *shedder status* de cada um pode influenciar o perfil genético obtido. Um *good shedder* tem a capacidade de camuflar *poor e intermediate shedders*, enquanto que, ao combinar dois *good shedders*, dois *intermediate* ou dois *poor shedders*, é possível detetar o perfil de cada um dos indivíduos (Szkuta *et al.*, 2017).

O tema do *shedder status* apresenta uma série de problemas que precisam de ser investigados. Primeiramente, não existe um limiar específico de DNA depositado que separe os indivíduos em categorias de *shedder status*, ou seja, a melhor forma de dividir indivíduos em *good* e *poor shedders* ainda não foi estabelecida. Normalmente, a categorização em *good*, *intermediate* ou *poor shedders* é realizada comparando os resultados entre os indivíduos (van Oorschot *et al.*, 2019). Fonnelløp e colaboradores consideraram que um indivíduo pode ser um *good shedder* quando a quantidade de DNA recuperada é superior à concentração média de todos os voluntários e pelo menos dois perfis genéticos são de qualidade elevada (Fonnelløp *et al.*, 2017). Um outro problema, é de como determinar o *shedder status* de um suspeito depois do evento de interesse ocorrer, visto que não há forma de comparar com outros indivíduos (van Oorschot *et al.*, 2019).

Contrariando estudos anteriormente referidos, vários autores concluíram que, apesar de alguns indivíduos poderem ser classificados como *good* ou *poor shedders*, um número substancial dos indivíduos não liberta consistentemente maior ou menor quantidade de DNA, sendo classificados como diferentes tipos de *shedders* sob diferentes circunstâncias e condições. Seguindo este raciocínio, a diferença em depositar *touch DNA* é tanto intra-individual como inter-individual (Goray *et al.*, 2016; Goray, Mitchell, *et al.*, 2010; Phipps *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2019). Esta inconsistência poderá estar relacionada com a influência de muitos outros fatores na transferência de

DNA (Quinones *et al.*, 2012). Phipps e Petricevic hipotetizaram que uma das explicações para esta aparente tendência de depositar uma maior quantidade de DNA está relacionada com o hábito que certos indivíduos têm de tocar na face e, conseqüentemente, recolher DNA desta área, podendo transferi-lo, de seguida, para objetos, superfícies ou outros indivíduos. Assim, torna-se evidente que é mais difícil do que se esperava inicialmente dividir os indivíduos em categorias (Phipps *et al.*, 2007).

Nesta procura incessante para responder a todas as questões levantadas sobre este tema, foram identificados alguns fatores que parecem afetar o *shedder status* dos indivíduos, nomeadamente, patologias dermatológicas, idade e sexo.

3.1. Fatores que influenciam o *shedder status*

Apesar de estudos mais antigos afirmarem que é possível obter menos DNA a partir de amostras retiradas de mãos secas, outras investigações comprovaram que indivíduos com este tipo de pele são geralmente *good shedders* (Bright *et al.*, 2004). Esta tendência também se verifica em indivíduos que apresentam patologias dermatológicas. Isto é, certas condições de pele que provocam um aumento da taxa de proliferação das células da pele, como a dermatite atópica e psoríase, resultam na deposição de maiores quantidades de *touch DNA* e obtenção de perfis genéticos de melhor qualidade, comparativamente a indivíduos que têm uma pele saudável. Para além disso, também comprovaram que a qualidade dos perfis e a quantidade do DNA depositado diminui se o indivíduo realizar tratamento para estas patologias. (Kamphausen *et al.*, 2012).

Outro fator que influencia a capacidade de depositar DNA é o sexo do indivíduo. Indivíduos do sexo masculino depositam maiores quantidades de DNA em comparação com indivíduos do sexo feminino, ou seja, os homens são mais frequentemente classificados como *good shedders* (Fonneløp *et al.*, 2017; Goray *et al.*, 2016; Manoli *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2019).

Adicionalmente, alguns autores verificaram uma correlação negativa entre a qualidade/quantidade de *touch DNA* transferido e a idade do indivíduo. Esta dependência foi detetada principalmente em crianças e idosos, independentemente do sexo. Portanto, as crianças têm tendência a ser *good shedders* e os idosos, *poor shedders*, enquanto que os adultos compreendidos entre estes dois grupos são mais imprevisíveis (Manoli *et al.*, 2016; Poetsch *et al.*, 2013).

Comportamentos infantis, como colocar as mãos na boca, podem ser um dos motivos por que as crianças depositam uma maior quantidade de DNA, pois, neste caso, para além de transferirem células da pele, transferem também células provenientes da boca (Wickenheiser *et al.*, 2002). Além do mais, as crianças têm uma taxa de proliferação celular elevada e a sua pele é mais fina, o que também pode contribuir para uma maior libertação de células da pele nucleadas (Stamatas *et al.*, 2010). Indivíduos mais velhos depositam uma menor quantidade de DNA devido ao processo de senescência celular relacionada com a idade ou pela diminuição da taxa de renovação da epiderme. Para além disso, também é possível que modificações epigenéticas relacionadas com a idade possam afetar a regeneração das células epidérmicas e, conseqüentemente, a descamação (Manoli *et al.*, 2016).

Apesar das dificuldades em compreender o *shedder status*, a categorização dos indivíduos em *good* ou *poor shedders*, assim como o conhecimento do número de indivíduos em cada categoria na população, pode ajudar a compreender melhor os fatores que influenciam a transferência de *touch DNA* (Lowe *et al.*, 2002). Determinar se um indivíduo é *good* ou *poor shedder* de *touch DNA* poderá também auxiliar durante a investigação criminal, ajudando a avaliar a importância dos resultados obtidos (Goray *et al.*, 2016).

4. Background DNA

A maioria dos itens e superfícies possuem DNA adquirido de contactos prévios, também designado por *background DNA*, especialmente quando se trata de itens pessoais ou itens partilhados frequentemente (van Oorschot *et al.*, 2019).

Como referido anteriormente, a transferência de *touch DNA* depende da quantidade de DNA depositado na superfície em contactos prévios, ou seja, a deteção do DNA depositado pode diminuir com o aumento dos níveis de *background DNA*, o que dificulta a interpretação dos resultados obtidos por haver um maior número de contribuintes para a mesma amostra (Fonneløp *et al.*, 2017; Lehmann *et al.*, 2015; van Oorschot *et al.*, 2014). Se um perpetrador manipular um item com *background DNA* durante a atividade criminal, espera-se obter uma mistura de DNA deste e do utilizador habitual (Pfeifer *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2016; van Oorschot *et al.*, 2014).

Quando a amostra de interesse é constituída por uma quantidade considerável de sangue, saliva ou sémen, estes fluidos biológicos poderão sobrepor-se ao *touch DNA* que já se encontrava na superfície anteriormente à deposição de interesse. Neste caso, é possível que a amostra recolhida forneça um perfil singular. Por outro lado, se níveis reduzidos de sangue, saliva ou sémen forem depositados em *touch DNA*, é mais provável gerar um perfil de mistura. O mesmo acontece se *touch DNA* for depositado em quantidades reduzidas deste tipo de material biológico, transferido previamente para a superfície. A contribuição dos indivíduos para a mistura de *touch DNA* tanto como depósito de interesse, como de *background DNA*, depende dos níveis de *background DNA* relacionados com historial de utilização, da maneira como o segundo utilizador interage com a superfície, do *shedder status* de ambos os indivíduos e da duração do contacto (Peel *et al.*, 2004; van Oorschot *et al.*, 2019).

Raymond e colaboradores investigaram os níveis de *background DNA* nos pontos de entrada mais comuns em arrombamentos, concluindo que possuem pouco DNA, especialmente as janelas, sendo um bom alvo para recolha de evidências (Raymond *et al.*, 2008). Assim, o estudo dos níveis *background DNA* em determinados locais poderá ajudar a perceber onde se deve retirar amostras *touch* para obter melhores resultados.

A presença de *background DNA* é inevitável, logo, é importante pensar sempre na possibilidade da recuperação de vestígios que, para além de possuírem DNA do ofensor, podem também ter DNA de outros indivíduos que não estão envolvidos no crime (Gill, 2014). A recolha de amostras contíguas à área de interesse poderá ser útil para obter um perfil semelhante ao *background DNA* presente na amostra de interesse. Adicionalmente, a recolha de amostras de referência dos utilizadores diários de um determinado objeto pode também auxiliar na interpretação do perfil genético obtido (van Oorschot *et al.*, 2010; van Oorschot *et al.*, 2019).

Atualmente, os investigadores tentam encontrar formas de distinguir depósitos recentes dos depósitos de *background DNA* através de biomarcadores, proteínas, mRNA e morfologia celular (van Oorschot *et al.*, 2019).

5. Persistência de *touch DNA*

É possível obter perfis genéticos completos, utilizando STR, a partir de amostras biológicas, inclusive *touch DNA*, passados vários anos ou até mesmo décadas após a sua deposição, auxiliando na investigação de casos arquivados (Raymond *et al.*, 2009; van Oorschot *et al.*, 2019).

A persistência do DNA num objeto, superfície ou indivíduo, assim como os fatores que a influenciam, são aspetos importantes para que se consiga recolher material para análise (Burrill *et al.*, 2019). Dada a sua importância para o sucesso da análise da amostra recolhida, é essencial continuar a estudar a persistência do DNA em diversas situações.

5.1. Objetos não pessoais *versus* pessoais

Ao analisar objetos não pessoais, que são partilhados por vários indivíduos, é comum obter-se perfis de mistura. Neste caso, contrariamente ao que se possa pensar, o último indivíduo que toca neste objeto não é necessariamente o maior contribuinte da mistura. Isto porque a contribuição de cada indivíduo para a mistura depende do seu *shedder status* e do tipo e frequência dos contactos realizados por todos os utilizadores (Goray *et al.*, 2015; van Oorschot *et al.*, 1997; van Oorschot *et al.*, 2019).

No que diz respeito aos objetos pessoais, o DNA do utilizador original persiste mesmo depois de ser manipulado por outro indivíduo, apesar de se observarem diferenças que dependem do substrato, atividades e duração do contacto (Oldoni *et al.*, 2016; Pfeifer *et al.*, 2017; Poetsch *et al.*, 2018).

5.2. Fatores que influenciam a persistência

São fatores que influenciam a persistência de DNA o tempo entre a deposição e a recuperação da amostra, as condições ambientais, o tipo de substrato no qual o DNA é depositado, bem como as atividades realizadas entre a deposição e a recuperação desse mesmo DNA.

A quantidade e qualidade de DNA presente na superfície diminui à medida que o intervalo de tempo entre a sua deposição e recuperação/transferência aumenta.

Portanto, a minimização do tempo que se demora a recolher as amostras é um fator essencial para assegurar a detecção de elevadas quantidades de DNA (Alketbi, 2018; Bowman *et al.*, 2018; Raymond *et al.*, 2009).

Apesar do tempo entre a deposição e a recolha ser um fator importante relativamente à quantidade de DNA detetada, a persistência do DNA diminui significativamente quando este fator é conjugado com determinadas condições ambientais capazes de degradar o DNA, como a humidade, temperatura, exposição a radiação ultravioleta (UV), vento e chuva (Meakin *et al.*, 2013; Raymond *et al.*, 2009; van Oorschot *et al.*, 2019). A humidade aumenta a taxa de degradação do DNA, no entanto, tal como já foi referido, pode também melhorar a sua transferência (Goray, Eken, *et al.*, 2010).

Ao armazenar uma lâmina de vidro num ambiente escuro e frio, como o laboratório, Raymond e colaboradores demonstraram que, apesar da redução de quantidade de DNA, é possível obter perfis completos até 6 semanas após deposição. No entanto, quando a transferência ocorreu no exterior (peitoril de janela), o DNA apresentou indícios de degradação apenas 2 semanas após deposição, não sendo possível obter perfis genéticos. Portanto, DNA depositado ao ar livre degrada mais rapidamente que DNA depositado em espaços fechados. Todavia, um contacto entre um indivíduo e um objeto resulta na transferência de muito menos DNA que a fonte de material genético utilizada pelos autores. Logo, espera-se que o *touch DNA* seja indetetável num período de tempo mais curto do que foi demonstrado nesta investigação, dificultando a determinação do perfil genético (Raymond *et al.*, 2009).

A persistência do *touch DNA* na pele quando imerso em água (fria, quente, à temperatura ambiente, água de um riacho e numa lagoa) foi também investigada, concluindo-se que é possível obter perfis passados vários dias. A duração desta persistência depende da temperatura da água e do ambiente aquático, mostrando-se superior em água fria (Meixner *et al.*, 2020).

Para além de depender do período de tempo entre deposição e recuperação, e de fatores ambientais, a persistência do DNA é também influenciada pelo tipo de substrato onde é depositado.

Goray e colaboradores observaram que, havendo um período de 24h entre a deposição e recolha de DNA, ocorreu uma redução de 50% da quantidade detetada em algodão. Já quando utilizaram plástico como substrato, detetaram quantidades semelhantes de DNA independentemente deste intervalo de tempo, quer fosse 60 segundos ou 24 horas (Goray, Mitchell, *et al.*, 2010).

No decorrer de uma investigação criminal, geralmente, não se dá a devida atenção às atividades realizadas entre o evento de transferência inicial e a deposição final no

substrato onde se recolhe o DNA, assim como a sua importância para a persistência do DNA (van Oorschot *et al.*, 2015).

Tal como ocorre na transferência, também a persistência do *touch DNA* é influenciada pelos contactos sucessivos, uma vez que a quantidade de DNA depositado vai reduzindo ao entrar em contacto com outros itens ou indivíduos. Para além disso, a probabilidade de detetar DNA diminui à medida que o número de objetos entre transferência inicial e transferência final aumenta (Burrill *et al.*, 2019; Lehmann *et al.*, 2015). É muito provável que, quantas mais vezes o objeto for manuseado por diferentes pessoas, menor quantidade de *touch DNA* do indivíduo de interesse vai ser detetado. É de prever que o mesmo aconteça com o *self* e *non-self* DNA presente nas mãos de um determinado indivíduo após tocar em vários objetos (van Oorschot *et al.*, 2019). Devido ao aumento da sensibilidade das técnicas, a persistência de DNA derivado de contactos prévios afeta seriamente a quantidade de DNA recolhida, assim como de quem se obtém o perfil genético (Szkuta *et al.*, 2017).

Estudos comprovaram que continua a ser possível obter perfis completos mesmo depois de se lavar o objeto à mão, o que não acontece em itens lavados na máquina de lavar a loiça (Helmus *et al.*, 2020).

Simulando cenários de agressão, Bowman e colaboradores conseguiram obter perfis do “agressor” mesmo tendo realizado a colheita de vestígios 24 horas depois do contacto, intervalo de tempo em que a “vítima” retoma as suas atividades diárias. Apesar da diminuição da quantidade de DNA, ainda é possível obter o perfil, particularmente quando as agressões envolvem fricção e a vítima não tomou banho. No entanto, as roupas utilizadas pela vítima durante a agressão parecem ser um melhor local para retirar amostras do agressor, comparativamente à pele da vítima. Isto porque, o vestuário encontra-se protegido de fatores que eliminariam o DNA e para além disso, ao removê-lo deixa de estar exposto às atividades diárias realizadas pela vítima, como tomar banho, que poderiam remover o DNA do agressor da pele (Bowman *et al.*, 2018).

6. Contaminação

Eventos de contaminação e de transferência de DNA referem-se ao mesmo fenómeno físico de movimento de DNA, no entanto, distinguem-se pelo momento em que ocorrem. A transferência de DNA associada ao crime ocorre estritamente antes do estabelecimento do local do crime, podendo ou não a fonte do material genético estar

envolvida no crime, como é o caso da transferência indireta do DNA do indivíduo através do perpetrador. Em oposição, a contaminação não relacionada com a atividade criminal ocorre quando DNA exógeno entra em contacto com DNA relevante para o caso em questão, durante ou depois do processamento do local do crime (van Oorschot *et al.*, 2019).

O DNA contaminante pode ocultar o DNA de interesse, dificultando, assim, a interpretação do perfil obtido e/ou desorientar a investigação criminal (van Oorschot *et al.*, 2010). Mesmo que funcione como um contribuinte menor é possível detetar DNA depositado por contaminação devido à utilização de técnicas cada vez mais sensíveis. Por esta razão, ao analisar amostras com baixos níveis de DNA, como *touch DNA*, devem-se ter cuidados redobrados com a contaminação. Adicionalmente, a interpretação dos perfis é dificultada pela incapacidade em distinguir entre DNA depositado pós-atividade criminal e o *background DNA* presente no local. Portanto, a introdução de qualquer tipo de DNA exógeno ao ofensor no local do crime pode alterar o resultado final da investigação criminal, tendo a capacidade de exonerar ou implicar incorretamente indivíduos ou então diminuir o valor probatório aos olhos do tribunal (Balk, 2015). Verificou-se que o resultado mais comum provocado pelo fenómeno da contaminação é a falsa exclusão, visto que se deteta DNA não pertencente ao suspeito (Gill *et al.*, 2004).

Os investigadores, tanto membros da polícia como cientistas forenses, podem contaminar o local do crime e as evidências recolhidas, sendo por isso referida como contaminação mediada pelo investigador. Apesar dos investigadores utilizarem roupa protetora e luvas para evitarem a contaminação do local do crime com o seu DNA, podem ainda funcionar como vetor de transferência de DNA entre itens presentes no local de crime (Fonneløp *et al.*, 2015; Gill, 2014). A contaminação das evidências também pode ocorrer durante o seu transporte para análise, quando não estão acondicionadas apropriadamente (Goray *et al.*, 2012). Chegando ao laboratório, as amostras podem ser contaminadas pelo pessoal do laboratório ou ocorrer contaminação cruzada entre amostras armazenadas. Durante a própria produção dos materiais ou reagentes utilizados no laboratório ou no local do crime, poderá ocorrer a eventual deposição de DNA exógeno, que irá afetar a análise das amostras, como aconteceu no caso “*The Phantom of Heilbronn*” (Balk, 2015).

Por vezes, a contaminação pode ser explicada pelo treino incompleto dos indivíduos responsáveis pela investigação do local do crime e pela análise dos itens presentes neste espaço, pela falta de procedimentos apropriados e pela ausência de procedimentos de limpeza, ou em alternativa, pelo não seguimento de todos estes

procedimentos (van Oorschot *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2016). No entanto, mesmo seguindo todos os passos, existem eventos de contaminação que estão fora do controle.

É extremamente importante a implementação de medidas com o intuito de detetar e minimizar os efeitos da contaminação, como a utilização de bases de dados que possuam o perfil genético dos indivíduos que manuseiam as evidências, quer durante a sua análise, quer ao manusear as embalagens que contém as evidências; indivíduos que frequentem o local do crime, assim como qualquer indivíduo que trabalhe em áreas onde as evidências são analisadas e armazenadas (van Oorschot *et al.*, 2015; van Oorschot *et al.*, 2019).

JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJETIVOS

A Genética Forense atravessou um grande período de desenvolvimento técnico-científico que provocou o aumento da sensibilidade das técnicas de análise utilizadas nos laboratórios forenses, tornando-se possível obter perfis completos a partir de níveis muito baixos de DNA, o que é característico das amostras *touch*. Consequentemente, a análise deste tipo de amostras é, atualmente, frequente em investigações forenses em Portugal, sendo comum o Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro (SGBF-C) do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF) receber evidências que exibem vestígios impercetíveis a olho nu, sendo importante o seu estudo exaustivo. Assim, é necessário questionar se algo tão impactante como a pandemia que estamos a experienciar atualmente poderá ter consequências na forma como o *touch DNA* é investigado na Genética Forense.

Como as mãos são um vetor crítico na transmissão deste vírus, a transferência de COVID-19 entre indivíduos é facilitada pela carência de procedimentos eficazes de higienização das mãos. Assim, estas medidas de proteção demonstraram ser a primeira linha de defesa contra o vírus, juntamente com as máscaras, especialmente na ausência de uma vacina, logo, verificou-se um aumento significativo da utilização de soluções alcoólicas durante este período. Daí a importância de investigar se as soluções alcoólicas poderão dificultar a deteção de *touch DNA* e a sua subsequente genotipagem. Portanto, este estudo tem como objetivo principal verificar se a utilização de soluções alcoólicas afeta a transferência de *touch DNA* para as superfícies.

Objetivos específicos:

- Concluir qual o melhor substrato para realizar cenários de transferências;
- Determinar qual o melhor método de recolha de *touch DNA*;
- Comparar níveis de DNA transferidos antes com aqueles detetados após voluntários desinfetarem as mãos;
- Avaliar a evolução dos níveis de DNA depositados após utilização de soluções alcoólicas;
- Analisar o nível de degradação das amostras recolhidas e aferir se este valor sofre alterações possivelmente relacionadas com a aplicação da solução alcoólica nas mãos;
- Avaliar perfis genéticos de amostras que apresentam quantidades discrepantes de DNA para perceber se estas alterações estão relacionadas com a higienização das mãos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta investigação foi sujeita a avaliação por parte da Comissão de Ética do INMLCF, da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e do Gabinete de Estudos Avançados da FMUC, tendo recebido sempre um parecer favorável.

1. Amostragem

O estudo contou com a participação de 6 voluntários (2 do sexo masculino e 4 do sexo feminino), com idades compreendidas entre 24 e 57 anos, todos destros. Nenhum dos indivíduos possui patologias dermatológicas que possam afetar a deposição de DNA. Os participantes assinaram um documento de consentimento informado com informações necessárias sobre o estudo. As amostras passaram por um processo de anonimização.

2. Design experimental

2.1. Escolha do substrato e método de recuperação

2.1.1. Substrato

Num primeiro momento, pediu-se aos voluntários A e G que colocassem um dos dedos numa lâmina de vidro ou numa espátula de madeira. De seguida, estes indivíduos desinfetaram as mãos com uma solução alcoólica com composição química apresentada na tabela 2, deixando secar naturalmente, e repetiram o procedimento de deposição em ambas as superfícies. Neste ensaio, não se standardizou a mão utilizada, o tempo de deposição, assim como não se referiu que os voluntários deveriam aplicar fricção. Os cenários de transferência foram realizados numa *DNA workstation* previamente descontaminada com luz UV.

Tabela 2. Composição química da solução alcoólica utilizada para desinfetar as mãos.

COMPOSIÇÃO
Etanol 65%
Propanol 8%
Cloreto de didecildimetilamônio 0.25%
Agentes dermoprotetores e excipientes q.b.p 100 mL

O DNA foi recolhido utilizando uma zaragatoa humedecida com água *nuclease-free*, posteriormente colocada numa *LySep™ Filter Column* inserida nos *Samples Tubes*, constituintes do kit de extração *PrepFiler Express BTA™*, *Applied Biosystems* (AB). As amostras obtidas foram identificadas e armazenadas a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ até se prosseguir com a extração. Este ensaio foi realizado apenas uma vez.

2.1.2. Método de recuperação

No segundo ensaio utilizou-se apenas a lâmina de vidro como substrato. Os participantes A e B aplicaram pressão e fricção na superfície durante 15 segundos, depositando o seu DNA, tal como demonstrado na figura 4. Tal como referido no ensaio anterior, depois de depositarem o DNA, os indivíduos desinfetaram as mãos e repetiram o procedimento. Desta vez acrescentou-se um novo intervalo de tempo de 15 minutos entre o último contacto com a superfície, período em que os voluntários continuaram com as suas atividades normais. Passado o tempo definido, repetiram o processo de transferência.



Figura 4. Método de transferência de touch DNA.

O voluntário B realizou dois conjuntos de deposições, uma com a mão dominante e outra com a mão não dominante.

Contrariamente ao ensaio anterior, o *touch DNA* depositado foi recolhido utilizando o método da fita-cola, tendo sempre cuidado em cortar e descartar a zona manipulada para retirar o material da lâmina e não tocar na área onde os indivíduos realizam o contacto, para evitar contaminação. Também com esta finalidade, utilizou-se sempre luvas, bata e máscara. Após cortar o pedaço de fita-cola já com a amostra, colocaram-se os fragmentos resultantes, utilizando uma pinça, nas colunas acopladas a tubos referidas anteriormente. As amostras obtidas foram identificadas e armazenadas a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ até extração.

2.2. Recolha de amostra

Neste ensaio pediu-se aos voluntários (A-F) para colocarem as pontas dos dedos da mão dominante numa lâmina de vidro, realizando pressão e fricção durante 15 segundos, tal como demonstrado na figura 4. De seguida, desinfetaram as mãos e repetiram o processo de deposição de DNA.

Passado 15 minutos, e, novamente, 60 minutos após utilização do desinfetante (45 minutos depois do último evento de transferência), os participantes executaram o mesmo procedimento. Durante estes intervalos de tempo, os voluntários continuaram com o seu trabalho diário, seja este no laboratório ou à secretária. A higienização das mãos previamente ao início da experiência não foi controlada.

Todos os cenários de transferência concretizaram-se numa *DNA workstation* previamente descontaminada com luz UV. Cada voluntário realizou o protocolo descrito anteriormente em três dias diferentes, obtendo-se 3 replicados.

As amostras foram novamente recolhidas utilizando fita-cola, tendo sempre o máximo cuidado para não as contaminar. Subsequentemente, os fragmentos de fita-cola foram colocados nas colunas acopladas a tubos, identificadas e armazenadas a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ até extração.

3. Processamento das amostras

Em todas as etapas descritas de seguida realizaram-se controlos positivos e negativos. O controlo positivo é constituído por todos os reagentes utilizados na respetiva fase de processamento, assim como por uma amostra conhecida, como controlo interno de qualidade. O controlo negativo é preparado apenas com os reagentes utilizados na etapa de processamento em questão (sem amostra), com o objetivo de supervisionar possíveis contaminações.

3.1. Extração de DNA

O DNA não é o único constituinte de uma amostra biológica recolhida num local do crime, estando também presentes outros componentes como proteínas celulares capazes de dificultar a tipagem do DNA. Assim, desenvolveram-se diversos métodos de extração de DNA que permitem a eliminação dos inibidores da reação de PCR, de forma a obter DNA o mais puro possível. Para além disso, este procedimento permite adquirir amostras que possuem DNA de elevada qualidade, que não se degrada ao longo do tempo (Aşır *et al.*, 2016; Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011).

A escolha da técnica de extração a utilizar depende do tipo de amostra biológica analisada, da quantidade de DNA que se espera obter, do suporte onde se encontra depositada a amostra, assim como da presença de inibidores da PCR. A extração de fase sólida tem vindo a ganhar popularidade nos laboratórios forenses, uma vez que pode ser automatizada e, para além disso, é eficaz a remover inibidores da PCR (Altayari, 2016).

Existem diversos kits de extração de fase sólida. Ao utilizar um suporte adesivo para recolher o *touch DNA*, o kit *PrepFiler Express BTA™* (AB) com *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System* (AB) é o mais apropriado para extrair o DNA. Este método baseia-se na afinidade entre o DNA e um substrato sólido, neste caso, partículas magnéticas. Consequentemente, apenas os componentes indesejados ficam em solução, sendo posteriormente, removidos, permitindo a purificação do DNA (figura 5) (Altayari, 2016).

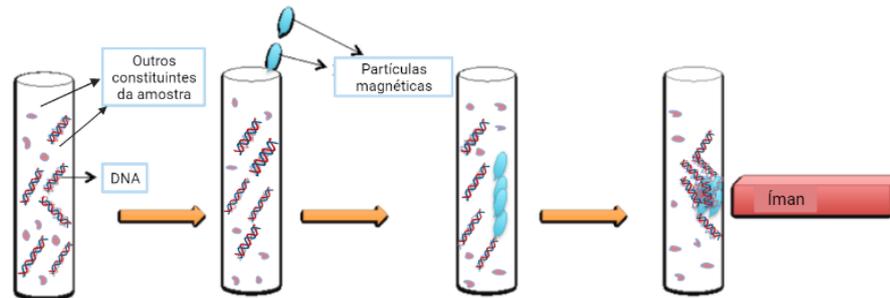


Figura 5. Ligação de DNA a partículas magnéticas. Este é o princípio fundamental do método de extração de fase sólida. Adaptado de (Aşır et al., 2016).

Este método de extração engloba quatro fases distintas, nomeadamente, (1) Lise celular, caracterizada pela destruição das membranas celulares; (2) Ligação de DNA a partículas magnéticas; (3) Remoção de inibidores da PCR e, por fim (4) Eluição da molécula de DNA purificada e concentrada. A lise dos componentes celulares é o único procedimento efetuado manualmente, sendo que as restantes fases são automatizadas no extrator de DNA *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System* (Butler, 2012; IT-SGBF-C-025, 2022).

Primeiramente, preparou-se a solução de lise conforme a tabela 3, adicionando-se 230 μL desta solução a cada uma das amostras de *touch DNA* anteriormente armazenadas em *LySep™ Columns*. As amostras foram incubadas a 56°C , durante 40 min, num *thermomixer* com agitação de 750 rpm (rotações por minuto). De seguida, as amostras foram centrifugadas durante 2 min a 10000 rpm, com o objetivo de deslocar o lisado da coluna para o tubo emparelhado. A coluna foi descartada, enquanto o tubo com o produto da lise foi colocado no *robot* de extração, juntamente com os consumíveis necessários, definindo-se um volume de eluição de 50 μL . No fim da corrida, os tubos de eluição com o DNA purificado e concentrado foram congelados a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ (Applied Biosystems, 2017; IT-SGBF-C-025, 2022).

Tabela 3. Preparação da solução de lise para extração do DNA com o kit PrepFiler Express BTA™.

PrepFiler BTA™ Lysis Buffer (µL)	Proteinase K (20mg/mL) (µL)	DTT * (1M) (µL)	Volume final (µL)
220	7	3	230

*DTT – ditioneitol

3.2. Quantificação de DNA

Depois da purificação do DNA, é necessário determinar a quantidade de DNA que foi possível extrair. Tipicamente, determina-se a quantidade de DNA existente na amostra para perceber se há material suficiente para avançar com a amplificação e, caso se consiga um resultado favorável, qual a quantidade de DNA adequada para a obtenção de perfis genéticos de qualidade. Para além disso, permite definir um plano de análise, ajudando a decidir quais as amostras mais promissoras ou o tipo de marcador genético mais adequado (STRs autossômicos, STRs do cromossoma Y ou DNA mitocondrial) (Applied Biosystems, 2018; Butler, 2012; IT-SGBF-C-015, 2022). Neste trabalho em particular, realizou-se a quantificação do DNA total presente nas amostras recolhidas dos voluntários com o objetivo de verificar se existem variações significativas na libertação de DNA quando se utilizam soluções alcoólicas para desinfetar as mãos.

Apesar de existirem outras técnicas de quantificação, o *Real-time PCR* (RT-PCR) é, atualmente, a mais utilizada em contexto forense. Esta baseia-se na monitorização dos níveis de DNA através da alteração de fluorescência que ocorre durante a amplificação, utilizando mais frequentemente uma sonda *TaqMan* ou corantes intercalados como o SYBR Green. A sonda fluorogénica *TaqMan* é constituída por dois corantes fluorescentes, o *Reporter* na extremidade 5' e o *Quencher* na extremidade 3'. Esta sonda marcada liga-se à cadeia *template* de DNA, posicionando-se na região entre os dois *primers* que delimitam a sequência a amplificar. A proximidade entre estes dois componentes impede a emissão de fluorescência, uma vez que o *Quencher* suprime a fluorescência do *Reporter*. Durante a polimerização, a *Taq DNA* polimerase, ao atingir a zona onde se encontra ligada a sonda, adquire função de exonuclease, degradando-a, o que resulta na separação do *Reporter* e do *Quencher*, e conseqüentemente, à emissão de fluorescência do *Reporter* (figura 6). Portanto, à medida que mais produtos de PCR são formados, maior é o número de fluorocromos libertados, sendo a

fluorescência, medida pelo equipamento, proporcional ao DNA presente na amostra (Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011; IT-SGBF-C-015, 2022).

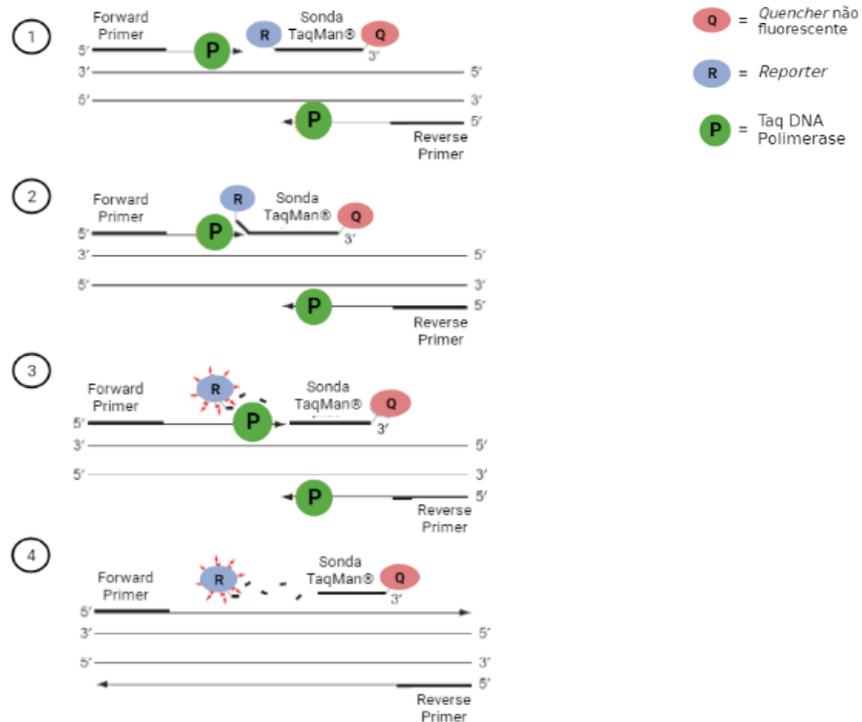


Figura 6. Esquema representativo da técnica de RT-PCR. Este método consiste na quantificação dos níveis de DNA através da utilização de uma sonda fluorogénica. Adaptado de (Applied Biosystems, 2018). Created with BioRender.com

Existem vários kits para quantificação, no entanto, o *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* (AB) é dos mais informativos visto que, para além de quantificar o DNA total e DNA masculino, ainda permite verificar a qualidade do DNA analisado relativamente à degradação, assim como os níveis de inibição representados pelo IPC (*Internal PCR Control*).

O kit mencionado é capaz de amplificar e detetar três alvos diferentes, um deles no cromossoma Y. Já no DNA autossómico encontra-se um alvo composto por 214 pares de base (pb) designada por *Large Autosomal Target* (LA) e um outro fragmento de 80 pb chamado *Small Autosomal Target* (SA). O tamanho reduzido do alvo SA permite a quantificação de amostras degradadas. Assim, este tipo de fragmentos é amplificado com o propósito de quantificar o DNA humano total. Por outro lado, o alvo LA é amplificado apenas para determinar se o DNA está degradado, funcionando como um indicador de degradação da amostra de interesse (Applied Biosystems, 2018).

Numa câmara de fluxo laminar descontaminada com luz UV preparou-se uma mistura de *Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix* e *Quantifiler™ Trio Primer Mix*, como demonstrado na tabela 4, distribuindo-se 18 µL desta em cada poço de uma placa *Optical 96-well Reaction Plate (TermoFisher Scientific - AB)*. Adicionou-se 2 µL de DNA extraído (ou controlo positivo 0.1 ng/µL) no respetivo poço desta mesma placa, perfazendo um volume total de 20 µL. Depois de preparar placa com amostras para quantificação, utilizou-se um adesivo *Optical Adhesive Film (TermoFisher Scientific - AB)* para, cuidadosamente, selar a placa, tentando evitar deixar impressões digitais na superfície do adesivo para que não ocorressem interferências na quantificação da fluorescência. Na presença de bolhas nos poços, centrifugou-se levemente na centrífuga de placas. Por fim, colocou-se a placa no equipamento *7500 Real Time PCR System (AB)* para iniciar a quantificação do DNA presente nas amostras.

Tabela 4. Preparação das amostras para quantificação, conforme o protocolo.

<i>PCR Reaction Mix</i> (µL)	<i>Primer Mix</i> (µL)	DNA extraído (µL)	Volume final (µL)
10	8	2	20

A metodologia de RT-PCR segue o princípio geral de qualquer reação de PCR, com as suas 3 fases características: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. Por ser uma reação em tempo real, é possível observar o desenrolar da reação num gráfico de fluorescência versus o número de ciclos da PCR. Existe um ponto, na fase de crescimento exponencial, em que a fluorescência detetada ultrapassa um determinado *threshold*, definido arbitrariamente pelo *software* do equipamento em função do ruído de fundo, denominado por *Cycle Threshold (CT)*. Quanto menos ciclos de PCR forem necessários para atingir o CT, maior a quantidade de DNA existente na amostra. A concentração de DNA é determinada por comparação com uma curva de calibração obtida a partir de 5 diluições sucessivas de *DNA standard* com *DNA Dilution Buffer*, de concentração conhecida.

A quantidade de DNA existente nas amostras, bem como o seu índice de degradação, foi determinada utilizando o *software HID Real Time PCR Analysis Software (AB)*.

As amostras extraídas são novamente armazenadas a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ (Applied Biosystems, 2018; IT-SGBF-C-015, 2022).

3.3. Amplificação de DNA

Frequentemente, as amostras recolhidas num determinado local do crime possuem baixos níveis de DNA e/ou encontram-se altamente degradadas, como é característico das amostras de *touch DNA*. Por esta razão, a descoberta da técnica enzimática de PCR revolucionou a Genética Forense, permitindo a formação de milhões de cópias de uma sequência de interesse (Butler, 2012).

Para que este processo de amplificação possa ocorrer é necessário introduzir diversos componentes na reação, nomeadamente uma enzima termoestável Taq polimerase, $MgCl_2$ (cloreto de magnésio), *primers*, dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatados), uma solução tampão e o DNA alvo.

A PCR consiste na repetição de ciclos térmicos que envolvem o aquecimento e arrefecimento das amostras, estando dividido em 3 fases principais (desnaturação, *annealing* e extensão). Inicialmente, o DNA é exposto a uma temperatura de $\pm 94^\circ C$, ideal para a sua desnaturação, provocando a separação das cadeias que compõem a dupla hélice de DNA (Figura 7-1). Numa segunda fase, a temperatura diminui para $\pm 60^\circ C$ para que os *primers*, pequenas sequências sintéticas de DNA, se liguem à molécula alvo, flanqueando os segmentos de DNA a replicar (Figura 7-2). A última fase de cada ciclo é constituída pela extensão dos *primers* realizada com o auxílio da Taq polimerase. Esta enzima catalisa a adição dos nucleótidos no terminal 3' dos *primers*, utilizando a cadeia original como modelo, ou seja, a nova cadeia gerada base a base é complementar à cadeia alvo (Figura 7-3). Para que isso aconteça, é necessária uma temperatura ótima para a enzima, que se encontra, aproximadamente, nos $72^\circ C$. Deve realçar-se que os kits utilizados atualmente aglomeram os passos de *annealing* e de extensão num só.

A conjugação da técnica de PCR com a adição de fluorocromos aos *primers* utilizados permite a realização de PCR em *multiplex*, com a amplificação simultânea de múltiplos fragmentos de DNA, aumentando o poder de discriminação obtido com uma única amplificação (Butler, 2012; Goodwin *et al.*, 2011).

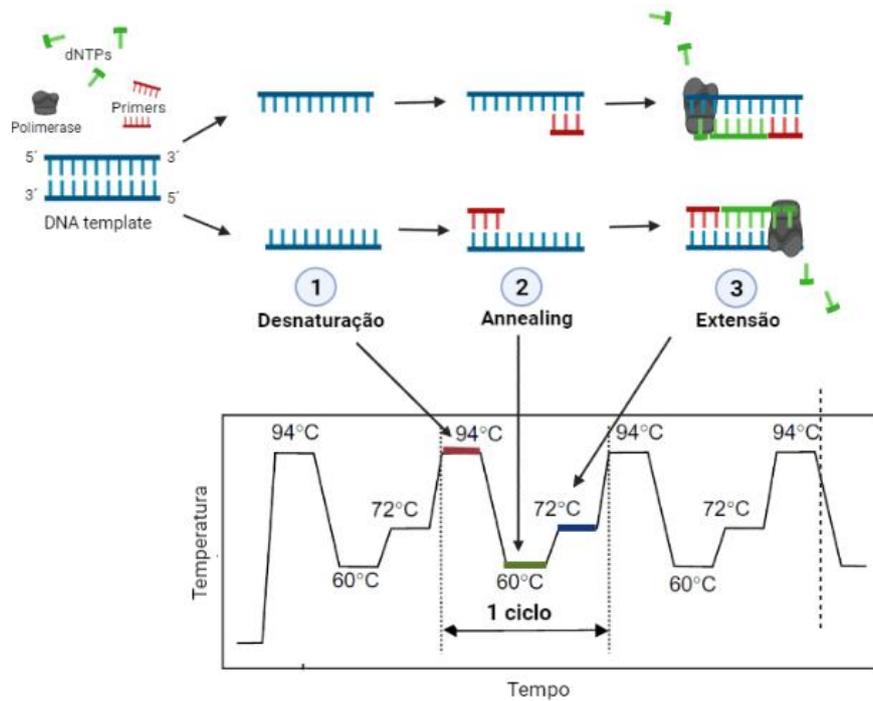


Figura 7. Fases dos ciclos térmicos da PCR: desnaturação da cadeia de DNA; annealing e extensão dos primers, juntamente com as temperaturas necessárias para que cada etapa ocorra. Adaptado de (Butler, 2010). Created with BioRender.com.

As amostras extraídas foram amplificadas utilizando o kit *GlobalFiler™ PCR Amplification* (ThermoFisher Scientific – AB) que permite amplificar 21 STRs autossômicos (D3S1358, D22S1045, D16S539, vWa, TPOX, D8S1179, D21S11, D2S441, CSF1PO, D19S433, FGA, D5S818, TH01, D7S820, SE33, D10S1248, D13S317, D1S1656, D12S291 E D2S1338), 1 Y-STRS (DYS291), 1 Y indel e o marcador determinante do sexo, a amelogenina (Applied Biosystems, 2020).

Antes de se iniciar a preparação das amostras, descontaminou-se com luz UV as DNA *workstations*, assim como todos os materiais utilizados. Tanto as amostras como os reagentes de amplificação foram colocados brevemente no vórtex e centrifugados de acordo com as instruções do fabricante. Preparou-se uma mistura de reação, de acordo com a tabela 5.

Tabela 5. Preparação das amostras para amplificação com o kit GlobalFiler (AB), conforme o protocolo.

GlobalFiler Master Mix (µL)	GlobalFiler Primer Set (µL)	DNA (µL)	Volume final (µL)
7.5	2.5	Variável, dependendo da quantificação	25

Adicionou-se o volume necessário desta mistura em cada poço da placa de amplificação, incluindo os controlos. De seguida, distribuiu-se DNA em cada poço (1 a 15 µL dependendo dos resultados da quantificação), perfazendo-se o volume com *low TE buffer*, caso seja necessário para manter o volume final constante (25 µL). As amostras foram amplificadas no termociclador Veriti™ (AB) utilizando o programa de amplificação recomendado e validado internamente (tabela 6) (Applied Biosystems, 2020; IT-SGBF-C-006, 2021).

Tabela 6. Programa de ciclos térmicos para o GlobalFiler™ PCR Amplification Kit. Adaptado de (Applied Biosystems, 2020).

Incubação inicial	29 ciclos		Extensão final	Último passo
	Desnaturação	Annealing/Extensão		
95°C 1 min	94°C 10 s	59°C 90s	60°C 10 min	4°C ∞

No fim do programa de amplificação, as amostras foram retiradas do termociclador e armazenadas a $-25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

3.4. Separação eletroforética e deteção dos fragmentos de DNA

A reação de PCR produz uma mistura de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos que representam diferentes alelos STR. Para os distinguir é necessário, não só separar os fragmentos, mas também ter um mecanismo que permita a sua deteção.

Atualmente, a eletroforese capilar é a técnica de separação e detecção dos alelos STR mais utilizada nos laboratórios forenses (Butler, 2010, 2012).

Previamente à aplicação no sequenciador automático *Applied Biosystems/Hitachi 3500 Genetic Analyzer*, preparou-se uma solução constituída por 9.5 µL de *Hi-Di™ Formamide* (*ThermoFisher – AB*) - solução desnaturante que mantém separadas as cadeias de DNA - e 0.5 µL de *GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0* (*ThermoFisher – AB*) constituído por fragmentos de DNA de tamanho conhecido. Foram distribuídos 10 µL desta mistura a cada poço e adicionado 1 µL de DNA amplificado, controlos amplificados ou *ladder* alélico (possui os alelos mais comuns de cada marcador, sendo específico para o *kit* de amplificação utilizado), assegurando um volume final mínimo de 10 µL por poço. Selou-se a placa com *septa* e verificou-se se existiam bolhas nos poços, centrifugando-se levemente caso existissem. As amostras foram desnaturadas colocando a placa num termociclador durante 3 min a 95°C, garantindo assim que as cadeias complementares de DNA continuavam separadas. Por fim, encerrou-se a placa nos suportes e colocou-se no sequenciador automático (IT-SGBF-C-005, 2020).

As amostras são introduzidas nos capilares através da aplicação de uma voltagem, processo denominado por injeção eletrocínética. Como os fragmentos de DNA são negativamente carregados num ambiente com pH neutro, devido ao seu grupo fosfato, uma voltagem positiva provoca a entrada das amostras para o capilar. Por força desta voltagem, os fragmentos de DNA deslocam-se no sentido do elétrodo positivo, afastando-se do elétrodo negativo. Cada capilar é preenchido por um polímero viscoso que funciona como um obstáculo para os fragmentos de DNA, separando-os de acordo com o seu peso molecular. Portanto, as moléculas de menor tamanho têm maior facilidade em movimentarem-se neste meio, deslocando-se mais rapidamente que os fragmentos de maior peso molecular.

Na zona terminal do capilar encontra-se embutida uma janela sobre o qual incide um raio laser que excita os fluorocromos contidos nos *primers* utilizados na PCR e que se encontram incorporados nos fragmentos amplificados que por aí passam. Ao excitar os fluorocromos, ocorre a emissão de fluorescência. As diferentes cores dos corantes são separadas pelo *3500 Series HID Data Collection Software v4.0.1* do equipamento, utilizando a calibração espectral que é necessária e específica para cada conjunto de fluorocromos. Os picos resultantes são identificados e associados à respetiva cor (figura 8). Portanto, gera-se um eletroferograma, cujos picos são apresentados como intensidade da fluorescência emitida pelos fragmentos em função do tempo de migração destes até atingirem a janela de detecção.

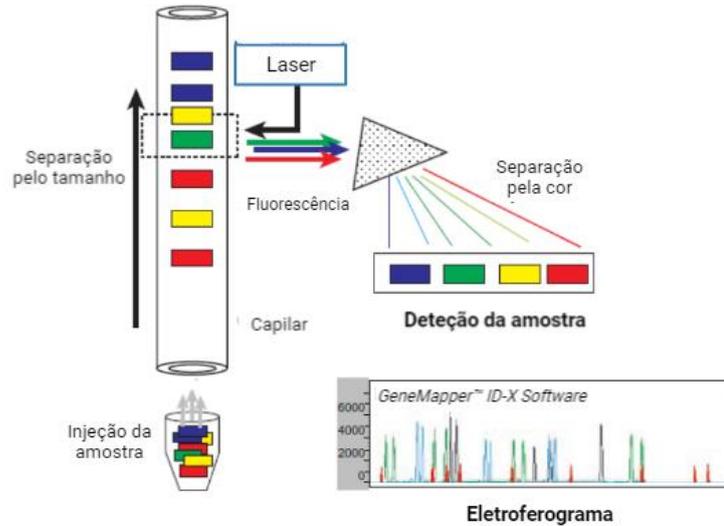


Figura 8. Esquema representativo da separação eletroforética e subsequente detecção dos fragmentos. Adaptado de (Butler, 2012).

Os fragmentos detetados são comparados com a curva de calibração do *size standard*, permitindo determinar o seu tamanho e a comparação com o *ladder alélico* permite identificar os diferentes alelos (figura 9). A análise dos eletroferogramas foi realizada utilizando o programa *GeneMapper™ ID-X Software v.1.6* (AB) (Butler, 2010, 2012).

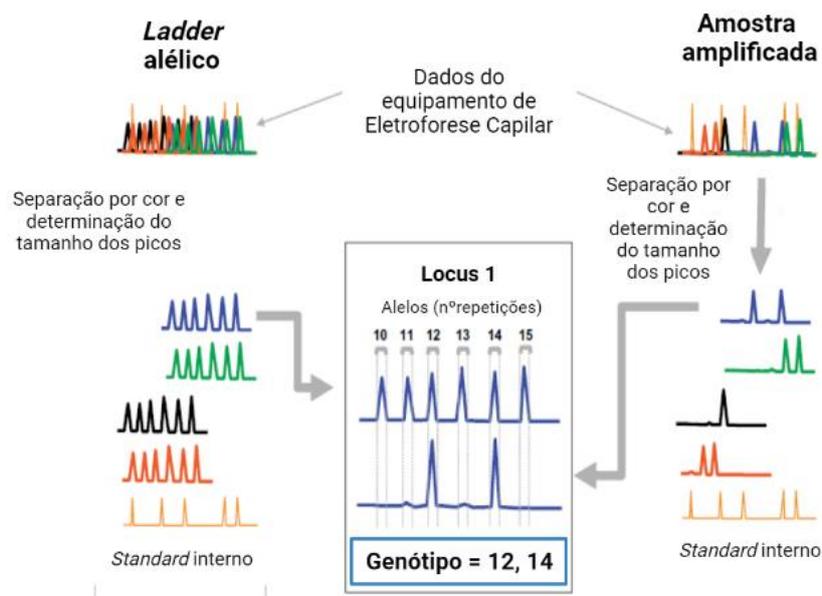


Figura 9. Representação ilustrativa da genotipagem, processo realizado através da comparação entre os resultados do ladder alélico e dos fragmentos anteriormente amplificados. Para que esta comparação possa ser feita, tanto os picos do ladder alélico como os da amostra devem medidos em relação ao mesmo standard interno. Adaptado de (Butler, 2012)

A quantificação das amostras recolhidas ao longo deste estudo forneceram concentrações baixas de *touch DNA*, insuficientes para prosseguir para amplificação. No entanto, algumas amostras apresentaram níveis superiores. Como exibiram resultados tão discrepantes dos restantes, deu-se seguimento ao procedimento laboratorial com o objetivo de obter perfis genéticos destas amostras e, assim, tentar determinar o que provocou as diferenças observadas. Portanto, pretende-se verificar a existência de perfis singulares pertencentes apenas a uma pessoa, o que seria de esperar, ou perfis de mistura pertencentes a mais do que um indivíduo. Isto é conseguido através da análise do número de alelos presentes em cada marcador, assim como a observação da proporção dos picos (Butler, 2010).

Os eletroferogramas obtidos a partir destas amostras foram avaliados de acordo com o procedimento de interpretação e validação de perfis genéticos seguido pelo SBGF-C (PO-SGBF-001, 2020). A análise foi realizada com um limiar de análise de 70 RFU (unidades de fluorescência relativa).

Um perfil, para ser considerado de mistura, deve cumprir, obrigatoriamente, dois requisitos, revelando a presença de dois contribuintes como mínimo, depois de eliminada a presença de eventuais contaminações (através da análise, por exemplo, de controlos negativos) e/ou artefactos (por exemplo, *stutters*, *drop-ins*, *pull-ups*):

- i. presença de mais do que dois alelos em dois ou mais *loci*;
- ii. significativo desequilíbrio alélico em, pelo menos, um *locus* heterozigótico.

O desequilíbrio na altura dos picos X e Y (Amelogenina) pode também ser um indicador da presença de uma mistura (nomeadamente no caso de misturas constituídas por contribuintes masculinos e femininos).

Os perfis genéticos das amostras amplificadas foram confrontados com os perfis de referência dos supostos contribuintes. Enfatiza-se que os perfis de referência já se encontravam disponíveis na base de dados do SBGF-C. Os alelos STR não concordantes com o perfil do voluntário que contribui para a amostra em questão foram considerados alelos *non-self* (exógenos), ou seja, pertencentes a um outro indivíduo.

4. Análise estatística

Numa primeira abordagem mais superficial, as concentrações de DNA inicialmente libertadas foram comparadas com os valores verificados após utilização da solução alcoólica nas mãos, recorrendo a percentagens como forma de tentar definir

uma tendência relativamente ao comportamento do indivíduo no que toca à deposição de DNA. Para que os resultados fossem mais perceptíveis, apresentaram-se as médias de concentração de DNA depositado de cada indivíduo juntamente com o seu desvio padrão.

Para entender a relevância das observações realizadas anteriormente e, assim, efetuar uma análise estatística avançada, utilizou-se o IBM® SPSS® 28.0.1 *software*. Aplicou-se o teste de variância simples (*one-way ANOVA*) de medidas repetidas comparando os níveis de DNA depositados entre os quatro *time points* estudados. A hipótese nula a testar é a de que não existem variações significativas entre as concentrações de DNA, o que significaria que a higienização das mãos com soluções alcoólicas não exerce influência na transferência de *touch DNA*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Escolha do substrato secundário e do método de recuperação de DNA

1.1. Substrato

Uma vez que, geralmente, apenas é possível recolher uma pequena quantidade de DNA a partir de amostras *touch*, achou-se necessário realizar um ensaio que envolvesse dois substratos disponíveis no laboratório (lâmina de vidro e espátula de madeira) para verificar onde se conseguiria recuperar níveis superiores de DNA e, de acordo com os resultados, escolher a melhor superfície para executar posteriores cenários de transferência.

Tabela 7. Níveis de *touch DNA* (ng/ μ L) detetados nas amostras depositadas pelos voluntários A e G em dois substratos secundários distintos: lâmina de vidro e espátula de madeira. Depois de uma primeira transferência de DNA (AT), os indivíduos desinfetaram as mãos e repetiram o processo de deposição (0 min).

Amostra	AT	0 min
A Madeira	0.0001	0.0001
G Madeira	0.0012	0.0002
A Vidro	0.0007	0.0004
G Vidro	0.0010	0.0028

Na deposição de *touch DNA* previamente à higienização das mãos, obtiveram-se valores de quantificação compreendidos entre 0.0001 e 0.0012 ng/ μ L, ambos os extremos obtidos em madeira. Após desinfetarem as mãos, os voluntários transferiram entre 0.0001 e 0.0028 ng/ μ L de DNA, em que o limite inferior corresponde à deposição na espátula de madeira e o superior, na lâmina de vidro (tabela 7).

O participante G parece transferir uma maior quantidade de DNA em ambos os substratos, o que pode ser devido ao seu *shedder status*. Todavia, como este ensaio é

realizado com dois voluntários e apenas uma vez para cada substrato, não é possível verificar uma tendência em depositar consistentemente maior ou menor quantidade de DNA. Adicionalmente, nenhuma das amostras apresenta DNA suficiente para prosseguir para amplificação e, por conseguinte, não permite avaliar o perfil genético.

Como não se observou resultados que permitissem concluir que existem diferenças na transferência de *touch DNA* dependentes da superfície onde é depositado, decidiu-se prosseguir o estudo com a lâmina de vidro como substrato, uma vez que há uma maior disponibilidade deste material no laboratório. Neste caso, o substrato secundário parece não influenciar a transferência de DNA, o que é incompatível com a observação de outros autores (Daly *et al.*, 2012; Fonneløp *et al.*, 2015). Contudo, o reduzido tamanho da amostra não permite fazer generalizações quanto à relação entre a quantidade de DNA recuperado e a superfície onde é depositado.

1.2. Método de recuperação

Pelos mesmos motivos explicados anteriormente, efetuou-se um outro ensaio para tentar concluir qual o melhor método para que a recuperação do DNA depositado na lâmina de vidro fosse o mais eficiente possível.

Tabela 8. Níveis de *touch DNA* (ng/μL) detetados nas amostras depositadas em lâminas de vidro pelos voluntários A e B. Indivíduo A utilizou apenas a mão dominante, enquanto que o indivíduo B utilizou a mão dominante (B#1) e não dominante (B#2). Os indivíduos transferiram o seu DNA antes de desinfetarem as mãos (AT), assim como 0 e 15 minutos após utilização de soluções alcoólicas.

Amostra	AT	0 min	15 min
A	0.0004	0.0002	0.0003
B#1	0.0014	0.0007	0.0066
B#2	0.0005	0.0003	0.0004

As amostras B#1 apresentaram melhores resultados em todos os tempos estudados. Já no segundo conjunto de amostras do participante B (B#2) detetou-se quantidades semelhantes às amostras do indivíduo A. Assim, neste ensaio, a deposição

de uma maior quantidade de DNA em B#1 pode não estar relacionada apenas com o *shedder status* do indivíduo B (tabela 8).

Um fator que poderia explicar as variações entre o primeiro e o segundo conjunto de valores do voluntário B é a utilização de mãos diferentes na transferência de DNA (dominante e não dominante, respetivamente). Contrariamente ao que Phipps e Petricevic observaram, a mão dominante do indivíduo B libertou maior quantidade de DNA, mesmo após desinfetar as mãos (Phipps *et al.*, 2007). Portanto, decidiu-se pedir aos voluntários que realizassem as transferências de DNA com a mão dominante, também como forma de estandardizar o design do próximo ensaio. Porém, o indivíduo A libertou quantidades exíguas de DNA, tal como as amostras B#2, mesmo colocando os dedos da mão dominante na lâmina de vidro, o que levanta dúvidas relativamente à influência da mão utilizada na transferência de DNA.

As amostras depositadas no primeiro (tabela 7) e segundo ensaio (tabela 8) exibem níveis de DNA semelhantes entre si, o que poderá indicar que o método de recuperação não influencia a quantidade de DNA detetada na superfície ou, alternativamente, a existência de um método mais eficiente que a zaragatoa húmida e a fita-cola. Esta dificuldade em encontrar a melhor técnica de recolha que recupere a maioria do *touch DNA* transferido estende-se à comunidade científica, apresentando resultados discordantes, devendo-se ter em consideração variabilidade inter-laboratorial e, até mesmo, inter-individual (Gosch *et al.*, 2019).

O valor mais elevado foi detetado no segundo ensaio, sendo aproximadamente duas vezes superior à quantidade máxima de DNA detetada no primeiro experimento, demonstrando ser uma técnica promissora para o subsequente ensaio. Portanto, decidiu-se utilizar fita-cola para recolher o material biológico transferido.

2. Higienização das mãos

2.1 Efeito imediato da higienização das mãos na libertação de *touch DNA*

Na primeira experiência (tabela 7), ao comparar com os resultados obtido numa primeira deposição (AT), tanto o indivíduo G como o A depositaram menos DNA na espátula de madeira e na lâmina, respetivamente, após desinfetarem as mãos. Nos

restantes cenários de transferência não se observou diferenças entre o antes (AT) e depois (0 minutos) da utilização da solução alcoólica (A_{Madeira}) ou então ocorreu um aumento do DNA depositado (G_{vidro}). Já no segundo ensaio (tabela 8), os resultados são mais uniformes, detetando-se sempre uma diminuição de DNA depositado após desinfecção das mãos, sendo mais notável nas amostras B#1. Portanto, na maioria das amostras depositadas nos primeiros dois ensaios já é possível observar uma tendência que é explorada neste experimento, numa escala superior, com um maior número de participantes e aplicando os conhecimentos retirados das experiências anteriores.

No primeiro evento de transferência deste terceiro ensaio (tabela 9), correspondente à deposição de DNA antes de desinfetar as mãos (AT), os níveis detetados variaram entre 0.0005 e 0.0118 ng/ μL (média – 0.0031 ng/ μL), o que corresponde a um intervalo de 0.025 a 0.59 ng nos 50 μL de volume final de amostra extraída. Este último valor mencionado, apresentado pela amostra A#3, é muito superior aos restantes, demonstrando ser cerca de 2 vezes superior ao segundo valor mais elevado. É de notar que, previamente ao início de cada sequência de eventos de transferência, a última vez que os indivíduos lavaram ou desinfetaram as mãos é desconhecida. Devido ao estado de pandemia, é normal que os participantes tenham mais cuidados higiénicos, havendo uma grande probabilidade de lavarem as mãos com mais frequência. Portanto, os valores iniciais podem já estar influenciados. As quantidades depositadas no momento AT podem também estar condicionadas por outras atividades, tal como o uso de luvas que diminui os níveis de DNA presentes nas mãos.

Imediatamente após utilização de solução alcoólica na desinfecção das mãos (0 min), os voluntários depositaram quantidades de DNA compreendidas entre 0.0005 e 0.0289 ng/ μL (média – 0.0029 ng/ μL), ou seja, um intervalo de 0.025 a 1,45 ng em 50 μL de amostra. O DNA quantificado na amostra F#3 (0.0289 ng/ μL) foi o valor mais elevado de todas as amostras e de todos os ensaios, sendo 6 vezes superior ao segundo valor mais elevado deste *time point*.

Tabela 9. Níveis de *touch DNA* (ng/ μ L) detetados nas amostras depositadas em lâminas de vidro pelos voluntários A-F. Os indivíduos transferiram o seu DNA antes de desinfetarem as mãos (AT), assim como 0, 15 e 60 minutos após utilização de soluções alcoólicas. Cada indivíduo realizou o mesmo procedimento em 3 dias diferentes, nas mesmas condições. Por apresentarem valores discrepantes, as amostras assinaladas seguiram para amplificação.

Amostra	AT	0 min	15 min	60 min
A #1	0.0016	0.0018	0.0024	0.0036
A #2	0.0032	0.0005	0.0019	0.0004
A #3	<u>0.0118</u>	0.0011	0.0053	0.0020
B #1	0.0014	0.0013	0.0005	0.0001
B #2	0.0005	0.0014	0.0039	0.0017
B #3	0.0022	0.0012	0.0096	0.0031
C #1	0.0019	0.0008	0.0014	0.0012
C #2	0.0015	0.0010	0.0007	0.0015
C #3	0.0019	0.0021	0.0019	0.0027
D #1	0.0010	0.0006	0.0007	0.0008
D #2	0.0017	0.0006	0.0042	0.0014
D #3	0.0009	0.0003	0.0018	0.0034
E #1	0.0047	0.0021	0.0013	0.0002
E #2	0.0052	0.0046	0.0018	0.0017
E #3	0.0048	0.0025	0.0041	0.0006
F #1	0.0015	0.0015	0.0008	0.0016
F #2	0.0017	0.0005	0.0006	0.0040
F #3	0.0075	<u>0.0289</u>	0.0014	0.0080

O indivíduo E destaca-se nestes dois momentos, depositando consistentemente maiores quantidades de *touch DNA* nos 3 replicados. Isto pode estar relacionado com a sua tendência individual de libertar DNA. No entanto, uma vez que liberta menores quantidades nos restantes tempos, é possível que estes valores iniciais reflitam uma atividade extrema em que o indivíduo recolheu mais material genético.

Examinando os resultados da quantificação constatou-se que em 13 das 18 amostras (72.22%) ocorreu uma diminuição da libertação de DNA depois dos voluntários desinfetarem as mãos. Este decréscimo também pode ser interpretado a partir da

comparação entre a média obtida no tempo AT (0.0031 ng/μL) e a média calculada após desinfecção das mãos (0.0029 ng/μL).

Apenas os participantes D e E manifestaram decréscimo entre os dois momentos de transferência, nos três replicados. O indivíduo F foi o mais inconstante, não exibindo diferenças na quantidade de DNA transferida para a lâmina no primeiro dia, apresentando um decréscimo no segundo dia e um aumento no terceiro dia. Os restantes depositaram menos DNA em dois dos replicados, aumentando a sua transferência num dos dias. Assim, a facto de ocorrer diminuição da libertação de *touch DNA* com a higienização das mãos é inconsistente tanto de indivíduo para indivíduo como entre os depósitos de cada voluntário.

Algumas das amostras, como a B#1, apresentam uma diminuição de transferência de DNA após higienização das mãos, mas esta diferença demonstrou ser mínima. Tal como era de esperar de amostras depositadas pelas mãos, detetaram-se níveis baixos de DNA, comparativamente a outros materiais biológicos analisados no laboratório. Este facto dificulta também a análise da disparidade entre os dois momentos de transferência de DNA, e conseqüentemente, a capacidade de chegar a uma conclusão definitiva quanto à influência das soluções alcoólicas na deposição de *touch DNA*.

Calculando a média da concentração de DNA determinada pelo RT-PCR, dos três dias em que se realizou as experiências, para cada indivíduo, verificou-se que B, C e D são os participantes que libertam, em média, menos DNA, tanto antes como depois de desinfetarem as mãos. No entanto, o indivíduo A transfere uma quantidade semelhante de DNA, relativamente aos voluntários referidos anteriormente, quando higieniza as mãos. O indivíduo F é o que deposita, em média, a maior quantidade de DNA, devido à amostra cedida no terceiro dia, após desinfetar as mãos (figura 10).

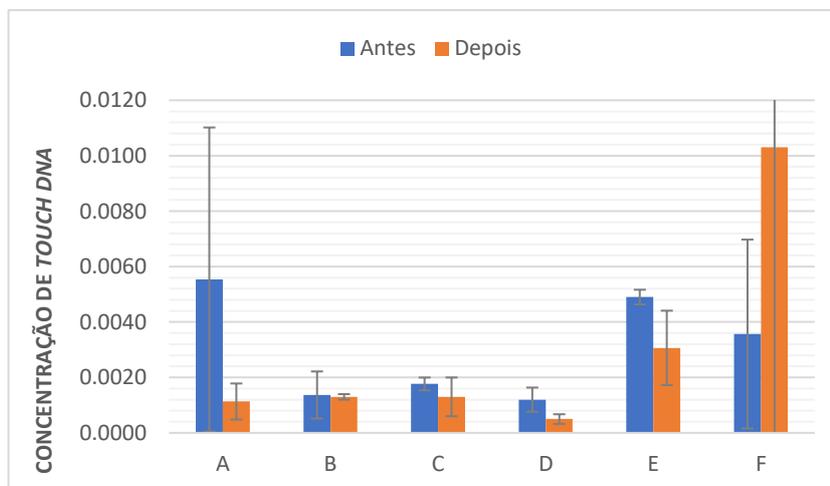


Figura 10. Concentração de *touch DNA* (ng/μL) calculada através da média dos resultados da quantificação dos 3 dias, juntamente com o desvio padrão. Este valor é determinado para cada voluntário, antes (AT) e depois (0min) da desinfecção das mãos.

Com exceção do indivíduo F, os voluntários transferem, em média, uma menor quantidade de DNA após higienização das mãos. O decréscimo de DNA transferido mais acentuado é visualizável no indivíduo A (A#3) o que poderá indicar que é mais influenciado pela desinfecção das mãos. Uma vez que os indivíduos B, C e D libertam uma menor quantidade de DNA, as diferenças entre o antes e depois também são menos perceptíveis que os restantes, especialmente no caso do voluntário B.

Apesar da tendência observada na figura 10 relativa à higienização das mãos, pode-se concluir que, em geral, todos os voluntários apresentaram uma certa variabilidade intra-individual relativamente aos níveis de DNA transferidos para a superfície, sendo mais proeminente nos indivíduos A e F. Portanto, os voluntários que apresentaram diferenças mais marcantes entre o antes e depois de utilização de solução alcoólica, são também os que libertaram níveis muito dispares de DNA num dos dias. Para se tentar determinar uma explicação para a sua quantificação e, conseqüentemente, perceber a relevância da desinfecção das mãos nestes casos, as amostras A#3 (AT) e F#3 (0 min) seguiram para amplificação.

2.2. Influência do tempo entre higienização das mãos e evento de transferência de *touch DNA*

No segundo ensaio (tabela 8), para além de se verificar a quantidade de DNA depositado imediatamente após desinfetar as mãos, aplicou-se um intervalo de tempo de 15 minutos para que o indivíduo transferisse novamente o seu DNA, detetando-se uma maior quantidade deste, relativamente às amostras no *time point* 0 minutos. No entanto, esta diferença é muito reduzida em A e B#2, não permitindo fazer generalizações quanto à evolução do DNA libertado. Assim, analisou-se os resultados do terceiro ensaio (tabela 9).

Após 15 minutos da higienização das mãos, os voluntários resumiram um novo momento de transferência de *touch DNA*. As quantificações resultantes deste evento apresentaram valores entre 0.0005 e 0.0096 ng/ μ L (média – 0.0025 ng/ μ L), que coincidem com um intervalo de 0.025 a 0.48 ng em 50 μ L de amostra extraída.

Em 11 amostras (61.11%) observou-se um aumento da deposição de DNA quando existiu um intervalo de tempo de 15 minutos entre a higienização das mãos e o momento de transferência, relativamente aos valores detetados imediatamente após desinfetá-las. No entanto, este aumento é mínimo nas amostras D#1 e F#2.

Analisando os resultados de cada indivíduo, consegue-se realizar algumas observações interessantes. Apesar da maioria das amostras exibirem um aumento de DNA, apenas os voluntários A e D depositaram maiores quantidades nos três replicados, enquanto B apenas demonstrou este aumento em dois dos dias. C, E e F apresentaram decréscimo dos níveis de DNA detetados em dois dias. Assim, existe uma variabilidade entre voluntários, assim como entre as deposições de cada indivíduo. Também ao apresentar os resultados num gráfico (figura 11), discriminando-os por voluntário, é possível concluir que o tipo de evolução que a concentração de DNA depositada exibe 15 minutos após utilização de desinfetante é inconstante.

Enquanto os indivíduos A, B e D libertaram, em média, uma maior quantidade de DNA passados 15 minutos comparado com os valores detetados imediatamente após desinfetarem as mãos, observou-se uma redução desta quantidade nos participantes E e F, sendo que este último apresenta um decréscimo bastante acentuado. Já o indivíduo C, em média, não apresentou diferenças assinaláveis.

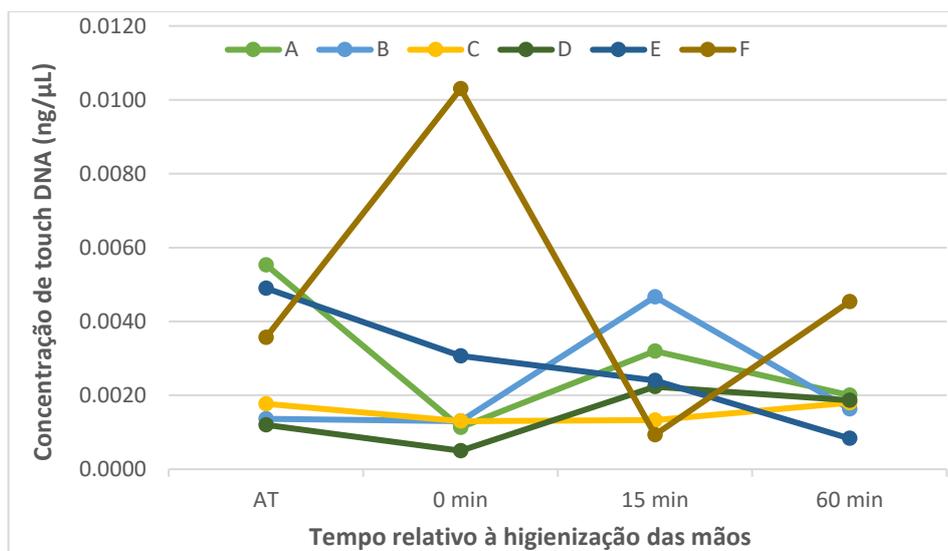


Figura 11. Concentração de DNA (ng/μL) calculada através da média dos resultados da quantificação dos 3 dias, depositada por cada voluntário nos time points AT, 0, 15 e 60 minutos.

Seguindo a classificação do tipo de *shedder* de Lowe e colaboradores (Lowe *et al.*, 2002), comparou-se os resultados entre os voluntários aos 15 minutos após higienização das mãos (tabela 9). No momento analisado, os indivíduos C e F parecem libertar consistentemente baixos níveis de DNA, contrariamente ao voluntário A que, ao longo dos 3 dias, transfere maiores quantidades de DNA relativamente aos outros indivíduos. Porém, os restantes voluntários demonstraram ser menos coerentes, como

é, por exemplo, o caso do indivíduo B que no segundo e terceiro dia transfere uma grande quantidade de DNA, mas no depósito do primeiro dia detetaram-se dos valores mais baixos para este tempo. Esta inconsistência evidencia a dificuldade de dividir as pessoas em *good*, *intermediate* ou *poor shedders* e que esta categorização poderá ser demasiado elementar, corroborando as conclusões realizadas noutros trabalhos (Phipps *et al.*, 2007).

Passados 60 minutos da utilização da solução alcoólica, os valores de DNA variaram entre 0.0001 e 0.0080 ng/ μ L (média – 0.0021 ng/ μ L), que corresponde a um intervalo de 0.005 a 0.4 ng em 50 μ L de amostra (tabela 9). Neste *time point* observou-se uma redução da quantidade de DNA detetada na superfície em 10 das 18 amostras (55.56%), relativamente aos valores determinados 15 minutos após desinfeção das mãos. Quando comparado com as concentrações de *touch DNA* detetadas aos 0 minutos, observou-se um aumento em 12 das amostras (66.67%). Em contraste com os valores iniciais, o comportamento dos indivíduos quanto à transferência de DNA aos 60 minutos é menos conclusivo, uma vez que cerca de metade das amostras exibiu valores superiores e outra metade, valores inferiores à quantidade apresentada antes da higienização das mãos.

Examinando a figura 11, 4 dos 6 participantes (A, B, D e E) exibiram, em média, uma redução de DNA transferido para a lâmina de vidro no *time point* 60 minutos. Os restantes depositam mais material biológico, relativamente à deposição anterior. O voluntário F é o que deposita, em média, maior quantidade de *touch DNA*, tanto aos 60 minutos como aos 0 minutos. No entanto, é o que liberta menos DNA 15 minutos após desinfetar as mãos. O participante C é constante na quantidade de DNA transferida, apresentando apenas uma pequena variação ao minuto 60. Os indivíduos A, B e C apresentam médias muito semelhantes no minuto 0, o que também ocorre no minuto 60, com a adição do voluntário D.

Tal como acontece nos tempos anteriormente analisados, existe uma certa variabilidade inter e intra-individual. Assim, levanta-se a hipótese da impossibilidade de prever o comportamento do indivíduo relativamente à quantidade de DNA transferido, independentemente do tempo entre a utilização de soluções alcoólicas.

2.3. Relevância dos resultados

Realizou-se um teste de variância simples (*one-way ANOVA*) de medidas repetidas com o objetivo de testar a hipótese nula de que não existem diferenças entre as concentrações de DNA transferidas pelos indivíduos entre os *time points* estudados, avaliando assim a influência da higienização das mãos na libertação de DNA. Os resultados da ANOVA: Lambda de Wilks=0.885, $F(3,15)=0.650$, $p=0.595$, permitem aceitar a hipótese nula.

As primeiras investigações que incidem neste tema, sugerem que a lavagem das mãos tem um impacto na transferência de DNA (Lowe *et al.*, 2002; Phipps *et al.*, 2007). Em oposição a estes autores e em concordância com os resultados gerados neste trabalho, Goray e colaboradores, assim como Szkuta e colaboradores não observaram diferenças significativas na quantidade de *touch DNA* libertado, independentemente do intervalo de tempo entre a utilização de soluções alcoólicas e a transferência de DNA (Goray *et al.*, 2016; Szkuta *et al.*, 2017). Assim, as diferenças descritas anteriormente podem não estar necessariamente relacionadas com o desinfetante. Como existe uma diversidade de fatores capazes de afetar o processo de transferência, torna-se impossível apontar uma variável em específico, neste estudo, que influencie a deposição de material genético, até porque pode ser afetada por vários fatores em simultâneo. Um dos fatores mais prováveis são as atividades realizadas pelos voluntários. Como foi referido anteriormente, no intervalo de tempo entre cada transferência, as tarefas executadas pelos indivíduos não são controladas, podendo certas atividades resultar no aumento e outras na redução de DNA nas mãos, afetando a quantidade de DNA depositado na superfície em cada *time point*.

3. Níveis de DNA

Algo comum a todas as amostras são os baixos níveis de *touch DNA* recuperados, observação que está em concordância com a maioria dos trabalhos que incidem neste tipo de amostras.

A quantidade ótima de DNA para obter perfis analisáveis encontra-se entre os 0.5-1 ng nos 15 μL adicionados na reação. Num estudo de validação interna concluiu-se que uma concentração de DNA de 0.04734 ng/ μL é o valor mínimo capaz de gerar perfis

completos, excluindo assim todas as amostras recolhidas. Independentemente da conclusão efetuada neste estudo sobre a higienização das mãos, a sua influência na deposição de DNA parece não ser o maior problema na recuperação de *touch DNA*.

Existem várias explicações possíveis para a deteção de valores tão reduzidos. Primeiramente, é necessário entender que existem diversos fatores que afetam a transferência de DNA, aos quais se adiciona os diferentes designs experimentais e métodos de processamentos das amostras seguidos em cada laboratório, explicando as variações que são detetadas entre estudos. O próprio método de quantificação do DNA não oferece valores reproduzíveis, ou seja, repetindo RT-PCR para a mesma amostra, não se obteriam exatamente os mesmos valores apresentados na primeira quantificação. Para além disso, os níveis detetados podem não representar os valores reais recolhidos, uma vez que existe a possibilidade de ocorrer uma perda de DNA durante o processo de extração.

Pensado apenas no processo de transferência, os resultados obtidos podem ser justificados pela realização de apenas um contacto com a superfície, o que vai de encontro com a teoria de que um contacto único provoca a libertação de um reduzido número de células, traduzindo-se na recuperação de baixos níveis de *touch DNA* (Meakin *et al.*, 2013). Portanto, o contacto múltiplo com os itens pode ser um critério essencial para detetar níveis superiores de DNA, ocorrendo um aumento de DNA depositado na superfície após cada contacto, como previamente descrito (Gosch *et al.*, 2019). Alternativamente, os baixos níveis de DNA podem indicar o manuseamento de vários itens previamente ao momento da transferência, uma vez que é possível que os voluntários tenham tocado noutras superfícies antes de depositar o seu material no substrato utilizado no estudo, tendo menos DNA disponível nas mãos. Sendo o estudo desenvolvido num laboratório forense, é bastante provável que os voluntários tenham utilizado luvas antes de iniciarem as experiências, assim como nos intervalos de tempo aplicados, tendo transferido o seu DNA para o lado interior deste material, estando de acordo com as observações de Goray e colaboradores (Goray *et al.*, 2016). Portanto, a recuperação de baixos níveis de DNA pode estar relacionado com contacto limitado com a superfície ou com o contacto prévio com outros objetos.

Para além disso, tal como referido anteriormente, a presença de DNA nas mãos já pode estar condicionada pela frequente higienização das mãos (Burrill *et al.*, 2019; van Oorschot *et al.*, 2019). Também o reduzido tamanho da amostra pode não ser representativo da população, uma vez há a possibilidade de todos indivíduos que participaram neste estudo serem *poor shedders*, libertando quantidades reduzidas de *touch DNA*.

Como se pode observar, os valores apresentados podem depender de diversas variáveis, sendo muito difícil orquestrar o ambiente perfeito para que se consiga obter níveis razoáveis de *touch DNA*. Esta dificuldade aumentará drasticamente num ambiente não controlado, em contexto forense. Isto leva a questionar a verdadeira utilidade da recuperação do DNA presente em objetos manuseados. Talvez a tentativa de recolher *touch DNA* seja mais rentável quando não existem outros vestígios visíveis, tal como defenderam certos investigadores (Ostojic *et al.*, 2017; Sessa *et al.*, 2019).

4. Níveis de degradação e IPC

A avaliação do nível de degradação das amostras de *touch DNA* foi possível através da utilização do *kit Quantifiler™ Trio*. Como referido anteriormente, este kit deteta e amplifica dois alvos autossómicos denominados de *Small Autosomal (SA)* e *Large Autosomal (LA) targets*.

O alvo LA é utilizado para analisar a qualidade do DNA, uma vez que a degradação do DNA dificulta a análise de fragmentos maiores, provocando uma diminuição do resultado de quantificação do alvo LA. Como o índice de degradação (DI – do inglês *Degradation Index*) é obtido através da razão entre os resultados de quantificação do alvo SA e alvo LA, o valor de DI pode ser influenciado pela degradação do DNA.

Quando se analisa os resultados da quantificação deve-se não só observar a concentração de DNA, mas também o nível de degradação das amostras. Isto porque, para amostras com a mesma concentração, um aumento de DI corresponde a uma diminuição da qualidade do num perfil genético. Tendo esta ideia em mente, pode-se escolher uma quantidade de DNA apropriada para aplicar na amplificação e, assim, tentar ultrapassar o efeito da degradação.

Para além da degradação do DNA, o DI pode também refletir a existência de inibidores da reação PCR, uma vez que a presença de impurezas no extrato de DNA afeta primeiro o alvo LA. Uma vez que os fragmentos maiores não conseguem amplificar com a mesma facilidade que os fragmentos de menor tamanho devido aos inibidores, a inibição poderá ser confundida pela degradação. Assim, para avaliar a qualidade do

DNA de interesse é necessário estudar simultaneamente o índice de degradação e o valor de IPC.

Neste caso em concreto, um dos inibidores possíveis seria a própria fita-cola utilizada para recolher o material depositado na superfície. Ao longo de todos os ensaios, o IPC apresentou valores rondando os 27 ciclos, encontrando-se dentro da margem expectável para as concentrações de DNA detetadas. Assim, confirmou-se a ausência deste ou outros inibidores da reação de PCR no conjunto de amostras, assim como a correta funcionalidade de todos os componentes da reação.

Focando no índice de degradação das amostras recolhidas no terceiro ensaio (tabela 10), as que exibem um valor inferior a 1 têm uma concentração de sonda de maior tamanho semelhante à mais pequena, o que significa que não estão degradadas nem inibidas. No entanto, a maioria das amostras quantificadas neste trabalho apresentam um valor de DI compreendido entre 1 e 10, indicando que o DNA apresenta um nível de degradação moderado. Neste caso, a inibição de PCR é possível, mas não o suficiente para afetar a amplificação do IPC. Nas amostras em que o índice de degradação é superior a 10 ou está representado pelo símbolo ↑↑↑, o DNA está significativamente degradado. Novamente, é possível que tenha ocorrido inibição da reação, o que não impediu a amplificação do IPC.

Tabela 10. Índices de degradação obtidos durante o processo de quantificação do DNA, calculados a partir da razão entre a concentração de DNA do alvo SA e a concentração do alvo LA. Estes valores podem refletir a degradação do DNA analisado ou a presença de inibidores da reação PCR.

Amostra	AT	0 min	15 min	60 min
A #1	1.8328	1.3185	3.1043	2.1690
A #2	9.3229	1.1548	4.4253	1.7261
A #3	1.0798	0.8183	1.6884	1.3847
B #1	3.2033	82.6215	1.4941	1.0070
B #2	↑↑↑	2.9509	1.2917	1.6229
B #3	1.4659	0.9821	2.1006	2.1715
C #1	2.8341	1.0899	1.9983	1.1728
C #2	5.7984	1.8557	1.0658	4.1558
C #3	1.3282	3.2130	2.2559	1.1979

(continuação da tabela 10)

Amostra	AT	0 min	15 min	60 min
D #1	1.3162	1.0196	0.5812	0.8429
D #2	0.9267	3.7483	0.8238	2.5662
D #3	1.0242	3.7810	0.5631	1.3116
E #1	1.0660	1.3836	4.5005	↑↑↑
E #2	1.1048	1.9628	1.2555	1.8657
E #3	1.2627	1.5411	1.3515	3.0496
F #1	1.7994	2.6199	2.0965	2.1690
F #2	1.7749	0.9173	1.5314	2.6296
F #3	0.9249	2.0127	2.1207	2.7499

Uma grande porção das amostras apresentou um índice de degradação superior a 1, confirmando as observações de *touch DNA* degradado de algumas investigações (Olewi *et al.*, 2015). Esta degradação foi também observada em depósitos produzidos imediatamente depois da higienização das mãos o que poderá indicar que o DNA é fragmentado no corpo, como é o caso de cfDNA, tal como conjecturaram Burrill e colaboradores (Burrill *et al.*, 2019).

Contudo, os valores de degradação apresentados na quantificação podem não estar necessariamente relacionados com a degradação do *touch DNA* em si, mas sim com os níveis de DNA detetados. Isto é, como é recuperado uma quantidade tão baixa de DNA, a sonda de maior tamanho pode não conseguir ligar tão eficazmente ao segmento alvo, afetando assim o DI.

Sendo este um estudo realizado num ambiente controlado não é necessário ter certas preocupações que se tem num caso criminal real. Enquanto que a degradação verificada nas amostras deverá estar relacionada com fatores intrínsecos ao indivíduo, os vestígios depositados pelo perpetrador num local do crime estão também sob a influência das condições ambientais, tais como a humidade, temperatura, exposição à luz UV, chuva e vento, capazes de degradar o DNA.

Ao confrontar os índices de degradação do DNA depositado antes (AT) e depois (0 minutos) dos indivíduos desinfetarem as mãos, não se verificou uma relação entre diminuição/aumento da quantidade de DNA transferido e o seu nível de degradação. O

mesmo se observou com o passar do tempo entre a utilização da solução alcoólica e a transferência. Para além de se detetar variação de degradação do DNA entre indivíduos, também se averiguou diferenças na evolução da degradação entre os depósitos de cada indivíduo, com exceção do voluntário E que demonstrou transferir DNA com maior nível de degradação após desinfeção das mãos, que coincidiu com uma diminuição de DNA depositado. As amostras que apresentaram níveis discrepantes de DNA não exibiram um índice de degradação superior a outras amostras com menores quantidades de DNA. Todas as observações referidas indicam que as soluções alcoólicas parecem não afetar a qualidade do DNA libertado.

Para retirar conclusões mais concretas relativamente à degradação, seria necessário analisar os perfis genéticos associados, uma vez que a sua qualidade diminui com o aumento da degradação.

5. Amostras amplificadas

É comum as amostras constituídas por *touch DNA* não possuírem quantidades que atinjam o valor mínimo requerido por cada laboratório para realizar a amplificação. O mesmo problema ocorre ao longo deste trabalho. Todavia, duas das amostras exibiram concentrações discrepantes relativamente às restantes, optando-se por prosseguir com o procedimento laboratorial com o intuito de entender se este aumento de DNA deve-se apenas à contribuição do voluntário responsável pela transferência ou se se detetam alelos *non-self* provenientes de outros indivíduos.

Ao examinar o perfil genético gerado a partir da amostra do indivíduo A (tabela 11), observou-se que certos *loci* estudados são compostos apenas pelos alelos do voluntário em questão. No entanto, também se detetou a presença de alelos *non-self* em 8 dos 21 marcadores. Destes 8, apenas 1 *locus* exibiu um dos alelos do voluntário A como minoritário. Nos restantes, o alelo *non-self* foi categorizado como minoritário, à exceção do marcador D1S1656 em que os picos dos alelos *self* e *non-self* demonstraram ser de altura semelhante. Assim, concluiu-se que o perfil da amostra A#3 (AT) tem como contribuinte maioritário o voluntário A.

Tabela 11. Comparação dos alelos detetados na amostra A#3 (AT) com o perfil genético de referência do indivíduo que participou no estudo – voluntário A. O sinal “<” é utilizado para expressar o desequilíbrio alélico observado em determinado locus.

Locus	Alelos observados	Alelos esperados
D3S1358	14,16<	14,16
vWA	16<, 17	17
D16S539	9,11	9,11
CSF1PO	11	11
TPOX	8	8
AMEL	X	X
D8S1179	10,13	10,13
D21S11	29<, 30, 31	30,31
D18S51	13<,14,16	14,16
D2S441	11,14	11,14
D19S433	12<,13,15<	13,15
TH01	8,9<,9.3	8,9.3
FGA	20,22	20,22
D22S1045	14,15<,16	14,16
D5S818	11,13	11,13
D13S317	10,11<,13	10,13
D7S820	8,9	8,9
D10S1248	12,15	12,15
D1S1656	14,16.3,17.3	14,17.3
D12S391	17,21	17,21
D2S1338	17,20	17,20

Estudando o perfil obtido da amostra F#3 (0 min), dos marcadores disponíveis para comparação, apenas um é constituído exclusivamente por alelos do indivíduo F (tabela 12). Os restantes possuem um ou mais alelos *non-self*, sendo que em 11 dos 22 marcadores comparados, pelo menos um dos alelos do voluntário F foi considerado minoritário. Em alguns dos marcadores, os picos dos alelos *non-self* apresentaram altura semelhante aos alelos pertencentes ao voluntário, sugerindo que os indivíduos contribuíram na mesma proporção. Adicionalmente, o marcador da amelogenina exibiu um desequilíbrio marcante relativamente à altura dos picos X e Y, que indica a presença

de componente feminino e masculino, confirmando a existência de mais do que um contribuinte para a amostra.

Tabela 12. Comparação dos alelos detetados na amostra F#3 (0 minutos) com o perfil genético de referência do indivíduo que participou no estudo – voluntário F. O sinal “<” é utilizado para expressar o desequilíbrio alélico observado em determinado locus.

Locus	Alelos observados	Alelos esperados
D3SS1358	14,16<	15,16
vWA	16,17	14,17
D16S539	11,12	9,11
CSF1PO	10,11,12	10,11
TPOX	8	8,11
AMEL	X,Y<	X,Y
D8S1179	12<,13,15<	12,14
D21S11	27,30<,30.2	28,30
D18S51	13,14	14,16
D2S441	11, 11.3<, 13<, 14, 15<	11.3,13
D19S433	12, 13<, 14, 15<	13
TH01	9,9.3	9, 9.3
FGA	19, 21<, 24<, 26	19,24
D22S1045	15<, 16	16
D5S818	11,12	11
D13S317	11, 12<, 13<	13
D7S820	9,11<	11
SE33	13<,20,28.2	13,18
D10S1248	14<,15	13,16
D1S1656	12,15<,15.3<,16.3	15
D12S391	20,21	21
D2S1338	19,23	17,24

Portanto, apesar de ter sido o voluntário F a participar nos cenários de transferência realizados ao longo deste estudo, não se apresentou como o contribuinte maioritário na amostra. Tal como defendiam Szkuta e colaboradores, numa mistura, o

shedder status pode influenciar o perfil genético gerado (Szkuta *et al.*, 2017). Portanto, os restantes indivíduos que contribuíram para amostra podem ser melhores *shedders* que o participante, mascarando o perfil deste.

Conclui-se que as amostras A#3 (AT) e F#3 (0 min) apresentam perfis de misturas, visto que em muitos dos *loci* estavam presentes mais do que 2 alelos. Para além disso, exibem um desequilíbrio alélico superior a 50% em pelo menos 1 locus heterozigótico. Neste tipo de perfis, quanto maior o número de indivíduos que contribuem para a amostras depositada, maior é a complexidade da análise dos eletroferogramas.

Para estimar o número mínimo de contribuintes de ambos os perfis de mistura, analisou-se o marcador com o maior número de alelos. No *locus* D2S441, a amostra do indivíduo F tem 5 alelos, logo pelo menos 3 indivíduos contribuíram para a mistura. Esta conclusão é também suportada pela visualização de um desequilíbrio significativo entre os alelos X e Y. Quanto à amostra depositada pelo voluntário A, vários STRs exibem 3 alelos, ou seja, pelo menos 2 indivíduos participaram na formação da amostra. Contudo, ao amplificar amostras com baixos níveis de DNA, é normal o aparecimento de certos fenómenos nos perfis genéticos derivados de efeitos estocásticos, dificultando assim a avaliação do número de contribuintes do perfil.

Neste tipo de amostras, o efeito estocástico ocorre uma vez que os *primers* utilizados na amplificação de uma determinada sequência podem não encontrar e hibridizar consistentemente todo o conjunto de moléculas de DNA presentes na reação. Num *locus* heterozigótico pode manifestar-se na perda de um (*allele drop-out*) ou ambos os alelos (*locus drop-out*). Em perfis de mistura, cada contribuinte da amostra apresenta ainda uma menor quantidade, sendo os efeitos estocásticos ainda mais severos, tornando a análise do perfil mais desafiante (Butler, 2012). Portanto, o efeito estocástico com *allele drop-out* pode explicar o perfil do indivíduo F, em que em alguns dos marcadores, apenas se deteta um dos alelos deste voluntário, especialmente por ser componente minoritário da amostra. Em ambos os perfis é também possível observar vários picos, geralmente denominados por *stutter*, também derivados de efeitos estocásticos.

Sendo este um estudo controlado, na medida em que se sabe que apenas os voluntários indicados anteriormente tocaram na superfície e que se seguiu todas as normas do laboratório para evitar contaminações das amostras, a presença de alelos *non-self* levanta a questão de como este DNA foi depositado na lâmina de vidro.

A primeira anotação que deve ser feita é o desconhecimento das atividades realizadas pelos voluntários, quer previamente ao início dos ensaios, quer nos intervalos de tempo entre cada transferência. Assim, não podemos descartar a possibilidade dos participantes terem interagido com outros indivíduos ou manuseado outros objetos com

DNA exógeno, funcionando como um intermediário na deposição de *non-self* DNA, ocorrendo um evento de transferência indireta.

No entanto, existe a possibilidade de ter ocorrido contaminação destas amostras. Apesar de serem expostas a luz UV antes de iniciar os ensaios, as lâminas utilizadas não sofrem qualquer tipo de tratamento especial de limpeza. Para além disso, este material encontra-se numa embalagem com várias outras lâminas que são utilizadas pelos colaboradores do serviço para o procedimento laboratorial de rotina, sendo possível que estes tenham tocado nas lâminas, conseqüentemente transferindo o seu DNA. Logo, a superfície de contacto poderia ter *background DNA* depositado. A contaminação poderá ter ocorrido noutros momentos, como na própria recolha das amostras, durante o processo de extração ou durante a quantificação. Os controlos negativos realizados durante a extração e quantificação destas amostras produziram resultados apropriados. Portanto, a contaminação das amostras não é derivada dos reagentes presentes nos *kits*.

É impossível saber quais dos fenómenos foi o responsável pelos valores detetados nas amostras amplificadas. No entanto, há uma maior probabilidade de se tratar de contaminação, especialmente no caso do voluntário F, que depositou o seu material imediatamente após desinfetar as mãos.

Numa situação real, os itens de onde se recolhem amostras para análise possuem um historial de manuseamento muito mais rico do que aqueles que são utilizados em cenários de transferência realizados num laboratório, podendo ser constituídos por uma grande variedade de fontes de DNA. A verdade é que, mesmo tendo ganho popularidade devido ao aumento da sensibilidade das técnicas utilizadas em Genética Forense, a análise do *touch DNA* poderá também ser dificultada graças a este progresso técnico-científico, uma vez que facilita a deteção de DNA de componentes minoritários de amostras mistura, quer sejam provenientes de contaminação, transferência indireta ou *background DNA* existente na superfície.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Conclusões

A pertinência do *touch DNA* como uma nova ferramenta de identificação de perpetradores implica a investigação de todos os aspectos relacionados com este assunto. Assim, a recente popularidade das soluções alcoólicas em consequência da pandemia indica que é crucial estudar o seu efeito na deposição deste tipo de amostras.

Analisando os resultados obtidos no terceiro ensaio conclui-se que as quantidades de DNA depositadas pelos indivíduos posteriormente à desinfecção das mãos não diferiram significativamente dos valores detetados num primeiro momento de transferência. O mesmo se verificou ao comparar com os valores gerados 15 e 60 minutos depois da aplicação da solução alcoólica nas mãos. Portanto, a higienização das mãos parece não influenciar a transferência de *touch DNA*.

Contudo, as amostras exibiram outros problemas que despertaram curiosidade. Nos ensaios realizados ao longo deste estudo recuperou-se baixas quantidades de *touch DNA*, muitas vezes insuficientes para prosseguir com o procedimento laboratorial e obter perfis genéticos de boa qualidade, mesmo tentando controlar certos fatores com o intuito de maximizar as concentrações de DNA quantificadas. Portanto, será mais escasso o número de amostras com elevada quantidade de DNA, num contexto forense.

Para além da quantidade exígua de DNA presente, verificou-se que algumas das amostras analisadas apresentavam um índice de degradação aumentado. Contudo, este mesmo índice não sofreu alterações notáveis relacionadas com a utilização da solução alcoólica. Estando num ambiente controlado, esta degradação será derivada de processos que ocorrem no próprio DNA. Numa situação real de crime, à degradação natural do *touch DNA* junta-se a degradação provocada pelas condições ambientais desfavoráveis para a qualidade do DNA recuperado.

Ao longo deste estudo, procurou-se ter sempre os cuidados máximos para prevenir a inserção de DNA exógeno, utilizando-se material protetor e descontaminando o ambiente e os materiais com luz UV. Apesar dessa preocupação, detetaram-se alelos *non-self* nas amostras amplificadas, possivelmente derivados de contaminação. Isto porque, com o aumento da sensibilidade das técnicas utilizadas atualmente em Genética Forense é muito mais fácil detetar DNA de outras origens não relacionadas com o crime, especialmente quando se analisa *touch DNA*.

Todas estas observações levam a questionar a relevância da recolha de amostras de *touch DNA* no contexto forense, uma vez que é necessário ter um cuidado redobrado

e aplicar certas ferramentas para obter perfis genéticos que podem nem ter valor probatório no caso das amostras serem depositadas inocentemente.

2. Perspetivas futuras

Apesar de ter sido descoberto no final dos anos 90, ainda muito se desconhece sobre o *touch DNA*. Mesmo certos tópicos que são explorados mais frequentemente, como o *shedder status*, ainda apresentam resultados contraditórios. Portanto, é essencial o contínuo e aprofundado estudo de todos os temas que envolvem este tipo de amostras.

O primeiro passo no desenvolvimento de futuros estudos será a determinação de metodologias de recuperação, armazenamento e análise mais indicadas para amostras constituídas por *touch DNA*. A uniformização da utilização destes métodos em investigações deste género poderá facilitar a comparação dos seus resultados, permitindo adquirir respostas mais conclusivas.

O reduzido número de voluntários que participam neste estudo pode não ser uma representação fiel da população, limitando assim a análise dos resultados obtidos. Por isso, sugere-se a realização de novos estudos que possuam condições e utilizem métodos de colheita e processamento semelhantes a este, mas com um número superior de participantes.

Uma vez que os estudos que incidem no efeito da higienização das mãos na transferência de DNA, incluindo o trabalho em questão, apresentam conclusões discordantes, é necessário um melhor entendimento deste tema, tanto no que toca à quantidade como qualidade de *touch DNA* libertado para a superfície. Outros fatores deverão ser investigados, tais como a acumulação natural de DNA nas mãos após lavagem, os diversos métodos de higienização, as diferentes rotinas dos indivíduos e como estas podem afetar a acumulação de *self* ou *non-self* DNA nas mãos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akutsu, T., Watanabe, K., Takamura, A., & Sakurada, K. (2018). Evaluation of skin- or sweat-characteristic mRNAs for inferring the human origin of touched contact traces. *Legal Medicine*, 33, 36–41. doi: 10.1016/j.legalmed.2018.05.003
- Alessandrini, F., Cecati, M., Pesaresi, M., Turchi, C., Carle, F., & Tagliabracci, A. (2003). Fingerprints as Evidence for a Genetic Profile: Morphological Study on Fingerprints and Analysis of Exogenous and Individual Factors Affecting DNA Typing. In *J Forensic Sci* (Vol. 48, Issue 3). Retrieved from www.astm.org
- Alketbi, S. K. (2018). *The Affecting Factors of Touch DNA*. 9(3). doi: 10.4172/2157-7145.1000424
- Altayari, W. (2016). DNA Extraction: Organic and Solid-Phase. In W. Goodwin (Ed.), *Forensic DNA Typing Protocols* (2ª Edição, Vol. 1420, pp. 55–68). New York, NY: Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4939-3597-0
- Applied Biosystems. (2017). *User Guide: PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits*. Warrington, Cheshire, UK.
- Applied Biosystems. (2018). *User Guide: Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits*. Woolston, Warrington, UK.
- Applied Biosystems. (2020). *User Guide: GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit*. Woolston, Warrington, UK.
- Aşır, S., Türkmen, D., & Topçu, A. A. (2016). DNA Purification by Solid Phase Extraction (SPE) Methods. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 3(44), 259–259. doi: 10.15671/HJBC.20164420568
- Balk, C. (2015). Reducing Contamination in Forensic Science. *Themis: Research Journal of Justice Studies and Forensic Science*, 3(1). doi: 10.31979/themis.2015.0312
- Balogh, M. K., Burger, J., Bender, K., Schneider, P. M., & Alt, K. W. (2003). Fingerprints from fingerprints. *International Congress Series 1239*, 953–957.
- Bowman, Z. E., Mosse, K. S. A., Sungaila, A. M., van Oorschot, R. A. H., & Hartman, D. (2018). Detection of offender DNA following skin-to-skin contact with a victim. *Forensic Science International: Genetics*, 37, 252–259. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.09.005

- Bright, J. A., & Petricevic, S. F. (2004). Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Science International*, 145(1), 7–12. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.03.016
- Burrill, J., Daniel, B., & Frascione, N. (2019). A review of trace “Touch DNA” deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. In *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 39, pp. 8–18). Elsevier Ireland Ltd. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.11.019
- Butler, J. M. (2010). *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (1ª Edição). Amsterdam, Netherlands: Academic Press/Elsevier.
- Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (1ª Edição). San Diego, California, USA: Academic Press/Elsevier.
- Cale, C. M. (2015). Forensic DNA evidence is not infallible. *Nature*, 526(7575), 611–611. doi: 10.1038/526611a
- Cale, C. M., Earll, M. E., Latham, K. E., & Bush, G. L. (2016). Could Secondary DNA Transfer Falsely Place Someone at the Scene of a Crime? *Journal of Forensic Sciences*, 61(1), 196–203. doi: 10.1111/1556-4029.12894
- Daly, D. J., Murphy, C., & McDermott, S. D. (2012). The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 41–46. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.12.016
- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020). *Forensic Trace and Touch DNA Analysis* (pp. 305–311). doi: 10.1007/978-1-0716-0274-4_32
- Dziak, R., Peneder, A., Buetter, A., & Hageman, C. (2018). Trace DNA Sampling Success from Evidence Items Commonly Encountered in Forensic Casework. *Journal of Forensic Sciences*, 63(3), 835–841. doi: 10.1111/1556-4029.13622
- Ehrhardt, C. J., Stanciu, C. E., Philpott, M. K., Kwon, Y. J., & Bustamante, E. E. (2015). Optical characterization of epidermal cells and their relationship to DNA recovery from touch samples. *F1000Research*, 4. doi: 10.12688/f1000research.7385.1
- EUROFORGEN. (2017). *Making sense of Forensic Genetics: What can DNA tell you about a crime?* London, UK.
- Farmen, R. K., Jaghø, R., Cortez, P., & Frøyland, E. S. (2008). Assessment of individual shedder status and implication for secondary DNA transfer.

- Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 415–417.
doi: 10.1016/j.fsigss.2007.08.015
- Finnebraaten, M., Granér, T., & Hoff-Olsen, P. (2008). May a speaking individual contaminate the routine DNA laboratory? *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 421–422. doi: 10.1016/j.fsigss.2007.10.030
- Fonneløp, A. E., Egeland, T., & Gill, P. (2015). Secondary and subsequent DNA transfer during criminal investigation. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 155–162. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.009
- Fonneløp, A. E., Ramse, M., Egeland, T., & Gill, P. (2017). The implications of shedder status and background DNA on direct and secondary transfer in an attack scenario. *Forensic Science International: Genetics*, 29, 48–60. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.03.019
- Gill, P. (2014). *Misleading DNA Evidence: Reasons for Miscarriages of Justice* (1ª Edição). Amsterdam, Netherlands: Academic Press/Elsevier.
- Gill, P., Hicks, T., Butler, J. M., Connolly, E., Gusmão, L., Kokshoorn, B., Morling, N., van Oorschot, R. A. H., Parson, W., Prinz, M., Schneider, P. M., Sijen, T., & Taylor, D. (2020). DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions. Part II: Evaluation of biological traces considering activity level propositions. *Forensic Science International: Genetics*, 44. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.102186
- Gill, P., & Kirkham, A. (2004). Development of a Simulation Model to Assess the Impact of Contamination in Casework Using STRs. In *J Forensic Sci* (Vol. 49, Issue 3).
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An Introduction to Forensic Genetics* (2ª Edição). Wiley-Blackwell.
- Goray, M., Fowler, S., Szkuta, B., & van Oorschot, R. A. H. (2016). Shedder status - An analysis of self and non-self DNA in multiple handprints deposited by the same individuals over time. *Forensic Science International: Genetics*, 23, 190–196. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.05.005
- Goray, Mariya, Eken, E., Mitchell, R. J., & van Oorschot, R. A. H. (2010). Secondary DNA transfer of biological substances under varying test

- conditions. *Forensic Science International: Genetics*, 4(2), 62–67. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.05.001
- Goray, Mariya, Mitchell, R. J., & Oorschot, R. A. H. van. (2010). Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions. *Legal Medicine*, 12(3), 117–120. doi: 10.1016/j.legalmed.2010.01.003
- Goray, Mariya, & van Oorschot, R. A. H. (2015). The complexities of DNA transfer during a social setting. *Legal Medicine*, 17(2), 82–91. doi: 10.1016/j.legalmed.2014.10.003
- Goray, Mariya, van Oorschot, R. A. H., & Mitchell, J. R. (2012). DNA transfer within forensic exhibit packaging: Potential for DNA loss and relocation. *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 158–166. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.03.013
- Gosch, A., & Courts, C. (2019). On DNA transfer: The lack and difficulty of systematic research and how to do it better. In *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 40, pp. 24–36). Elsevier Ireland Ltd. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.01.012
- Hartless, S., Walton-Williams, L., & Williams, G. (2019). Critical evaluation of touch DNA recovery methods for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 379–380. doi: 10.1016/j.fsigss.2019.10.020
- Helmus, J., Bajanowski, T., & Poetsch, M. (2016). DNA transfer—a never ending story. A study on scenarios involving a second person as carrier. *International Journal of Legal Medicine*, 130(1), 121–125. doi: 10.1007/s00414-015-1284-1
- Helmus, J., Poetsch, J., Pfeifer, M., Bajanowski, T., & Poetsch, M. (2020). Cleaning a crime scene 2.0—what to do with the bloody knife after the crime? *International Journal of Legal Medicine*, 134(1), 171–175. doi: 10.1007/s00414-019-02162-6
- IT-SGBF-C-005. (2020). *Instrução Técnica: Preparação de amostras para aplicação no sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer*. Coimbra, Portugal.
- IT-SGBF-C-006. (2021). *Instrução Técnica- PCR: Polymerase Chain Reaction*. Coimbra, Portugal.

- IT-SGBF-C-015. (2022). *Instrução Técnica: Preparação de amostras para quantificação em tempo real*. Coimbra, Portugal.
- IT-SGBF-C-025. (2022). *Instrução Técnica: Extração de ADN de amostras-problema de ossos, dentes e adesivos*. Coimbra, Portugal.
- Jackson, G., & Biedermann, A. (2019). “Source” or “activity” What is the level of issue in a criminal trial? *Significance*, 16(2), 36–39. doi: 10.1111/j.1740-9713.2019.01253.x
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76–79. doi: 10.1038/316076a0
- Jones, S., Scott, K., Lewis, J., Davidson, G., Allard, J. E., Lowrie, C., McBride, B. M., McKenna, L., Teppett, G., Rogers, C., Clayson, N., & Baird, A. (2016). DNA transfer through nonintimate social contact. *Science and Justice*, 56(2), 90–95. doi: 10.1016/j.scijus.2015.10.004
- Kamphausen, T., Schadendorf, D., von Wurmb-Schwark, N., Bajanowski, T., & Poetsch, M. (2012). Good shedder or bad shedder- The influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions. *International Journal of Legal Medicine*, 126(1), 179–183. doi: 10.1007/s00414-011-0579-0
- Kanokwongnuwut, P., Martin, B., Kirkbride, K. P., & Linacre, A. (2018). Shedding light on shedders. *Forensic Science International: Genetics*, 36, 20–25. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.06.004
- Kita, T., Yamaguchi, H., Yokoyama, M., Tanaka, T., & Tanaka, N. (2008). Morphological study of fragmented DNA on touched objects. *Forensic Science International: Genetics*, 3(1), 32–36. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.09.002
- Lacerenza, D., Aneli, S., Omedei, M., Gino, S., Pasino, S., Berchiolla, P., & Robino, C. (2016). A molecular exploration of human DNA/RNA co-extracted from the palmar surface of the hands and fingers. *Forensic Science International: Genetics*, 22, 44–53. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.01.012
- Ladd, C., Adamowicz, M. S., Bourke, M. T., Scherzinger, C. A., & Lee, H. C. (1999). A systematic analysis of secondary DNA transfer. *Journal of Forensic Sciences*, 44(6), 1270–1272.
- Lagoa, A., & Pinheiro, M. (2008). Amostras Low Copy Number. In M. Pinheiro (Ed.), *CSI Criminal*. Universidade Fernando Pessoa.

- Lehmann, V. J., Mitchell, R. J., Ballantyne, K. N., & van Oorschot, R. A. H. (2013). Following the transfer of DNA: How far can it go? *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1). doi: 10.1016/j.fsigss.2013.10.027
- Lehmann, V. J., Mitchell, R. J., Ballantyne, K. N., & van Oorschot, R. A. H. (2015). Following the transfer of DNA: How does the presence of background DNA affect the transfer and detection of a target source of DNA? *Forensic Science International: Genetics*, 19, 68–75. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.002
- Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y. C., & Tobe, S. S. (2010). Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics*, 4(2), 137–141. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.07.006
- Locard, E. (1930). The Analysis of Dust Traces. Part I. *The American Journal of Police Science*, 1(3), 276–298. doi: 10.2307/1147154
- 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.*
- Mandel, P., & Metais, P. (1948). Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 142(3–4), 241–243.
- Manoli, P., Antoniou, A., Bashiardes, E., Xenophontos, S., Photiades, M., Stribley, V., Mylona, M., Demetriou, C., & Cariolou, M. A. (2016). Sex-specific age association with primary DNA transfer. *International Journal of Legal Medicine*, 130(1), 103–112. doi: 10.1007/s00414-015-1291-2
- McColl, D. L., Harvey, M. L., & van Oorschot, R. A. H. (2017). DNA transfer by different parts of a hand. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e29–e31. doi: 10.1016/j.fsigss.2017.09.014
- Meakin, G. E., Butcher, E. v., van Oorschot, R. A. H., & Morgan, R. M. (2015). The deposition and persistence of indirectly-transferred DNA on regularly-used knives. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e498–e500. doi: 10.1016/j.fsigss.2015.09.197
- Meakin, G., & Jamieson, A. (2013). DNA transfer: Review and implications for casework. In *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 7, Issue 4, pp. 434–443). Elsevier Ireland Ltd. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.03.013

- Meixner, E., Kallapurackal, V., Kratzer, A., Voegeli, P., Thali, M. J., & Bolliger, S. A. (2020). Persistence and detection of touch DNA and blood stain DNA on pig skin exposed to water. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, *16*(2), 243–251. doi: 10.1007/s12024-020-00234-3
- Oldoni, F., Castella, V., & Hall, D. (2016). Shedding light on the relative DNA contribution of two persons handling the same object. *Forensic Science International: Genetics*, *24*, 148–157. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.07.002
- Oleiwi, A. A., Morris, M. R., Schmerer, W. M., & Sutton, R. (2015). The relative DNA-shedding propensity of the palm and finger surfaces. *Science and Justice*, *55*(5), 329–334. doi: 10.1016/j.scijus.2015.04.003
- Ostojic, L., & Wurmbach, E. (2017). Analysis of fingerprint samples, testing various conditions, for forensic DNA identification. *Science and Justice*, *57*(1), 35–40. doi: 10.1016/j.scijus.2016.08.009
- Peel, C., & Gill, P. (2004). Attribution of DNA profiles to body fluid stains. *International Congress Series*, *1261*(C), 53–55. doi: 10.1016/S0531-5131(03)01638-8
- Pesaresi, M., Buscemi, L., Alessandrini, F., Cecati, M., & Tagliabracci, A. (2003). *Qualitative and quantitative analysis of DNA recovered from fingerprints*.
- Pfeifer, C. M., & Wiegand, P. (2017). Persistence of touch DNA on burglary-related tools. *International Journal of Legal Medicine*, *131*(4), 941–953. doi: 10.1007/s00414-017-1551-4
- Phipps, M., & Petricevic, S. (2007). *The tendency of individuals to transfer DNA to handled items*. *168*, 162–168. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.07.010
- Pinheiro, M. F. (2010). Algumas perspectivas da identificação genética. In M. Pinheiro (Ed.), *Genética Forense: perspectivas da identificação genética* (pp. 17–78). Universidade Fernando Pessoa.
- Poetsch, M., Bajanowski, T., & Kamphausen, T. (2013). Influence of an individual's age on the amount and interpretability of DNA left on touched items. *International Journal of Legal Medicine*, *127*(6), 1093–1096. doi: 10.1007/s00414-013-0916-6
- Poetsch, M., Pfeifer, M., Konrad, H., Bajanowski, T., & Helmus, J. (2018). Impact of several wearers on the persistence of DNA on clothes—a study with experimental scenarios. *International Journal of Legal Medicine*, *132*(1), 117–123. doi: 10.1007/s00414-017-1742-z

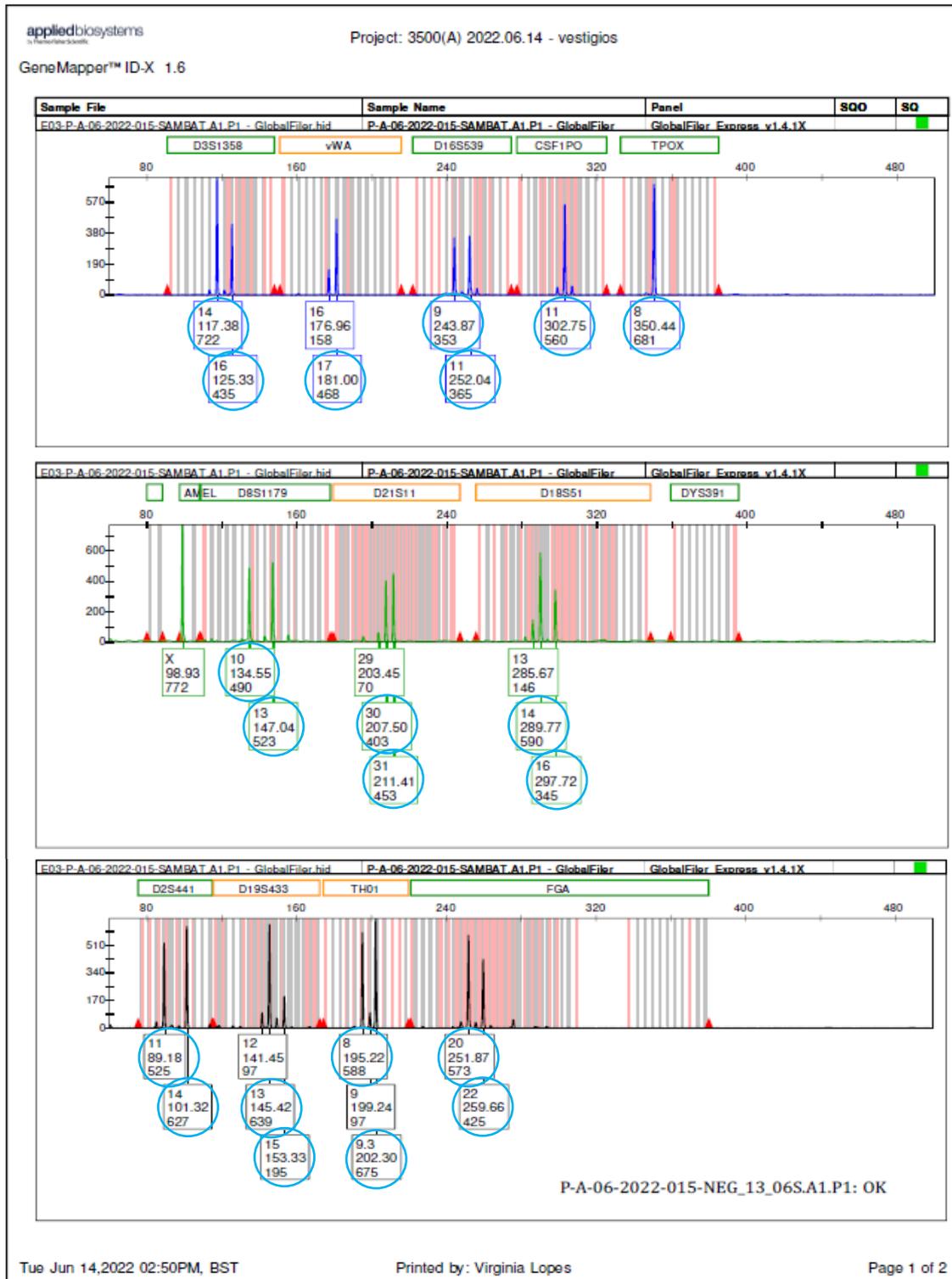
- PO-SGBF-001. (2020). *Procedimento Operacional: Interpretação e valorização de perfis genéticos (singulares e de mistura)*. Coimbra.
- Quinones, I., & Daniel, B. (2012). Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 26–30. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.01.004
- Raymond, J. J., van Oorschot, R. A. H., Gunn, P. R., Walsh, S. J., & Roux, C. (2009). Trace evidence characteristics of DNA: A preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. *Forensic Science International: Genetics*, 4(1), 26–33. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.04.002
- Raymond, J. J., Walsh, S. J., van Oorschot, R. A. H., Gunn, P. R., Evans, L., & Roux, C. (2008). Assessing trace DNA evidence from a residential burglary: Abundance, transfer and persistence. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 442–443. doi: 10.1016/j.fsigss.2007.10.040
- Samie, L., Taroni, F., & Champod, C. (2020). Estimating the quantity of transferred DNA in primary and secondary transfers. *Science & Justice*, 60(2), 128–135. doi: 10.1016/j.scijus.2019.09.008
- Sessa, F., Salerno, M., Bertozzi, G., Messina, G., Ricci, P., Ledda, C., Ra, V., & Cantatore, S. (2019). *Touch DNA : impact of handling time on touch deposit and evaluation of different recovery techniques : An experimental study*. June, 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-46051-9
- Stamatas, G. N., Nikolovski, J., Luedtke, M. A., Kollias, N., & Wiegand, B. C. (2010). Infant Skin Microstructure Assessed In Vivo Differs from Adult Skin in Organization and at the Cellular Level. *Pediatric Dermatology*, 27(2), 125–131. doi: 10.1111/j.1525-1470.2009.00973.x
- Szkuta, B., Ballantyne, K. N., & van Oorschot, R. A. H. (2017). Transfer and persistence of DNA on the hands and the influence of activities performed. *Forensic Science International: Genetics*, 28, 10–20. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.01.006
- Tan, J., Lee, J. Y., Lee, L. Y. C., Aw, Z. Q., Chew, M. H., Ishak, N. I. B., Lee, Y. S., Mugni, M. A., & Syn, C. K. C. (2019). Shedder status: Does it really exist? *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 360–362. doi: 10.1016/j.fsigss.2019.10.012

- Tanzhaus, K., Reiß, M. T., & Zaspel, T. (2021). "I've never been at the crime scene!" — gloves as carriers for secondary DNA transfer. *International Journal of Legal Medicine*, 135(4), 1385–1393. doi: 10.1007/s00414-021-02597-w
- Taroni, F., Biedermann, A., Vuille, J., & Morling, N. (2013). Whose DNA is this? How relevant a question? (A note for forensic scientists). *Forensic Science International: Genetics*, 7(4), 467–470. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.03.012
- Taylor, D., Abarno, D., Rowe, E., & Rask-Nielsen, L. (2016). Observations of DNA transfer within an operational Forensic Biology Laboratory. *Forensic Science International: Genetics*, 23, 33–49. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.02.011
- Tims, S., van Wamel, W., Endtz, H. P., van Belkum, A., & Kayser, M. (2010). Microbial DNA fingerprinting of human fingerprints: dynamic colonization of fingertip microflora challenges human host inferences for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 124(5), 477–481. doi: 10.1007/s00414-009-0352-9
- Tobias, S. H. A., Jacques, G. S., & Morgan, R. M. (2017). The effect of pressure on DNA deposition by touch. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e29–e31.
- van Oorschot, Roland A H, Ballantyne, K. N., & Mitchell, R. J. (2010). Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*, 1(1), 14. doi: 10.1186/2041-2223-1-14
- van Oorschot, R. A.H., McColl, D. L., Alderton, J. E., Harvey, M. L., Mitchell, R. J., & Szkuta, B. (2015). Activities between activities of focus-Relevant when assessing DNA transfer probabilities. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e75–e77. doi: 10.1016/j.fsigss.2015.09.031
- van Oorschot, Roland A. H., & Jones, M. K. (1997). DNA fingerprints from fingerprints. *Nature*, 387(6635), 767–767. doi: 10.1038/42838
- van Oorschot, Roland A. H., Found, B., & Ballantyne, K. N. (2015). Considerations Relating to the Components of a Laboratory DNA Contamination Minimisation Monitoring (DCMM) Program. *Forensic Science Policy & Management: An International Journal*, 6(3–4), 91–105. doi: 10.1080/19409044.2015.1085926
- van Oorschot, Roland A.H., Glavich, G., & Mitchell, R. J. (2014). Persistence of DNA deposited by the original user on objects after subsequent use by a

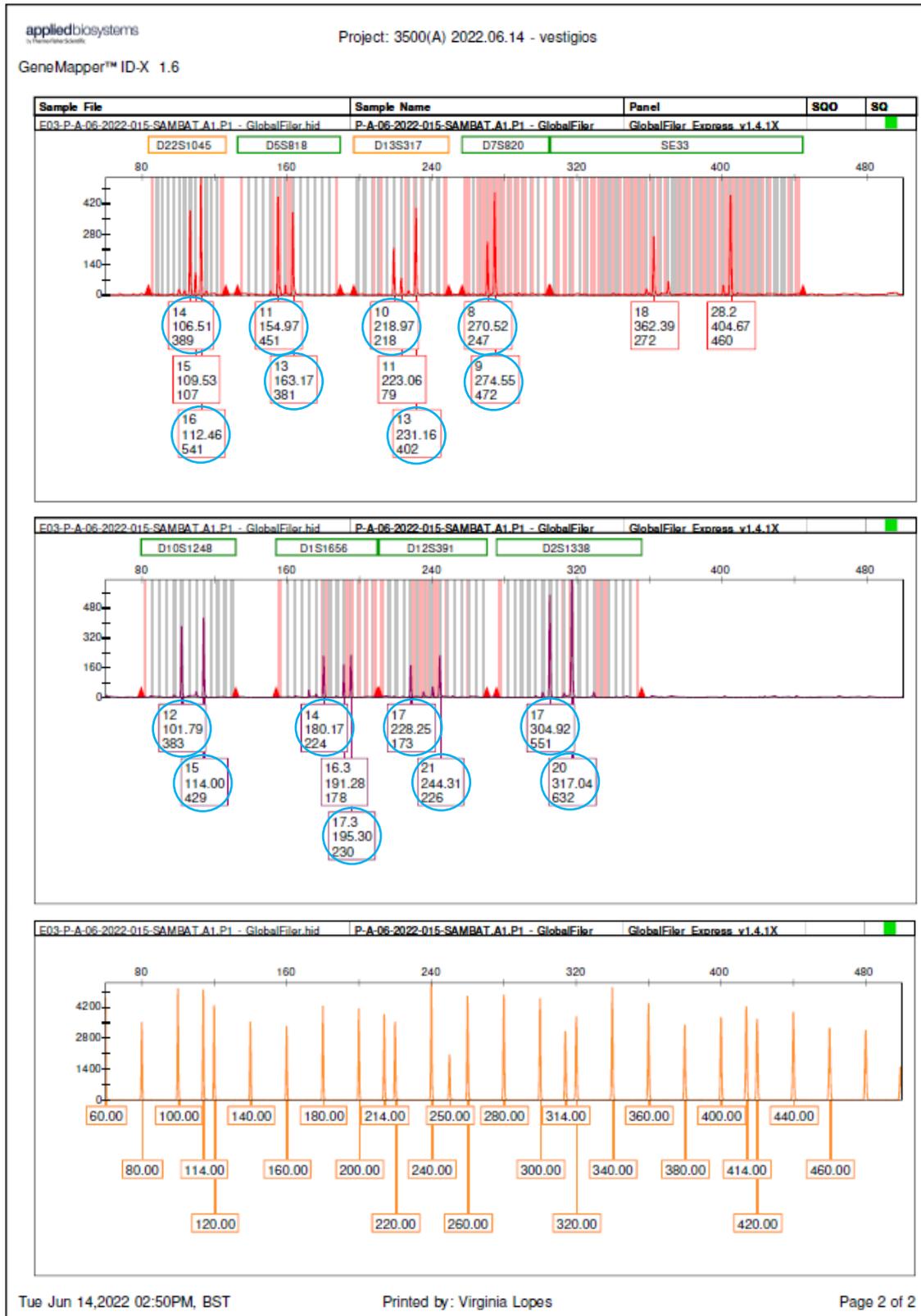
- second person. *Forensic Science International: Genetics*, 8(1), 219–225. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.10.005
- van Oorschot, Roland A.H., Meakin, G. E., Kokshoorn, B., Goray, M., & Szkuta, B. (2021). DNA transfer in forensic science: recent progress towards meeting challenges. In *Genes* (Vol. 12, Issue 11). MDPI. doi: 10.3390/genes12111766
- van Oorschot, Roland A.H., Szkuta, B., Meakin, G. E., Kokshoorn, B., & Goray, M. (2019). DNA transfer in forensic science: A review. In *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 38, pp. 140–166). Elsevier Ireland Ltd. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.10.014
- Vandewoestyne, M., van Hoofstat, D., Franssen, A. E., Nieuwerburgh, F. van, & Deforce, D. (2012). Presence and potential of cell free DNA in different types of forensic samples. *Forensic Science International: Genetics*. doi: 10.1016/j.fsigen
- Verdon, T. J., Mitchell, R. J., & van Oorschot, R. A. H. (2013). The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 167–175. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.09.004
- Wickenheiser, R. A., & Sc, B. (2002). *Trace DNA : A Review , Discussion of Theory , and Application of the Transfer of Trace Quantities of DNA Through Skin Contact*. 21, 442–450.
- Wiegand, P., & Kleiber, M. (1997). DNA typing of epithelial cells after strangulation. *International Journal of Legal Medicine*, 110(4), 181–183. doi: 10.1007/s004140050063
- Zoppis, S., Muciaccia, B., D'Alessio, A., Ziparo, E., Vecchiotti, C., & Filippini, A. (2014). DNA fingerprinting secondary transfer from different skin areas: Morphological and genetic studies. *Forensic Science International: Genetics*, 11(1), 137–143. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.03.005

ANEXOS

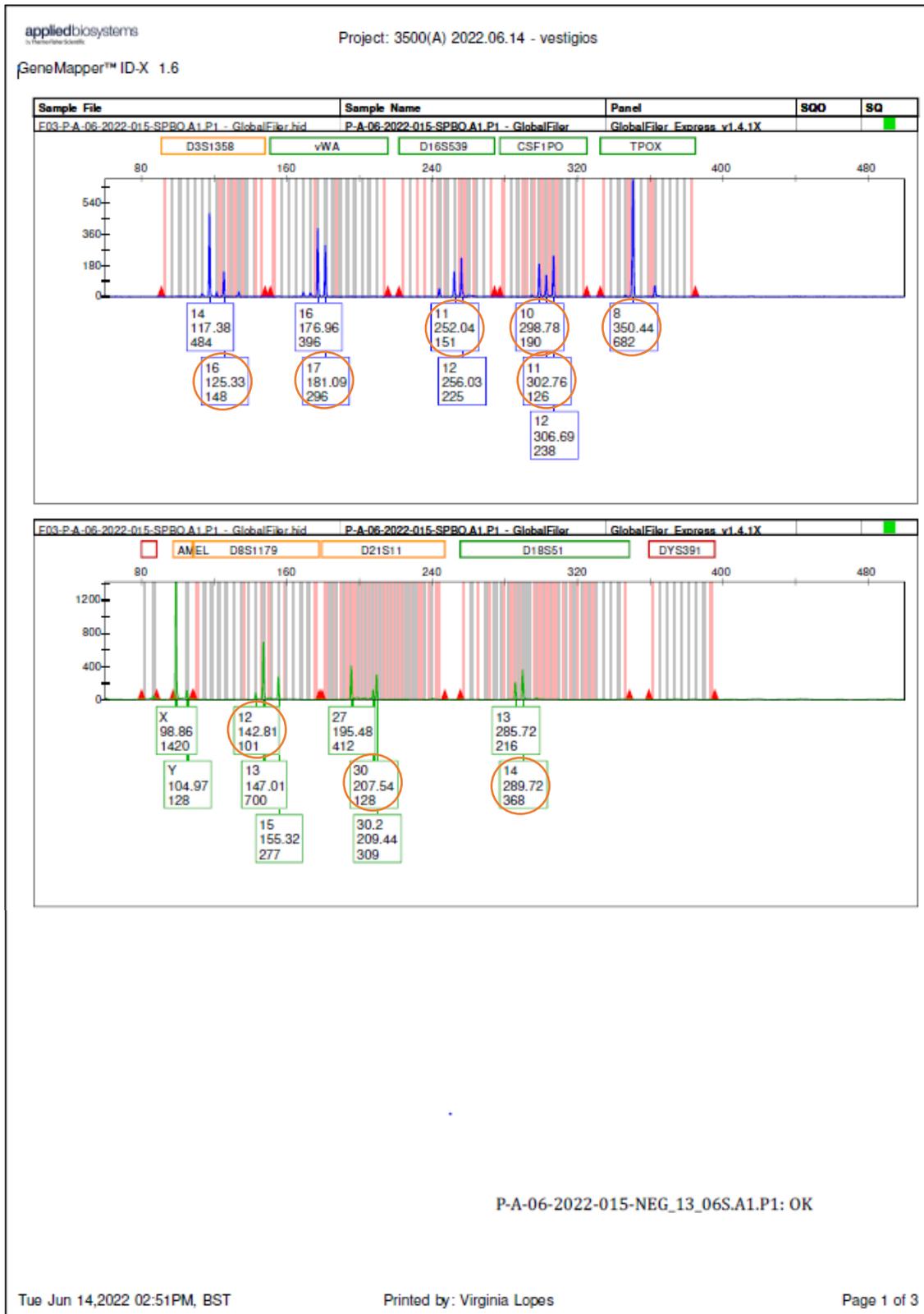
Anexo I – Eletroferograma obtido para a amostra A#3 (AT) no ensaio relativo ao efeito da desinfecção das mãos na transferência de touch DNA. Os alelos que coincidem com o perfil genético de referência do voluntário A, indivíduo responsável pela deposição da amostra em questão, apresentam-se rodeados a azul. O marcador SE33 não se encontra assinalado, uma vez que o perfil de referência não apresenta este locus.



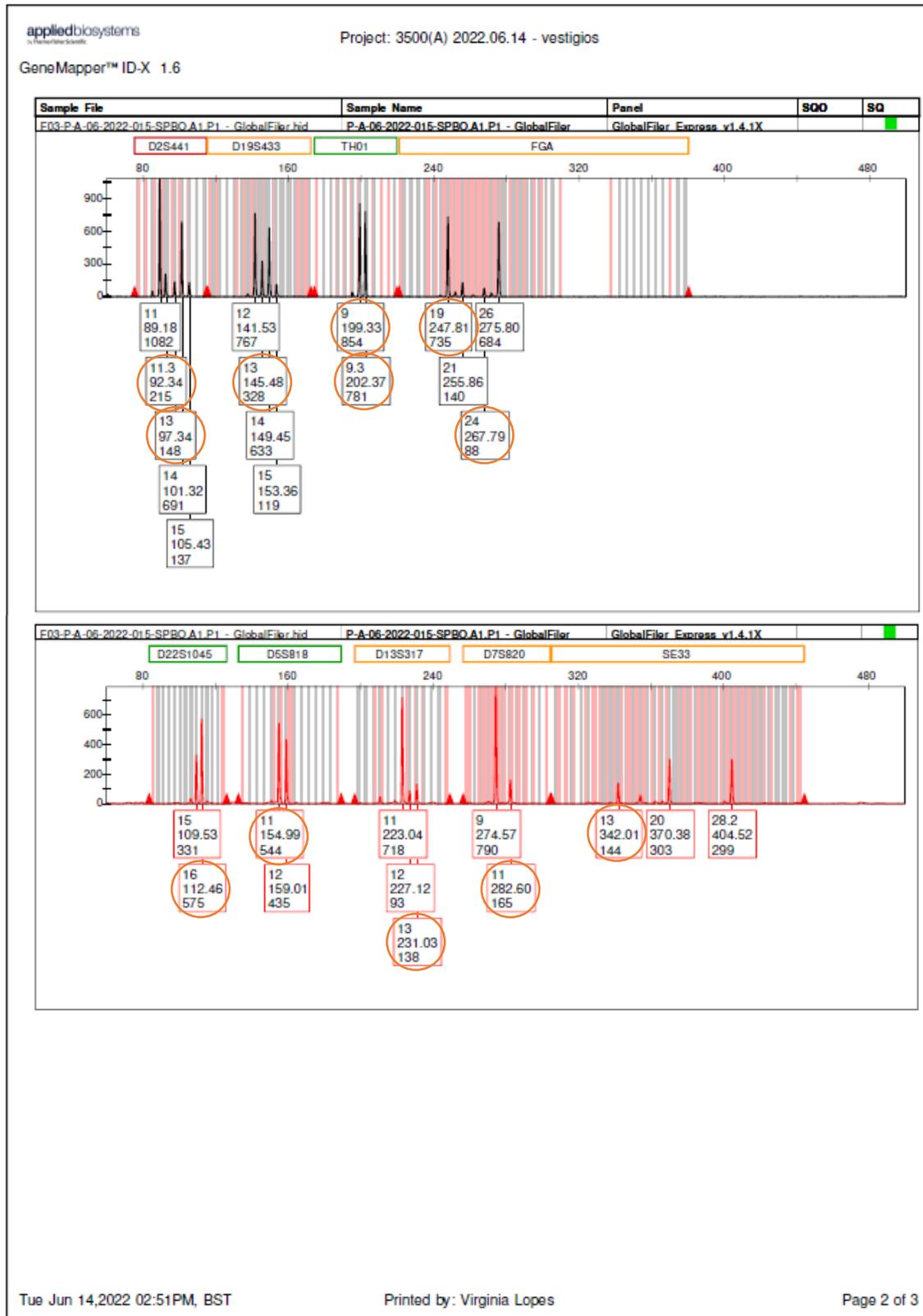
(continuação do Anexo I)



Anexo II- Eletroferograma obtido para a amostra F#3 (0 min) no ensaio relativo ao efeito da desinfecção das mãos na transferência de touch DNA. Os alelos que coincidem com o perfil genético de referência do voluntário F, indivíduo responsável pela deposição da amostra em questão, apresentam-se rodeados a laranja.



(continuação do Anexo II)



(continuação do Anexo II)

