

Daniela de Oliveira Francisco

**Estudo de DNA de toque em situações simuladas para
finalidades forenses**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Doutora em Ciências
(versão corrigida)

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Cintia Fridman Rave

São Paulo
2021

Daniela de Oliveira Francisco

**Estudo de DNA de toque em situações simuladas para
finalidades forenses**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Doutora em Ciências
(versão corrigida)

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Cintia Fridman Rave

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Francisco, Daniela de Oliveira
Estudo de DNA de toque em situações simuladas
para finalidades forenses / Daniela de Oliveira
Francisco. -- São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Cintia Fridman Rave.

Descritores: 1.DNA de toque 2.Extração de DNA
3.Genética forense 4.Repetições de microssatélites
5.Identificação humana 6.Perfil genético

USP/FM/DBD-183/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprendizagem durante os cinco anos em que estive aqui. Em especial agradeço para minha orientadora, Prof. Dra. Cintia Fridman, por me aceitar como sua aluna e depositar sua confiança em mim, me auxiliando no que fosse necessário durante o processo.

Agradeço às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos FAPESP 2016/14355-3, 2017/06484-0 e 2019/09622-0) pelo apoio financeiro prestado durante todo esse tempo e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Quero agradecer também às minhas companheiras de equipe. Durante esses anos, conheci muitas pessoas incríveis. Com elas aprendi muito e também compartilhei muitas histórias. Agradeço em especial a Liliane por todo o suporte técnico e pelas conversas nas horas vagas, e à Mariana, por ser a amiga excepcional que sempre me fazia sorrir mesmo nas horas mais difíceis.

Agradeço também à Fernanda Toledo que esteve comigo desde o começo do projeto, disposta a me auxiliar em cada etapa, aprendendo a lidar com as adversidades junto comigo.

Aos membros da banca, que doaram um pouco de seu tempo para prestigiar nossa pesquisa e fazer considerações.

Aos meus pais, irmãos e familiares por me apoiarem, incentivarem e sempre demonstrarem ter orgulho de mim. Jacira, Rui e Vitor, nada seria possível sem vocês.

Aos meus amigos de infância e da graduação que sempre estiveram dispostos a me ouvir e me animar, tornando os meus dias mais leves e alegres.

E, por fim, agradeço especialmente ao meu noivo, Lucas, por estar comigo em cada momento, me acompanhando em cada luta, em cada derrota e em cada vitória. Sem sua amizade, seus conselhos, seu carinho e amor eu definitivamente não conseguiria chegar aonde cheguei.

RESUMO

Francisco DO. *Estudo de DNA de toque em situações simuladas para finalidades forenses* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Impressões digitais são vestígios encontrados em cenas de crimes que podem ser usados em análises forenses para a obtenção de perfis STR a partir do DNA recuperado das mesmas, técnica conhecida como DNA de Toque. Vários fatores podem afetar a obtenção e a qualidade desses perfis, como o tipo de superfície em que o DNA é depositado. No Brasil, os crimes mais recorrentes são aqueles praticados com armas brancas, os roubos de veículos e os cibercrimes, sendo que em muitos casos não se considera o uso de perfis de DNA nas investigações por se considerar que o DNA de Toque não é uma boa fonte de material biológico. O objetivo desse estudo foi analisar a viabilidade de obtenção de perfis de DNA em diferentes materiais de empunhaduras de facas, maçanetas e volantes de carros, e em teclados de computadores por meio de situações simuladas de transferência direta. Ao todo, 104 experimentos foram conduzidos a fim de avaliar a eficácia de dois kits de extração de DNA: DNA IQ System e Casework Direct Kit (ambos Promega Corporation). Nove indivíduos participaram do estudo: quatro homens e cinco mulheres. O DNA foi coletado pelo método duplo swab. As amostras foram quantificadas com o kit Quantifiler Trio™ (Thermo Fisher) e amplificadas com o PowerPlex® Fusion System (Promega). Foi possível obter 83 perfis STR (32 extraídas com DNA IQ e 51 com Casework), sendo que amostras extraídas com Casework Direct Kit obtiveram uma média de alelos coincidentes com as referências maior do que as com DNA IQ. Dos 83 perfis gerados, 31 (37,3%) seriam úteis para identificação do criminoso (24 de Casework – 77,4%), considerando como parâmetro de utilidade do perfil, a presença de 8 de 13 marcadores STR do CODIS original. Ao considerar 8 de 20 marcadores do CODIS atual, 42 perfis (50,6%) seriam úteis (30 de Casework – 71,4%). Drop-out e drop-in foram observados, em número maior para amostras extraídas com DNA IQ. Foram observadas variações no *status shedder* dos mesmos participantes em diferentes experimentos, dificultando a classificação em bons ou maus doadores. Experimentos com duas mulheres foram melhores para identificação do doador secundário do que ensaios com dois homens, sugerindo que mulheres podem atuar mais como removedoras de células do que depositoras. O teste Qui-quadrado mostrou que o Casework Direct Kit foi melhor para a produção de perfis úteis para uma investigação em todas as superfícies ($p = 0.001$). O teste Kruskal-Wallis mostrou que o tipo de superfície afeta significativamente a recuperação de DNA para ambos os métodos de extração ($p = 0.005$ para DNA IQ e $p = 0.002$ para Casework), sendo que os volantes obtiveram os melhores resultados e as empunhaduras de facas os piores. Conclui-se que o Casework Direct Kit foi mais eficaz para análise de amostras de DNA de toque para os três tipos de materiais estudados, ainda que outros fatores interfiram na geração do perfil.

Descritores: DNA de toque; Extração de DNA; Genética forense; Repetições de microssatélites; Identificação Humana; Perfil genético.

ABSTRACT

Francisco DO. *Touch DNA study in simulated situations for forensic purposes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Fingerprints are traces commonly found in crime scenes that can be used in forensic analysis to obtain STR profiles from the DNA recovered from them, this technique being known as Touch DNA. Several factors can affect the obtaining and quality of these profiles, such as the type of surface on which the genetic material is deposited. In Brazil, the most recurrent crimes are those committed with bladed weapons, theft of vehicles and cyber crimes, and in many cases the use of DNA profiles in investigations is not used because touch DNA is not considered as a good source of biological material. The objective of this study was to analyze the feasibility of obtaining DNA profiles in different materials for knife handles, knobs and steering wheels for cars, and on computer keyboards through simulated situations of direct transfer. In all, 104 experiments were conducted in order to evaluate the effectiveness of two DNA extraction kits: DNA IQ System and Casework Direct Kit (both Promega Corporation). Nine individuals participated in the study: four men and five women. DNA was collected using the double swab method. The samples were quantified with the Quantifiler Trio™ kit (Thermo Fisher) and amplified with the PowerPlex® Fusion System (Promega). It was possible to obtain 83 STR profiles (32 extracted with DNA IQ and 51 with Casework), and samples extracted with Casework Direct Kit obtained an average of alleles coinciding with the references samples higher than those with DNA IQ. Of the 83 profiles generated, 31 of them (37.3%) would be useful for identifying the criminal (24 from Casework - 77.4%), considering as the profile utility parameter, the presence of 8 of 13 STR markers from the original CODIS. When considering 8 out of 20 current CODIS markers, 42 profiles (50.6%) would be useful (30 from Casework - 71.4%). Drop-out and drop-in were observed, although in greater numbers for samples extracted with DNA IQ. Variations in the shedder status of the same participants were observed in different experiments, making it difficult to classify as good or bad donors. Experiments with two women were better at identifying the secondary donor than trials with two men, suggesting that women may act more as cell removers than depositors. The Chi-square test showed that the Casework Direct Kit was better for producing useful profiles for an investigation on all tested surfaces ($p = 0.001$). The Kruskal-Wallis test showed that the type of surface significantly affects DNA recovery for both extraction methods ($p = 0.005$ for DNA IQ and $p = 0.002$ for Casework), with the steering wheels obtaining the best results and the knife handles the worst. It is concluded that the Casework Direct Kit was more effective for analyzing touch DNA samples for the three types of materials studied, although other factors, such as the type of surface or environmental quality, interfere in the generation of the profile.

Descriptors: Touch DNA; DNA extraction; Forensic genetics; Microsatellite repeats; Human Identification; Genetic profile.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Identificação Humana por DNA.....	1
1.2 Uso de Impressões Digitais para gerar perfis de DNA.....	5
1.3 Tipos de transferências de DNA.	7
1.4 Variáveis que afetam a obtenção de perfis de DNA.....	8
1.5 Desafios para interpretação e análise das amostras de DNA de toque. .	11
1.6 Criminalidade no Brasil e no Estado de São Paulo.....	15
1.7 Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos	17
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MÉTODOS	22
4.1 Desenho dos experimentos simulados	22
4.1.1 Experimento com teclado de computador.....	22
4.1.2 Experimento com arma branca – facas	23
4.1.3. Experimento com volantes e maçanetas de carros	24
4.2 Sumário dos experimentos elaborados.....	25
4.3 Coleta dos materiais biológicos dos experimentos	28
4.4 Extração e Quantificação de DNA.....	29
4.5 Amplificação de DNA	30
4.6 Análise dos dados e análise estatística	31
5. RESULTADOS	34
5.1 Quantificação de amostras	34
5.2 Obtenção de perfis com o kit PowerPlex® Fusion System	37
5.3 Percentual de alelos coincidentes para doadores primários e secundários	39
5.4 Presença de artefatos nos perfis.....	49
5.4.1 Percentual de marcadores coincidentes para doadores primários e secundários	49
5.4.2. Aparecimento de alelos extras (drop-in)	55
5.5 Influência do sexo na obtenção de perfis STR.....	57
5.5.1 Qualidade dos perfis obtidos	58
5.6 Amplificação com PowerPlex® Y 23 System	62
5.7 Análises estatísticas.....	62
6. DISCUSSÃO	64
6.1 Influência do método de extração na obtenção de perfis STR.....	64
6.2 Compatibilidade entre os resultados de quantificação e os perfis obtidos	66
6.3 Influência do tipo de substrato na obtenção de perfis STR.....	68

6.4 Capacidade individual de deposição de material genético.....	71
6.5 Influência de sexo para a obtenção de perfis genéticos	73
6.6 Aparecimento de artefatos nos perfis gerados.....	76
6.7 Eficácia dos perfis gerados para identificação do doador secundário.....	79
6.8 Influência de fatores ambientais sobre a obtenção de perfis genéticos ..	82
6.9 Ausência de perfis após amplificação com kit PowerPlex® Y 23 System84	
7. CONCLUSÕES	86
8. PUBLICAÇÕES REULTANTES DESSE TRABALHO	89
9. ANEXOS	90
10. REFERÊNCIAS.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variação de alelos para um mesmo <i>locus</i> STR baseado no número de repetições da sequência de nucleotídeos.....	3
Figura 2 - Perfil de DNA de um indivíduo do sexo feminino.....	4
Figura 3 - Efeitos estocásticos provenientes do aumento de ciclos durante a Reação em Cadeia de Polimerase.....	13
Figura 4 - limiares de detecção usados para análise de um perfis genético.....	14
Figura 5 - Esquema representativo dos experimentos em teclados de computadores.....	23
Figura 6 - Esquema representativo de experimento com armas brancas.....	24
Figura 7 - Esquema representativo dos experimentos em volantes e maçanetas de carros.....	25
Figura 8 - Perfis parciais obtidos de amostras com resultados negativos para quantificação.....	38
Figura 9 - Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento em teclado de computador. Parte A.....	45
Figura 10 - Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento em teclado de computador. Parte B.....	46
Figura 11 - Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento (com os mesmos participantes) em volantes de carros. Parte A.....	47
Figura 12 - Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento (com os mesmos participantes) em volantes de carros. Parte B.....	48
Figura 13 - Perfil com <i>drop-out</i> e <i>drop-in</i> alélico no experimento T8.....	57
Figura 14 - Desempenho dos kits DNA IQ System e Casework Direct kit em cada superfície, considerando o número total de marcadores STR correspondente para doadores secundários.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de quantificação obtidos para marcadores <i>Large</i> e <i>Small</i> em teclados de computadores.....	34
Tabela 2 - Valores de quantificação obtidos para marcadores <i>Large</i> e <i>Small</i> em empunhaduras de madeira, aço e polipropileno.....	34
Tabela 3 - Valores de quantificação obtidos para marcadores <i>Large</i> e <i>Small</i> em volantes e maçanetas de carros.....	35
Tabela 4 - Médias de quantificação obtidas em teclados de computadores, empunhaduras de facas, volantes e maçanetas de carros para ambos os métodos de extração.....	36
Tabela 5 - Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de teclados de computadores.....	39
Tabela 6 - Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de empunhaduras de facas de aço, madeira e polipropileno.....	40
Tabela 7 - Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de maçanetas e volantes de carros.....	41
Tabela 8 - Número de marcadores com resultado para os doadores primários e secundários em teclados de computadores, considerando marcadores com <i>drop-out</i> alélico do indivíduo e marcadores sem perda alélica.....	49
Tabela 9 - Número de marcadores com resultado para os doadores primários e secundários em facas de madeira, polipropileno e aço, considerando marcadores com <i>drop-out</i> alélico do indivíduo e marcadores sem perda alélica.....	50
Tabela 10 - Número de marcadores com resultado para os doadores primários e secundários em volantes e maçanetas de carros, considerando marcadores com <i>drop-out</i> alélico do indivíduo e marcadores sem perda alélica.....	51
Tabela 11 - Relação entre a qualidade dos perfis obtidos e o tipo de superfície para ambos os doadores presentes na mistura em amostras extraídas com DNA IQ.....	58
Tabela 12 - Relação entre a qualidade dos perfis obtidos e o tipo de superfície para ambos os doadores presentes na mistura em amostras extraídas com Casework Direct Kit	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem média de alelos coincidentes entre os perfis gerado a partir dos experimentos e os perfis controles dos doadores primários e secundários para cada um dos suportes testados, considerando apenas os ensaios realizados com o kit DNA IQ.....	43
Gráfico 2 - Porcentagem média de alelos coincidentes entre os perfis gerado a partir dos experimentos e os perfis controles dos doadores primários e secundários para cada um dos suportes testados, considerando apenas os ensaios realizados com o Casework Direct Kit.....	44
Gráfico 3 - Porcentagem de perfis com pelo menos 8 marcadores STR dos 13 presentes no CODIS original com comcorrespondência alélica para doadores secundários em cada substrato, considerando ambos os métodos de extração.....	53
Gráfico 4 - Gráfico 4 – Porcentagem de perfis com pelo menos 8 marcadores STR dos 20 presentes no CODIS atual com comcorrespondência alélica para doadores secundários em cada substrato, considerando ambos os métodos de extração.....	54
Gráfico 5 - Porcentagem média de alelos extras e verdadeiros para cada um dos suportes utilizados.....	56
Gráfico 6 - Porcentagem média de alelos extras e verdadeiros para cada um dos métodos de extração utilizados.....	56
Gráfico 7 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos M+M.....	60
Gráfico 8 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos M+H.....	60
Gráfico 9 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos H+M.....	61
Gráfico 10 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos H+H.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Experimentos em teclados de computadores, considerando os participantes e métodos de extração de DNA usados.....	26
Quadro 2 - Experimentos com empunhaduras de facas, considerando os participantes e métodos de extração de DNA usados. Cada experimento foi realizado com os três tipos de facas usados.....	26
Quadro 3 - Experimentos realizados com veículos, considerando os participantes e métodos de extração de DNA usados.	27
Quadro 4 - Atuação dos participantes em cada um dos experimentos realizados.....	28
Quadro 5 - Amostras com valores indeterminados para os marcadores de quantificação <i>Small</i> e <i>Large</i> , relacionando quantas não obtiveram perfil algum e quantas geraram perfis de STR.....	36
Quadro 6 - Amostras com valores positivos para quantificação, mas sem perfil STR.....	37
Quadro 7 - Análise de utilidade dos perfis para ambos os métodos de extração em cada um dos substratos testados.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CODIS	Sistema Combinado de Índices de DNA (<i>Combined DNA Index System</i>).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
FTA	<i>Flinders Technology Associates</i>
IDT	Indeterminado
LCN	<i>Low Copy Number</i>
µL	Microlitros
mL	Mililitro
ng	Nanogramas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
RIBPG	Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos
RFU	Unidades de fluorescência relativa
STR	Sequências Curtas Repetidas em Tandem (<i>Short Tandem Repeats</i>)
U.V.	Ultra Violeta
VNTR	Números Variáveis de Repetições em Tandem (<i>Variable Number Tandem Repeats</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Identificação Humana por DNA

A Ciência Forense é uma especialidade que visa ajudar o poder judicial na resolução de questões legais, sendo que, a molécula de DNA é a ferramenta biológica que passou a ser o alvo de inúmeras investigações forenses (Jobling e Gill, 2004; Butler, 2011). É praticamente impossível que alguém cometa um crime sem deixar nenhum rastro de seu próprio DNA para trás, pois durante o ato criminoso diversos tipos de evidências biológicas podem ser transferidas para objetos utilizados pelo infrator, tornando-se muito importantes para as investigações periciais por deixarem pistas fundamentais para a elucidação dos casos e, possivelmente, ajudarem a culpabilizar ou inocentar suspeitos (Lee e Ladd, 2001; Brown, 2003).

A análise da molécula de DNA é de grande utilidade para o sistema de justiça criminal, pois permite determinar a relação entre o material genético encontrado numa cena do crime com o material genético obtido a partir do indivíduo considerado suspeito de ter cometido o delito em questão (Gans e Urbas, 2002), auxiliando assim nas investigações, na medida em que permite estabelecer, ou não, vínculos entre o suspeito e as evidências encontradas no local onde ocorreu o ato criminoso (Butler, 2011; Mishra et al., 2020). Isso é possível porque o DNA, tanto aquele coletado em cenas de crimes, quanto o obtido das amostras-referências de um suspeito, pode ser utilizado para gerar perfis genéticos responsáveis por individualizar pessoas, ou seja, perfis indivíduo-específicos (que diferem de uma pessoa para outra), baseados na análise de um conjunto de regiões do DNA (Pena, 2005; Butler, 2011).

Essa habilidade de atribuir um perfil de DNA a uma determinada pessoa foi uma revolução na genética molecular humana e se tornou fundamental para a resolução de diversas investigações criminais (Butler, 2011; Oorschot et al., 2019), tendo em vista que a molécula de DNA pode ser encontrada em quase todas as células humanas (Bezerra, 2004; Pena, 2005). Dessa maneira, os perfis genéticos passaram a ser aplicados em diversos tipos de infrações, como

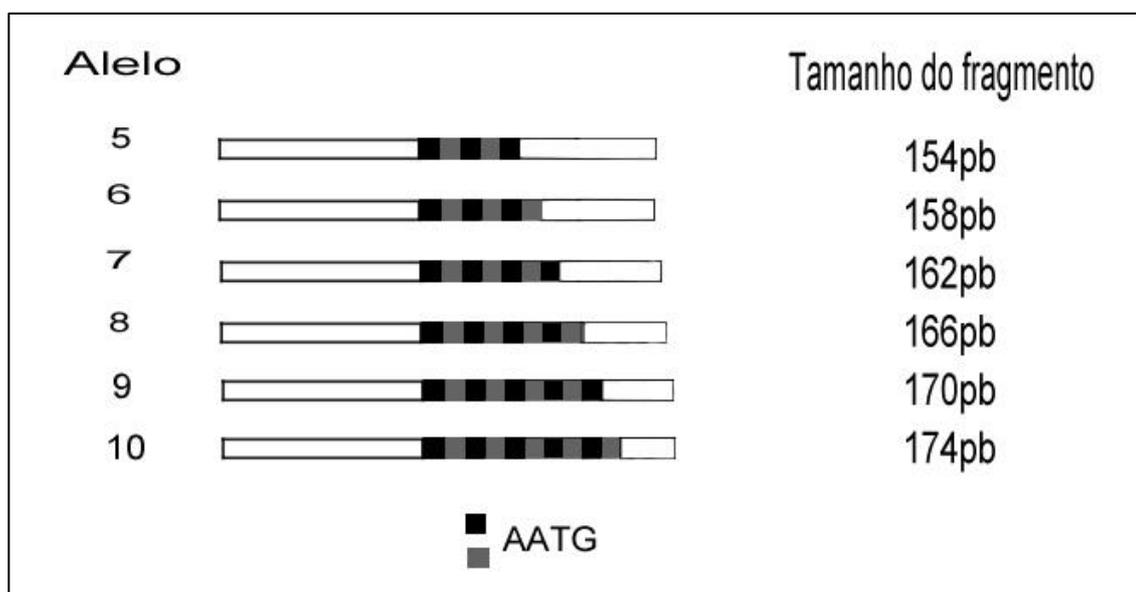
assaltos com armas (de fogo e armas brancas), crimes sexuais, roubos, homicídios, etc (Oorschot et al., 2010).

O uso de perfis de DNA foi descrito pela primeira vez em 1985, pelo geneticista Alec Jeffreys, após sua descoberta de que certas regiões do genoma possuíam sequências repetidas umas atrás das outras, e que esse número de repetições diferia de indivíduo para indivíduo (polimorfismos do genoma) (Butler, 2011). Esses sítios existem aos milhares ao longo de todo o material genético humano, e são considerados marcadores biológicos capazes de conferir individualidade às pessoas, uma vez que podem ser caracterizados como regiões do DNA em que a sequência de nucleotídeos não é a mesma para todos os indivíduos (Brown, 2003). Portanto, apesar de mais de 99,1% do genoma ser idêntico para toda a população humana, a análise dessas sequências variantes do DNA pode ser utilizada para correlacionar e diferenciar pessoas (Giardina et al., 2011).

O primeiro tipo de polimorfismo a ser usados no âmbito forense foram as sequências descritas por Jeffreys em 1985, chamadas de Números Variáveis de Repetições em Tandem (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*), cujo comprimento pode variar de 8 até 100 pares de base num determinado local do genoma (Butler, 2011). A introdução desses marcadores moleculares genéticos foi uma revolução em termos de identificação humana pois, uma vez que é possível obter resultados a partir de amostras mais antigas, já que o DNA é uma molécula muito mais estável quimicamente do que as proteínas usadas no método anterior, conhecido como serologia, baseada na análise de anticorpos sanguíneos (Butler, 2005; Dolinsky e Pereira, 2007), podendo assim resistir melhor à passagem do tempo e agressões ambientais encontradas nas cenas do crime (Pena, 2005).

Porém, a análise de amostras extremamente degradadas de DNA seria muito difícil com o uso dos marcadores VNTR, dada a exigência do alto peso molecular necessário para que eles fossem detectados (Butler, 2011). Dessa maneira, com o passar do tempo, a genética forense sofreu muitas evoluções e os VNTR deram espaço para outro tipo de polimorfismo, as Sequências Curtas

Repetidas em Tandem (STR – *Short Tandem Repeats* ou microssatélites). Os STR são menores que os VNTR e podem ser definidos como sequências curtas, repetidas várias vezes em seguida, sendo que o número de repetições é variável (Brown, 2003) e a unidade de repetição varia de 2 a 8 pares de bases (Butler, 2011), como exemplificado na Figura 1.



FONTE: Elaborado pela autora, 2021.

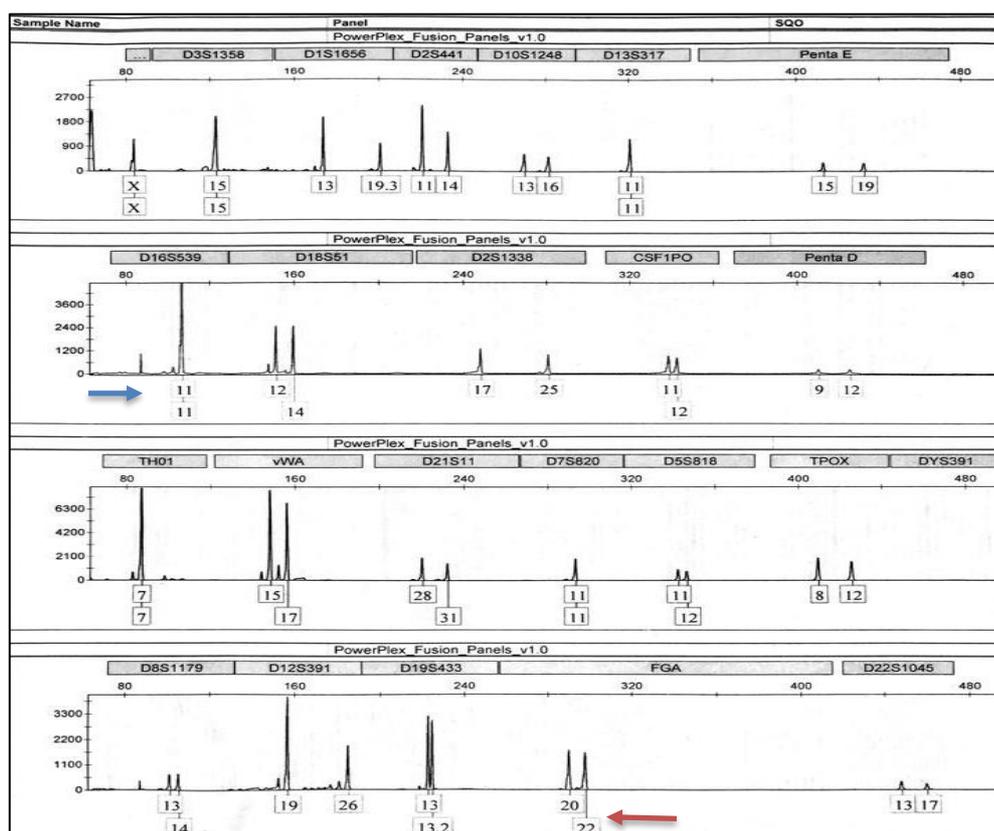
Figura 1 – Variação de alelos para um mesmo *locus* STR baseado no número de repetições da sequência de nucleotídeos. Unidade de repetição: AATG. Modificado de: Forensic Science Protocols, p.111.

Os STR são o tipo de polimorfismo mais utilizado para resolução de casos forenses (Wickenheiser e Hons, 2002; Butler, 2015) pois uma vez que possuem baixo peso molecular, apresentam uma série de vantagens em relação a outros marcadores, como o fato de possibilitarem a obtenção de resultados mais satisfatórios na recuperação de perfis de amostras antigas e degradadas (Wickenheiser e Hons, 2002; Butler, 2011). Além disso, permitem genotipar amostras com quantidade ínfima de material genético, como fios de cabelo, manchas de sangue ou células epiteliais coletadas em algum objeto usado pelo suspeito (Dolinsky e Pereira, 2007).

O sucesso do uso dos STR se explica na medida em que o uso de marcadores genéticos altamente variáveis na população humana, e passíveis de serem combinados para aumentar o poder de discriminação na análise de um

perfil de DNA, é fundamental para identificação pelo DNA (Butler, 2011). Esse é o caso do polimorfismo em questão, pois como o número de repetições nos diversos STR é muito variável, cada diferença é considerada um alelo distinto (Brown, 2003). Assim, durante a produção de um perfil de DNA, é possível analisar simultaneamente um número selecionado de STRs, aumentando o grau de certeza de que o perfil gerado corresponda a um determinado indivíduo (Brown, 2003), pois é improvável que a combinação de vários desses polimorfismos em uma pessoa seja igual à combinação em outra, com exceção dos gêmeos monozigóticos (Butler, 2011).

A Figura 2 exemplifica um perfil de DNA obtido a partir da amostra-referência de sangue periférico de um indivíduo do sexo feminino, cuja análise foi feita para 24 marcadores STR, distribuídos em diferentes cromossomos.



FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Figura 2 – Perfil de DNA obtido de um indivíduo do sexo feminino a partir de extração de seu sangue-periférico, cuja amplificação foi realizada com o Kit PowerPlex® Fusion System (Promega). A seta em azul indica um único pico no marcador D16S539, portanto, a pessoa é homocigota para o STR em questão (alelos 11,11). A seta vermelha indica dois picos no marcador FGA, portanto, a pessoa é heterocigota para o STR em questão (alelos 20, 22).

Atualmente, existem inúmeros bancos de dados, em diferentes países, capazes de armazenar as informações dos perfis de DNA de criminosos, por meio do uso de diferentes conjuntos de *loci* STR. O maior deles é o CODIS (Sistema Combinado de Índices de DNA - *Combined DNA Index System*), estruturado pelo FBI em 1996, que estabeleceu o uso de pelo menos 13 *loci* de STRs específicos, de maneira a garantir alta probabilidade de que o perfil gerado seja de uma determinada pessoa. Em 2015 foi estabelecido que, a partir de janeiro de 2017, outros sete *loci* STR fossem adicionados ao CODIS, somando 20 marcadores ao sistema, expandindo ainda mais o seu poder discriminatório para a identificação humana (Hares, 2015; Moretti et al., 2016). Dessa maneira, devido à instalação do Sistema Combinado de Índices de DNA em diversos laboratórios ao redor do mundo, é possível garantir um intercâmbio das informações provenientes das análises desses STRs selecionados, facilitando assim a comparação dos resultados entre eles a nível nacional e internacional para solucionar diversos tipos de crimes (Reno et al., 2000; Butler, 2011; Federal Bureau of Investigation (FBI) website).

Atualmente, os marcadores que fazem parte do Sistema CODIS são: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 e D22S1045, sendo que os sete últimos são os marcadores que foram adicionados em 2017 (Federal Bureau of Investigation (FBI) website).

1.2 Uso de Impressões Digitais para gerar perfis de DNA.

Ainda que seja possível obter, teoricamente, DNA de qualquer fonte biológica, a quantidade de material genético que pode ser extraída de cada evidência para gerar perfis de DNA pode variar (Lee e Ladd, 2001).

Um dos tipos de vestígios comumente encontrados nas cenas de crimes são as Impressões Digitais, muito usadas para Identificação Humana por meio da datiloscopia, tendo como base a individualidade, variabilidade e imutabilidade das papilas dérmicas (Garrido, 2009). No entanto, as Impressões Digitais podem estar

presentes em vários graus de qualidade (Kaushal e Kaushal., 2011) e em alguns casos criminais não são úteis para fins datiloscópicos (Tozzo et al., 2014), por estarem incompletas, alteradas ou danificadas, afetando os padrões necessários para a identificação (Mccartney et al., 2010; Tozzo et al., 2014).

Nesse contexto, além do uso datiloscópico das Impressões Digitais, cabe destacar que a superfície da pele representa uma grande fonte em potencial para a obtenção de perfis de DNA, pois após friccionar o rosto, nariz, boca e outras regiões, um grande número de células nucleadas fica nas mãos e nos dedos, passíveis de serem transferidas para outros objetos ou superfícies, ou seja, as mãos e os dedos atuam como vetores de transmissão de outros tipos celulares, além das células que são originadas das próprias mãos (Wickenheiser e Hons, 2002).

Balogh et al. (2003) demonstraram que a partir das Impressões Digitais é possível obter um baixo número de células epiteliais, sendo que uma parte considerável delas pode não conter núcleo, por serem corneócitos, células biologicamente mortas. Mesmo assim, esses pesquisadores evidenciaram que mesmo partindo dessa quantidade diminuta de células ainda é possível obter perfis de DNA completos que podem ser significativos para as investigações criminais.

Existem vários termos para se referir a essas amostras obtidas com baixas quantidades de material genético, como “trace DNA”, “touch DNA”, “Low Template DNA” e “Low Copy Number” (LCN), porém segundo Oorschot et al. (2010), cada um diz respeito a um momento da análise dessas amostras. Os termos “Trace DNA” (traço de DNA) e “touch DNA” (DNA de toque) se referem aos vestígios com quantidades ínfimas de DNA coletados em cena de crime e que podem ser transferidos a partir do contato da pele, permitindo obter perfis de DNA (Wickenheiser e Hons, 2002; Oorschot et al., 2010; Oorschot et al., 2019). Cada vez mais, a comunidade científica forense tem se concentrado em investigar as características do traço de DNA e melhorar os métodos de coleta, amplificação e interpretação do mesmo (Oorschot et al., 2010).

Já o termo “Low Template DNA” se refere ao material genético em pouca quantidade submetido à amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cuja consequência muitas vezes são efeitos estocásticos devido às quantidades diminutas de DNA. Por fim, “Low Copy Number” (LCN) é o termo específico usado para amostras submetidas a um aumento de sensibilidade na PCR por conta de um aumento do número de ciclos (Oorschot et al., 2010). Algumas amostras de DNA de toque não são amostras LCN, pois possuem quantidade de DNA suficiente para análises convencionais, sem modificações. Mas muitas amostras nas cenas de crime se qualificam como LCN e devem ser distinguidas e analisadas de maneira adequada (Budowle et al., 2009).

1.3 Tipos de transferências de DNA.

As amostras de DNA de toque, assim como qualquer evidência biológica, podem ser deixadas em um local ou em um objeto por transferência primária ou secundária. O primeiro caso diz respeito a qualquer vestígio que tenha sido depositado por um indivíduo de maneira direta, por exemplo, quando uma pessoa toca um objeto ou superfície. Já a transferência secundária ocorre quando essas evidências biológicas são transferidas a partir de um agente intermediário, que pode ser uma outra pessoa ou um outro objeto (Lee e Ladd, 2001; Oorschot et al., 2019). Nesse caso, não ocorre contato físico entre o depositador original do DNA e a superfície final onde o material biológico ficou depositado (Goray et al., 2009).

Um dos mais famosos casos de transferência secundária já reportados foi o de Lukis Anderson, um sem-teto que, em dezembro de 2012, foi acusado do assassinato de Raveesh Kumra, um multimilionário do Vale do Silício. Vestígios de DNA encontrados na cena do crime estabeleceram o vínculo entre Lukis e o assassinato. No entanto, no dia em que o delito ocorreu, Lukis estava quase entrando em coma alcoólico num leito de hospital, sendo monitorado constantemente pela equipe médica. Posteriormente, descobriu-se que o DNA de Lukis Anderson foi acidentalmente transferido para a cena do crime por paramédicos que haviam sido designados para a residência de Raveesh Kumra e que haviam cuidado de Anderson momentos antes de saírem do hospital. Este caso ilustra que, apesar do sistema de justiça criminal baseado em evidências ser

tratado como infalível, na realidade pode conter riscos e erros significativos. Se Lukis Anderson não possuísse um álibi para a noite do assassinato, ele teria sido condenado injustamente (Smith, 2016).

Dessa forma, a transferência secundária pode ser um problema para as análises forenses, pois pode vincular falsamente uma pessoa a um crime, ou seja, se o DNA desconhecido é deixado no local do crime de maneira indireta, pode ser que se conclua de maneira errônea que esse material biológico foi deixado a partir de um contato direto e que, portanto, essa pessoa esteve na cena do crime (Cale et al., 2016). Por esse motivo, outras evidências circunstanciais devem ser levadas em consideração durante as investigações criminais.

Outro tipo de transferência que pode ocorrer é a contaminação, dada pela deposição de DNA nas amostras após o ato criminoso, como por exemplo, durante a análise da cena do crime pelos investigadores, pelo pessoal do laboratório que examina a evidência, por contaminação ambiental etc. (Gill, 2001; Oorschot et al., 2019).

Em muitos casos, os perfis genéticos obtidos das cenas de crimes podem ser resultado de uma combinação desses diferentes tipos de transferências relatados e, portanto, serem considerados como misturas, variando na quantidade de material deixado por cada contribuidor que a constitui (Gill, 2001; Oorschot et al., 2010), o que dificulta a diferenciação do material genético da vítima e do agressor (Dierig et al. 2020). Conseqüentemente, a interpretação dessas amostras complexas exigirão muita cautela durante a análise dos resultados (Oorschot et al., 2019; Oorschot et al., 2010).

1.4 Variáveis que afetam a obtenção de perfis de DNA

Além da possibilidade de geração de perfis mistos, muito se discute acerca de outros fatores que podem interferir no sucesso da obtenção do perfil genético em amostras de DNA de toque.

Segundo Dolinsky e Pereira (2007), a viabilidade da produção de perfis de DNA dependerá da qualidade e quantidade do DNA extraído. A variação na

quantidade de DNA deixado num objeto que tenha sido manipulado pode depender de uma série de fatores (Meakin e Jamieson, 2013). Entre eles, pode-se destacar o quão bom doador o indivíduo é (*status shedder*) (Farmen, et al., 2008; Oleiwi et al., 2015; Fonnéløpet al., 2017), as atividades do depositador anteriores ao toque e o tempo entre essas atividades (Lowe et al., 2002; Oorschot et al., 2003; Alessandrini et al., 2003), o tipo de superfície onde o DNA é depositado, a natureza do contato (Goray et al., 2010; Daly et al., 2012; Tobias et al., 2017) e o tempo de persistência do material genético transferido em um determinado ambiente (Poetsch et al., 2018).

Em relação ao *status shedder*, estudos relataram que algumas pessoas depositam naturalmente mais DNA que outras. Essas pessoas são chamadas de bons doadores (*good shedders*), pois deixam quantidade suficiente de material genético mesmo após um breve toque com um objeto, gerando um perfil de DNA completo, ou seja, com a presença de todos os alelos dos STRs de interesse. Já outros, chamados de “doadores pobres” (*poor shedders*), deixam pouco DNA na superfície manuseada (Lowe et al., 2002; Lowe et al., 2003; Daly et al., 2011; Kanokwongnuwut et al., 2018). Por exemplo, estudos mostraram que mesmo tendo passado 2 horas desde a última vez que lavaram as mãos, os *poor shedders* produziam perfis parciais, ou seja, que não contém todos os alelos necessários para uma identificação (Lowe et al., 2002; Lowe et al., 2003). No entanto, devido à complexidade dos fatores envolvidos na transferência de DNA pelo toque, alguns autores como Phipps e Petricevic (2007), Quinones e Daniel (2012) e Samie et al. (2020) consideram inadequado rotular os indivíduos em bons ou maus doadores, alegando que essa questão é muito mais complicada do que aparenta ser.

É possível também que algumas atividades, como por exemplo, lavar as mãos, removam as células nucleadas das mãos do doador antes do contato e que o tempo entre essas atividades seja um fator chave para determinar a quantidade de DNA que será depositado em uma superfície. Além disso, pode ser que a natureza do contato interfira nesse processo de deposição do material genético, já que a quantidade de material deixado no local pode ser maior quando se aumenta

o tempo de contato e a fricção aplicada na superfície (Meakin e Jamieson, 2013). Há ainda trabalhos que mostram que o sexo e a idade do indivíduo também podem interferir no fenômeno de transferência de DNA pois, aparentemente, homens tendem a depositar mais DNA do que mulheres, principalmente quando jovens (Poetsch et al., 2013; Gršković et al., 2014; Manoli et al., 2016; Kanokwongnuwut, 2018).

Outros estudos mostram que as propriedades de um substrato interferem no fenômeno de transferência de DNA. Tem se relatado que as superfícies boas para a transferência de Impressões Digitais e a visualização das mesmas são as lisas e não porosas, porém essas são ruins para a recuperação de DNA. Já os substratos rugosos dificultam a visualização das Impressões Digitais, mas são favoráveis para a recuperação de DNA deixado no local (Wickenheiser e Hons, 2002; Goray et al., 2009; Verdon et al., 2013; Buckingham et al., 2016; Mishra et al. 2020). Portanto, o perito deve ser capaz de analisar o tipo de superfície e a probabilidade de obter uma Impressão Digital ou um perfil de DNA útil para a investigação (Wickenheiser e Hons, 2002). Assim, substratos feitos de diferentes materiais podem dificultar ou facilitar a obtenção de perfis de DNA (Daly et al., 2012; Oorschot et al., 2019; Mishra et al. 2020).

Por fim, a qualidade do perfil obtido não é dada unicamente pela quantidade de DNA usado para gerá-lo, mas depende também da qualidade do DNA, que dependendo de várias condições pode estar degradado (Lee e Ladd, 2001; Wickenheiser e Hons, 2002; Dolinsky e Pereira, 2007; Meakin e Jamieson, 2013). Alguns dos fatores que podem afetar a persistência e a degradação de DNA em um local após ele ter sido depositado são: o tempo entre a deposição e a recuperação, o tipo de superfície depositada e alguns fatores ambientais, como a umidade, altas temperaturas e exposição excessiva à luz (Bender et al., 2003; Raymond et al., 2009; Meakin e Jamieson, 2013; Oorschot et al., 2014). Por exemplo, amostras de DNA de toque podem ser recuperadas para gerar perfis STR mesmo após passarem dias submersas em água, mas isso dependerá das características do ambiente aquático em que a amostra foi depositada (água fria,

quente ou temperatura ambiente, presença de luz na água, correnteza, biota etc.) (Meixner et al., 2020).

1.5 Desafios para interpretação e análise das amostras de DNA de toque.

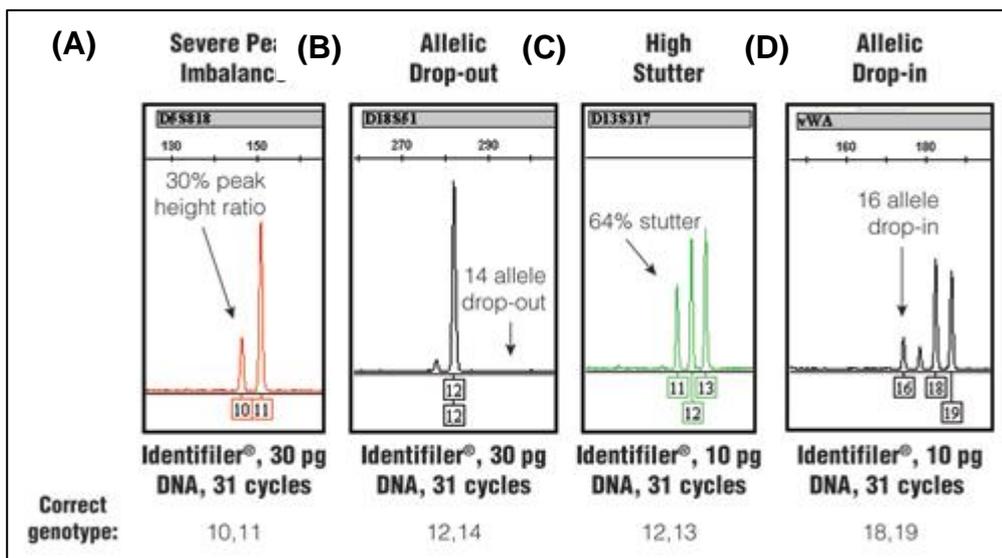
A obtenção de perfis de DNA ocorre em várias etapas. A primeira é a coleta do material biológico encontrado na cena do crime. Posteriormente, a extração do DNA é feita para separá-lo dos outros componentes que constituem esse material biológico e que não são de interesse para as análises forenses. Em seguida, o DNA é submetido à Reação em Cadeira da Polimerase (PCR em inglês), reação enzimática no qual uma região específica de DNA é replicada inúmeras vezes, gerando assim muitas cópias de uma determinada sequência. É possível utilizar tal técnica para amplificar simultaneamente várias regiões do DNA (PCR multiplex), como por exemplo, diferentes marcadores STR (Butler, 2005; Butler, 2011). Assim, uma vez que o material biológico foi amplificado nessa reação, os alelos desses *loci* são detectados por meio de uma eletroforese capilar realizada em um sequenciador automático, gerando enfim o perfil genético do indivíduo (Butler, 2011).

Por conta desta natureza desafiadora das amostras de DNA de toque, principalmente aquelas oriundas de misturas, pesquisadores do mundo inteiro reúnem esforços para melhorar os protocolos de coleta, amplificação e análise desse tipo de vestígio (Mapes, 2016; Szkuta, 2017; Kokshoorn, 2018). Por exemplo, com relação aos métodos de coleta, o uso de dois swabs de algodão (Sweet et al., 1997), uso de fitas adesivas (Barash, 2010), swabs flocados (Wood et al., 2017; Comte, 2019) ou swabs com propriedades capazes de evitar degradação das amostras (Smith et al., 2021) são alguns dos métodos mais promissores para recuperação de células depositadas em uma superfície. Além disso, a eficácia do uso de fluorescências para visualizar o material celular depositado em um determinado substrato também tem sido avaliada (Champion et al., 2020). Da mesma forma, para a etapa de extração, técnicas capazes de extrair mais DNA e remover inibidores de amplificação com a mínima perda possível estão sendo desenvolvidos (Oorschot et al., 2010; Oorschot et al., 2019). Além disso, novos equipamentos e kits de amplificação estão sendo produzidos

para aumentar a sensibilidade de detecção de baixas quantidades de DNA (Oorschot et al., 2010).

Com relação à essa etapa de amplificação do DNA, considerando que as amostras de DNA de toque possuem baixa quantidade de material genético, para aumentar as chances de obtenção de perfis de STR é comum o aumento do número de ciclos durante a PCR multiplex (de 28 para até 34) resultando, conseqüentemente, em um aumento do número de sequências-alvo obtidas. Porém, devido à elevação da sensibilidade dessa técnica, é possível que artefatos apareçam em maiores quantidades. Por exemplo, no caso de indivíduos heterozigotos, pode ocorrer uma amplificação desigual dos dois alelos de um mesmo marcador STR, ou mesmo a perda de um desses alelos (*drop-out* alélico). É possível também que ambos os alelos sejam perdidos, nesse caso, trata-se de um *drop-out* do *locus* (Butler, 2011).

Além disso, é comum que ocorra o aparecimento de picos *stutter* e *drop-in* alélicos (Budowle et al., 2009), chamados também de “alelos falsos” ou “contaminações esporádicas”, ou seja, picos que não estão associados à amostra encontrada na cena do crime (Gill, 2001). Isso porque, ao aumentar a sensibilidade da técnica de amplificação, se eleva também os riscos de contaminação na reação (Oorschot et al., 2010; Butler, 2011). Dessa forma, em muitos casos a comunidade forense é relutante em usar tal método de análise de DNA de toque, e o seu uso passou a ser questionado devido aos vários problemas relacionados com a interpretação dos resultados (Linacre, 2009; Oorschot et al., 2010; Butler, 2011). A Figura 3 exemplifica alguns dos efeitos estocásticos passíveis de serem encontrados durante o processamento de amostras de DNA do toque.



FONTE: Butler, 2011

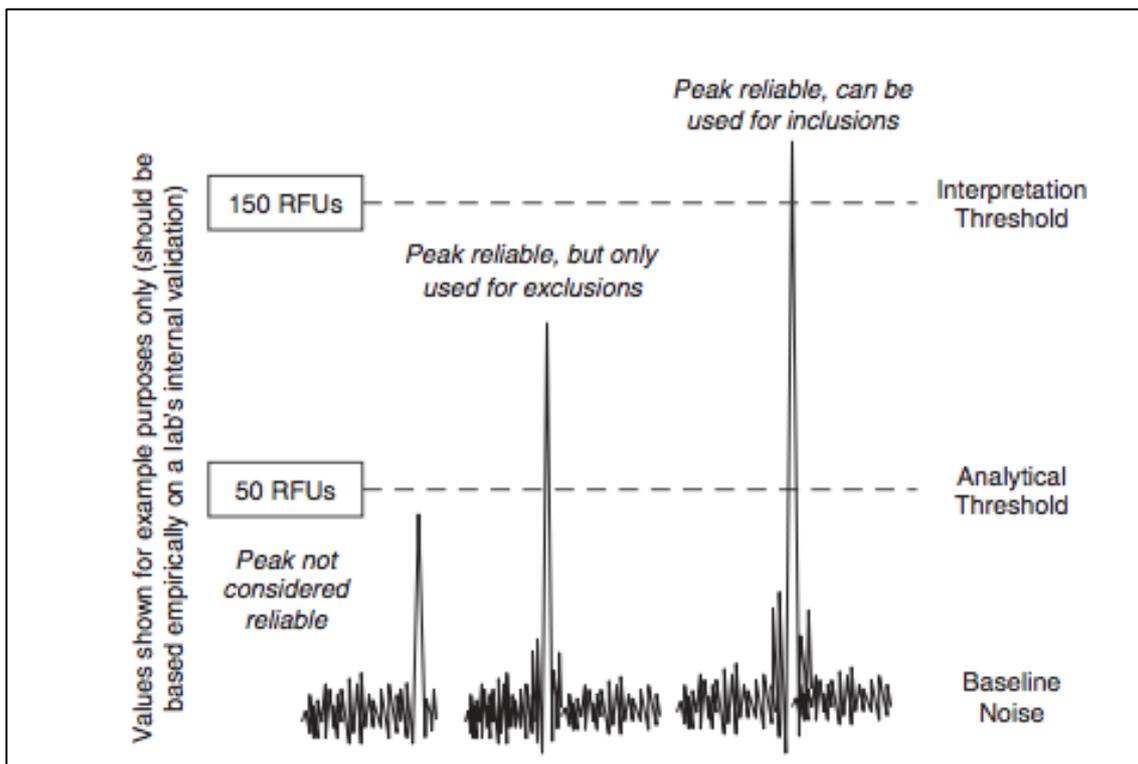
Figura 3 – Efeitos estocásticos provenientes do aumento de ciclos durante a Reação em Cadeia de Polimerase. (A) Evidência de um desbalanço heterozigótico dos dois alelos em questão devido a uma amplificação desigual dos mesmos. (B) *Drop-out* alélico, ou seja, perda do alelo 14 do marcador (C) Aparecimento de um pico *stutter* que não possui relação com a amostra referência e apresenta tamanho maior que 10% do alelo verdadeiro, podendo inclusive ultrapassá-lo. (D) *Drop-in* alélico, pico que não possui relação com a amostra referência, oriundo da contaminação devido ao aumento da sensibilidade da técnica

Tendo em vista esses aspectos, alguns métodos foram desenvolvidos para assegurar confiabilidade dos perfis de DNA obtidos. Um exemplo disso é o uso de limiares de detecção, como o *threshold* analítico e o *threshold* estocástico (Butler, 2010; Oorschot et al., 2010). Esses limiares são alturas mínimas estabelecidas para os picos obtidos no perfil, com o propósito de garantirem o controle estocástico da reação.

O *threshold* analítico é um nível de unidades de fluorescência relativa (RFU) a partir do qual os picos em um perfil genético podem ser considerados como sinal analítico e, conseqüentemente, registrados pelo software de análise de dados. Os picos que se encontrarem abaixo desses limiares previamente estabelecidos devem ser analisados com muita cautela ou não devem ser considerados na interpretação dos resultados (Budowle et al., 2009; Butler, 2010). Considerando o sinal de ruído de fundo no controle positivo, é possível definir esse limiar analítico, sendo que o valor mais comumente estabelecido é o de 50 RFU (Butler, 2010).

Já o *threshold* estocástico é o valor estabelecido a fim de garantir que abaixo dele exista uma baixa probabilidade de que, em uma amostra heterozigota, um dos alelos tenha sofrido um *drop-out*. Sendo assim, pode-se assumir que, quando um pico de um heterozigoto está acima desse limiar, o seu alelo irmão deverá também estar presente, devendo aparecer pelo menos acima do *threshold* analítico. Esse limiar é calculado com base em perfis genéticos heterozigotos que mostram a amplificação de apenas um alelo, permitindo gerar o valor médio em RFU correspondente a este threshold (Butler, 2010).

A Figura 4 ilustra o uso de limiares de detecção em um perfil genético.



FONTE: Butler, 2011

Figura 4 – Exemplos de limiares de detecção usados para análise de um perfil genético. O *Threshold* analítico foi ajustado em 50 RFU e *Threshold* estocástico (limiar de interpretação) em 150 RFU. À esquerda, o pico inferior a 50 RFU não é considerado confiável para a análise. Os outros dois picos são considerados confiáveis, porém o maior encontra-se acima do limiar estocástico, permitindo o seu uso em análises estatísticas mais detalhadas, uma vez que se assume que não houve ocorrência de *drop-out* alélico.

Portanto, qualquer análise que possa resultar na perda da liberdade de um indivíduo acusado por um crime deve ser executada com o máximo de cuidado. O ideal é que existam parâmetros e protocolos para cada etapa da obtenção de

perfis de DNA, estabelecidos de acordo com a validação em laboratório, assegurando a qualidade dos resultados (Butler, 2011).

1.6 Criminalidade no Brasil e no Estado de São Paulo

No que diz respeito ao cenário brasileiro de demanda do uso dos perfis de DNA, atualmente os laboratórios de perícia de DNA recebem grande quantidade de materiais provenientes de cenas de crimes que apresentam DNA oriundo de transferência primária e secundária. Porém, em alguns casos, a obtenção de perfis genéticos por meio do uso de DNA do toque nos itens recebidos é dificultada devido, não somente às quantidades exíguas de material genético, mas também a esses diversos fatores citados acima, que podem fazer com que, dependendo do caso, a coleta do DNA para gerar perfis nem seja considerada pela equipe pericial. O número desses objetos para serem periciados vêm crescendo nos últimos anos em função da popularização desse tipo de exame e pelo aumento da criminalidade. De fato, a criminalidade brasileira é muito alta e, em 2017, o Brasil foi apontado como o 11º país mais inseguro do Mundo pelo Índice de Progresso Social (IPS), que analisou o índice de segurança pessoal em 132 países, caracterizado por englobar a taxa de homicídios, a taxa de crimes violentos e a percepção de criminalidade do local.

Segundo a Secretaria da Segurança Pública, os dados dos crimes cometidos no Estado de São Paulo, mostram que em 2019 foram reportados 522.167 ocorrências de furtos, sendo 90.652 casos de furtos de veículos, e 255.397 ocorrências de roubos, sendo 46.517 casos de roubos de veículos. Ainda neste ano, os roubos de veículos corresponderam à 16,1% das ocorrências registradas. Além disso, 4,4% dos casos foram computados como roubos em interior de veículos. Posteriormente, em 2020, houve 392.311 ocorrências de furtos, sendo 65.724 casos de furtos de veículos, e 218.839 ocorrências de roubos, sendo 31.891 roubos de veículos no Estado de São Paulo. Ao todo, neste ano, os roubos de veículos representaram 11,3% dos casos totais registrados, enquanto que os roubos em interior de veículos representaram 3,3% das ocorrências. Segundo os peritos do laboratório de DNA da Polícia Civil da cidade de São Paulo (informação pessoal), em geral, são poucas as coletas na tentativa

de se obter DNA das maçanetas de carros, pois os peritos consideram muito provável que a quantidade de material biológico depositado pelo criminoso seja muito menor do que a do proprietário e, portanto, o perfil de DNA obtido não será de grande utilidade para a investigação.

Ainda segundo a Secretaria da Segurança Pública do Estado de São Paulo, em 2020 foram reportados 2.893 casos de homicídio doloso, ou seja, com intenção de matar, sendo que 22,7% ocorreram em residências, 55,3% em vias públicas e 2,9% em restaurantes e locais de lazer. Em comparação com 2019 foram 3.521 casos ao todo e alguns dos dados relatados são: 22,1% em residências, 54,6% em vias públicas e 3,5% em restaurantes ou locais de lazer, respectivamente. Além disso, o estudo realizado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) em 2012, relatou que a maioria dos casos de homicídio no continente americano ocorre por uso de armas de fogo (66%), mas uma porcentagem significativa (17%) ainda corresponde às armas brancas, como facas.

Esses dados mostram que, mesmo que em minoria, os crimes com armas brancas ainda existem, sendo que boa parte deles ocorre em residências ou restaurantes, muito provavelmente com o uso de facas, um utensílio facilmente encontrado em qualquer domicílio, e que pode ser feito de diferentes materiais. Como relatado pela literatura, dependendo da superfície onde o material genético é depositado, a obtenção de perfis de DNA pode ser dificultada (Wickenheiser e Hons, 2002; Goray et al., 2009; Daly et al., 2012; Verdon et al., 2013; Mishra et al., 2020) Segundo os peritos do laboratório de DNA da Polícia Civil da Cidade de São Paulo (informação pessoal), os crimes com facas são muito comuns, porém nem sempre é fácil obter o perfil de DNA, já que além do material da empunhadura poder dificultar esse processo, é provável encontrar misturas devido ao manuseio do objeto por mais de um usuário.

Outros tipos de crime que têm crescido de maneira progressiva, mas que parecem carecer de estatísticas em bancos de dados brasileiros, são aqueles vinculados à informática, ou seja, os *ciber Crimes*. Eles englobam qualquer delito em que tenha sido usado um computador, incluindo fraude, roubo ou invasão de

dados, acesso não autorizado, assédio na Internet, etc. De acordo com o relatório Norton (2017), da Symantec, o número de vítimas brasileiras pelo *cibercrime* em 2017 foi de 62,21 milhões, deixando o Brasil na posição de um dos países com maiores índices de crimes de informática. Entretanto, pouco se fala a respeito de como esses crimes podem ser elucidados e a coleta de DNA de teclados não parece ser considerada.

1.7 Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos

Com a finalidade de propiciar o compartilhamento e comparação de perfis genéticos oriundos de vestígios encontrados em cenas de crimes, em 2013, o Decreto nº 7950/2013-MJ instituiu a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG) no Brasil. Elaborada pelo Ministério da Justiça e pelas Secretarias de Segurança Pública Estaduais, a RIBPG garante a possibilidade de intercâmbio de perfis genéticos entre os diversos laboratórios periciais do Brasil, permitindo o confronto de dados para a busca de coincidências que permitam relacionar suspeitos a locais de crimes e diferentes locais de crimes a um mesmo suspeito (XIII Relatório Semestral da RIBPG, 2020). Para isso, laboratórios que atendam os critérios de admissibilidade estabelecidos no Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (2019), como por exemplo, a obrigatória qualificação técnico-científica do pessoal para a execução das análises e a adequada estrutura física do local, devem enviar os perfis obtidos para o Banco Nacional de Perfis Genéticos.

Hoje, 22 laboratórios fazem parte da RIBPG, sendo 20 deles estaduais (Alagoas, Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo), 1 laboratório distrital (Distrito Federal) e 1 laboratório da Polícia Federal. Os laboratórios do Acre, Piauí, Sergipe, Rio Grande do Norte, Roraima e Tocantins ainda estão na fase de ajustes para conseguir atender aos requisitos necessários para integrar à rede e, conseqüentemente, iniciar o compartilhamento de perfis genéticos (XIII Relatório Semestral da RIBPG, 2020).

No âmbito criminal, até o dia 28 de novembro de 2020, a RIBPG já havia auxiliado a resolução de 1.977 investigações. Para a esfera criminal, os perfis armazenados no Banco Nacional de Perfis Genéticos são divididos nas seguintes categorias: vestígios de crime, condenados, identificados criminalmente, restos mortais identificados e decisão judicial. No que diz respeito às pessoas desaparecidas, as categorias de perfis são: familiares de pessoas desaparecidas, restos mortais não identificados, referencia direta de pessoa desaparecida ou pessoas vivas de Identidade desconhecida. Até setembro de 2020, considerando todas as categorias, já haviam sido computados pelo menos 82 mil registros armazenados no sistema (XIII Relatório Semestral da RIBPG, 2020).

A inserção dos perfis no Banco Nacional de Perfis Genéticos depende de uma série de condições estabelecidas pelo Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (2019), ou seja, não é qualquer perfil que pode ser adicionado ao sistema. Por exemplo, segundo este manual, quando não é possível obter o perfil completo de uma amostra biológica encontrada em cena de crime, são necessários ao menos 8 marcadores STR dos 13 existentes no CODIS original para que o perfil parcial proveniente do vestígio possa integrar a RIBPG.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO

Sabendo-se que as Impressões Digitais são os vestígios biológicos mais comuns na maioria das cenas de crimes e que, na maior parte das vezes, estas não são encontradas na íntegra para a identificação do criminoso por datiloscopia, é importante investigar e aprimorar a viabilidade de obtenção de perfis genéticos desse material biológico em diferentes superfícies com a finalidade de auxiliar o trabalho da perícia técnico científica. Tendo em vista que os crimes com facas acontecem em proporção considerável e que a taxa de sucesso de obtenção de perfis de DNA nas perícias brasileiras ainda é baixa, por conta dos diferentes tipos de materiais das quais são feitas as empunhaduras dessas armas brancas, e devido às complicações de interpretação das misturas obtidas, torna-se necessário aprimorar as metodologias de obtenção do perfil genético nesses casos. Além disso, a avaliação de obtenção de perfis de DNA de maçanetas e volantes de carros que foram furtados ou roubados, considerando as diferentes condições ambientais, se faz necessária, uma vez que as impressões digitais são pouco coletadas nesses casos, devido ao pressuposto de que as mesmas não trazem informações sobre o criminoso, mas somente do usuário do veículo. Por fim, como os *ciber Crimes* vêm crescendo de maneira progressiva no Brasil e atingindo grande parte da população brasileira, é evidente a necessidade de analisar o uso do DNA como ferramenta para ajudar a solucionar alguns desses crimes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse estudo teve como objetivo geral analisar a viabilidade de obtenção de perfis de DNA e a qualidade dos mesmos em diferentes materiais de empunhaduras de facas, maçanetas e volantes de carros, e em teclados de computadores, por meio de situações simuladas de transferência direta para auxiliar a identificação de criminosos.

3.2 Objetivos específicos

Para cada um dos materiais testados, empunhaduras de facas, maçanetas e volantes de carros e teclados de computadores, foram avaliados os seguintes objetivos secundários:

a. Testar e comparar a eficácia de dois métodos de extração de DNA distintos para o processamento de amostras de DNA de toque, no que diz respeito a geração de perfis STR, correspondência alélica entre perfis referência e perfis de mistura, e quantidade de alelos verdadeiros e falsos obtidos.

b. Comparar os dados de quantificação das amostras extraídas para ambos os métodos de extração utilizados.

c. Avaliar a relação entre os dados de quantificação e a qualidade do perfil gerado.

d. Avaliar e comparar a influência de diferentes tipos de substratos na obtenção de perfis STR.

e. Avaliar o *status shedder* de indivíduos submetidos às diferentes situações experimentais, a fim de verificar se esta variável se mantém.

f. Avaliar as diferenças de deposição de material genético entre os sexos feminino e masculino.

g. Analisar a utilidade dos perfis STR gerados para a identificação de criminosos, baseando-se nos critérios estabelecidos pelo Manual de

Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos, utilizado para análises forenses no Brasil, para inserção de perfis no Banco Nacional.

h. Avaliar a possibilidade de obtenção de perfis genéticos masculinos com o kit PowerPlex Y 23 System em amostras de mistura em que não tenham sido possíveis obter perfis STR com o kit PowerPlex Fusion System.

4. MÉTODOS

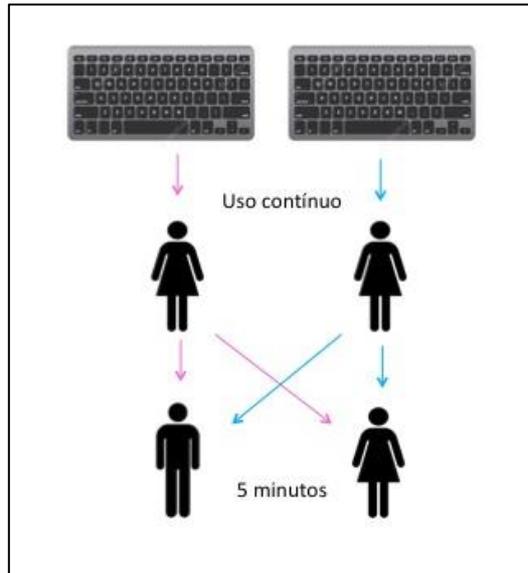
4.1 Desenho dos experimentos simulados

Com o intuito de atingir os objetivos propostos, situações simuladas de atos criminosos foram elaboradas, envolvendo empunhaduras de facas, volantes e maçanetas de carros e teclados de computadores. Ao todo, nove indivíduos não aparentados participaram do estudo, sendo quatro homens e cinco mulheres, na faixa etária de 24 a 64 anos. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, informativo sobre os objetivos da pesquisa e procedimentos que seriam realizados (Anexo A). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Número do Parecer: 2.056.555 - Anexo B).

As três situações simuladas estão descritas a seguir.

4.1.1 *Experimento com teclado de computador*

A primeira situação simulada foi realizada em teclados de dois computadores distintos, cujas proprietárias (doadoras primárias) os utilizavam com exclusividade. Cada doador secundário (um homem e uma mulher) manuseou cada teclado por um período de 5 minutos, tempo este suficiente para a realização de um *cibercrime* (Figura 5). No intervalo de um experimento para outro os teclados foram esterilizados com álcool 70% para evitar possível contaminação do experimento anterior.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

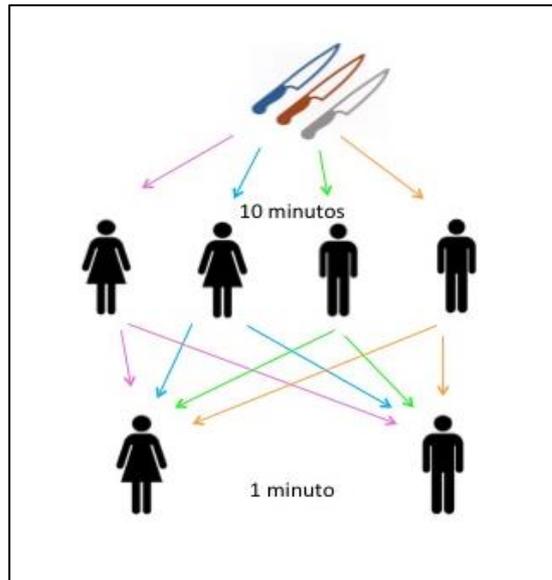
Figura 5 – Esquema representativo dos experimentos em teclados de computadores.

Os experimentos foram realizados em dias distintos e em duplicata a fim de que dois diferentes métodos de extração fossem testados.

4.1.2 *Experimento com arma branca – facas*

As amostras coletadas foram provenientes do manuseio de facas com três materiais diferentes de empunhaduras (aço, madeira e polipropileno). Antes da montagem dos experimentos esses utensílios foram esterilizados com álcool 70% e submetidos à luz U.V. para eliminar qualquer resíduo de contaminação. Dois homens e duas mulheres atuaram como os doadores primários (principais) e cada um manuseou dois conjuntos compostos pelas 3 facas, por 10 minutos cada uma, simulando o uso habitual desses utensílios pelo proprietário.

Em seguida, uma mulher (doadora secundária) manuseou um dos conjuntos tocado por cada um dos quatro doadores primários, e um homem (doador secundário) fez o mesmo procedimento, manuseando os outros conjuntos não tocados pela mulher. O toque de cada doador secundário ocorreu por 1 minuto em cada faca, simulando uma cena de crime utilizando essas armas brancas, conforme o Figura 6.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

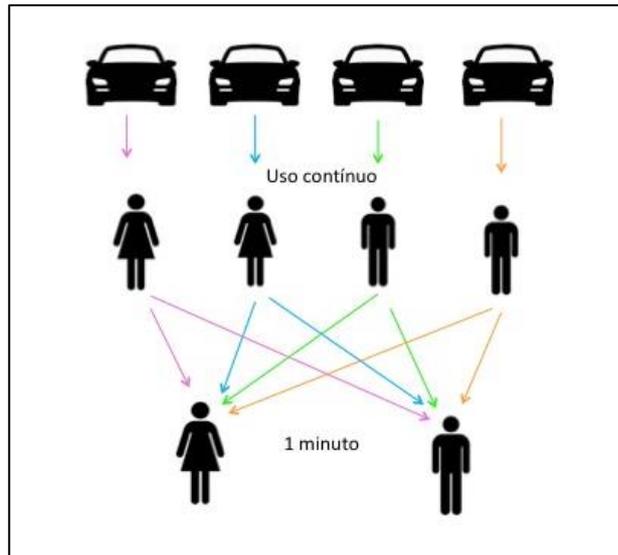
Figura 6 – Esquema representativo de experimento com armas brancas (facas)

Cada experimento foi realizado em duplicata, em dias distintos, a fim de que dois métodos de extração fossem testados. Os experimentos foram realizados em laboratório com as condições ambientais (temperatura, umidade e pressão) padronizadas e controladas.

4.1.3. Experimento com volantes e maçanetas de carros

Na última situação simulada foram utilizados quatro carros, cujos proprietários eram duas mulheres e dois homens (doadores primários). Os doadores secundários (um homem e uma mulher) manusearam as maçanetas e volantes dos quatro veículos (já previamente usados por seus donos), em dias diferentes, durante um minuto cada (Figura 7).

Os experimentos em maçanetas foram realizados em diferentes condições ambientais a fim de comparar a possibilidade de obtenção do perfil de STR em cada uma, ou seja, metade das amostras de maçanetas de carros foram obtidas em dias úmidos e chuvosos, já a outra metade em dias quentes e secos. Após cada experimento, a maçaneta e o volante foram esterilizados com álcool 70% para que um novo ensaio fosse criado, livre do material biológico do experimento anterior.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Figura 7 – Esquema representativo dos experimentos em volantes e maçanetas de carros.

Assim como nas simulações anteriores, cada experimento foi feito em duplicata e em dias diferentes para testar dois distintos métodos de extração de DNA.

4.2 Sumário dos experimentos elaborados

Foram elaborados, no total, 104 experimentos, sendo eles, 8 em teclados de computadores, 48 em empunhaduras de facas e 48 em volantes e maçanetas de carros (Quadros 1, 2 e 3, respectivamente). Com o intuito de simular situações reais de crimes, os participantes realizaram suas atividades diárias normalmente e nenhum método de controle de transferência secundária (como por exemplo, lavagem das mãos) foi aplicado, possibilitando, portanto, o aparecimento de alelos desconhecidos nos perfis genéticos produzidos posteriormente.

Quadro 1 – Experimentos em teclados de computadores, considerando os participantes e métodos de extração de DNA usados.

Experimento	Participantes	Método de Extração
T1		DNA IQ
T2	Doadora primária 1 (M1) + doadora secundária (M2)	Casework Direct Kit
T3		DNA IQ
T4	Doadora primária 2 (M3) + doadora secundária (M2)	Casework Direct Kit
T5		DNA IQ
T6	Doadora primária 1 (M1) + doador secundário (H1)	Casework Direct Kit
T7		DNA IQ
T8	Doadora primária 2 (M3) + doador secundário (H1)	Casework Direct Kit

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Quadro 2 – Experimentos com empunhaduras de facas, considerando os participantes e métodos de extração de DNA usados. Cada experimento foi realizado com os três tipos de facas usados (aço, madeira e polipropileno).

Experimento	Participantes	Método de Extração
F1		DNA IQ
F2	Doadora primária 1 (M1) + doadora secundária (M2)	Casework Direct Kit
F3		DNA IQ
F4	Doadora primária 2 (M4) + doadora secundária (M2)	Casework Direct Kit
F5		DNA IQ
F6	Doadora primária 1 (M1) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
F7		DNA IQ
F8	Doadora primária 2 (M4) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
F9		DNA IQ
F10	Doador primário 1 (H2) + doadora secundária (M2)	Casework Direct Kit
F11		DNA IQ
F12	Doador primário 2 (H3) + doadora secundária (M2)	Casework Direct Kit
F13		DNA IQ
F14	Doador primário 1 (H2) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
F15		DNA IQ
F16	Doador primário 2 (H3) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Quadro 3 – Experimentos realizados com veículos, considerando os participantes e métodos de extração de DNA usados.

Experimento	Participantes	Método de Extração
C1		DNA IQ
C2	Doadora primária 1 (M5) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C3		DNA IQ
C4	Doadora primária 2 (M3) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C5		DNA IQ
C6	Doadora primária 1 (M5) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C7		DNA IQ
C8	maçanetas e volantes (sol) Doadora primária 2 (M3) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C9		DNA IQ
C10	Doador primário 1 (H1) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C11		DNA IQ
C12	Doador primário 2 (H3) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C13		DNA IQ
C14	Doador primário 1 (H1) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C15		DNA IQ
C16	Doador primário 2 (H3) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C17		DNA IQ
C18	Doadora primária 1 (M5) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C19		DNA IQ
C20	Doadora primária 2 (M3) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C21		DNA IQ
C22	Doadora primária 1 (M5) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C23		DNA IQ
C24	Doadora primária 2 (M3) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C25	maçanetas (chuva)	DNA IQ
C26	Doador primário 1 (H1) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C27		DNA IQ
C28	Doador primário 2 (H3) + doadora secundária (M1)	Casework Direct Kit
C29		DNA IQ
C30	Doador primário 1 (H1) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit
C31		DNA IQ
C32	Doador primário 2 (H3) + doador secundário (H4)	Casework Direct Kit

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

O Quadro 4 evidencia a atuação de todos os participantes como doadores primários e/ou secundários para cada um dos experimentos realizados.

Quadro 4 – Atuação dos participantes em cada um dos experimentos realizados. Mulheres estão enumeradas de 1 a 5 e representadas pela letra “M”. Homens estão enumerados de 1 a 4 e representados pela letra “H”. T=teclado, F=faca e C=carro.

Participantes	Doador primário	Doador secundário
M1	T1/T2, T5/T6, F1/F2, F5/F6	C1/C2, C3/C4, C9/C10, C11/C12, C17/C18, C19/C20, C25/C26, C27/C28
M2	_____	T1/T2, T3/T4, F1/F2, F3/F4, F9/F10, F11/F12
M3	T3/T4, T7/T8, C3/C4, C7/C8, C19/C20, C23/C24	_____
M4	F3/F4, F7/F8	_____
M5	C1/C2, C5/C6, C17/C18, C21/C22	_____
H1	C9/C10, C13/C14, C25/C26, C229/C30	T5/T6, T7/T8
H2	F9/F10, F13/F14	_____
H3	F11/F12, F15/F16, C11/C12, C15/C16, C27/C28, C31/C32	_____
H4	_____	F5/F6, F7/F8, F13/F14, F15/F16, C5/C6, C7/C8, C13/C14, C15/C16, C21/C22, C23/C24, C29/C30, C31/C32

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

4.3 Coleta dos materiais biológicos dos experimentos

Foram coletadas amostras referências dos 9 participantes dos experimentos simulados, para obtenção dos seus perfis genéticos individuais, que serviram de controle para as análises dos perfis de misturas. Sangue foi coletado da ponta do dedo médio da mão em papel de FTA (Whatman®) de cada um dos participantes citados.

O material biológico depositado nos experimentos foi coletado das empunhaduras das facas, das maçanetas, volantes e dos teclados por meio da técnica do swab duplo (Sweet et al., 1997; Alessandrini et al., 2003; Pang e Cheung, 2007; Phipps e Petricevic, 2007; Verdon, et al., 2013; Samie et al., 2016), que consiste no uso da ponta de um swab estéril umedecido em água

MilliQ, friccionado sobre a superfície de forma perpendicular a este, seguido do uso de outro swab estéril, desta vez seco, friccionado da mesma forma que o primeiro. Nos teclados, o material foi recuperado das teclas “Enter” e “Espaço”, pois são utilizadas com maior frequência.

4.4 Extração e Quantificação de DNA

Um picotador de papel foi usado para cortar uma circunferência de 3 milímetros do papel FTA contendo sangue do material de referência individual. O fragmento de FTA cortado foi lavado durante 15 minutos com 200uL de solução de purificação de FTA (MGM Plus), seguido de duas lavagens com 200uL de água milliQ, durante 15 minutos. Na sequência, a circunferência do papel FTA foi colocada para secagem em estufa a 56°C, por 20 minutos. Posteriormente, a mesma foi utilizada para amplificação dos marcadores STR com os kits de amplificação do DNA descritos a seguir.

Dois métodos de extração de DNA foram testados a fim de comparar a eficácia de ambos nas amostras coletadas com swabs, provenientes dos experimentos. Como cada ensaio foi feito em duplicata, todos foram submetidos à extração do DNA das células epiteliais com os kits DNA IQ System (Promega Corporation) e Casework Direct Kit (Promega Corporation).

Em ambos os casos, após a coleta do material biológico depositado em cada objeto, foi cortado cerca de 0,5 centímetro do algodão dos swabs com bisturis estéreis para, em seguida, colocá-los em tubos tipo Eppendorf de 2mL. Ambas as extrações foram realizadas seguindo os protocolos dos fabricantes. Como os dois swabs coletados (seco e molhado) de um determinado ensaio eram provenientes da fricção de um mesmo material (faca, volante, maçaneta ou teclado), seus fragmentos cortados foram colocados no mesmo Eppendorf para extração, a fim de resultar em um único perfil de DNA para ambos, garantindo a maior quantidade de células possível (Sweet et al., 1997).

A quantificação do material genético extraído para cada amostra foi realizada com o uso do Kit Quantifiler Trio (Applied Biosystems), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Este método proporciona dados sobre

fragmentos grandes (>200 bases) e pequenos (>80 bases) existentes na amostra, sendo que a proporção entre ambos define o grau de degradação da mesma.

4.5 Amplificação de DNA

Após a extração, a amplificação do DNA foi realizada por técnica de PCR multiplex utilizando-se o kit PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation), que possui primers para amplificação de 22 marcadores STR autossômicos, que incluem o D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, D22S1045, FGA, Penta E, Penta D, 1 marcador do cromossomo Y, DYS391, além da amelogenina para os cromossomos sexuais, conforme protocolo descrito pelo fabricante. Para a reação de amplificação, 5 µl do PowerPlex Fusion Master Mix e 5 µl of PowerPlex Fusion Primer Mix foram usados para cada amostra. O volume de entrada de DNA utilizado variou de 5 a 15 µl num volume de reação final de 15 ou 25 µl, respectivamente. Nesse contexto, para amostras extraídas com DNA IQ System, foram adicionados 5 µl de DNA e para amostras extraídas com Casework Direct Kit foram adicionados 15 µl de DNA, tendo em vista os protocolos e as limitações da quantidade de produto extraído para ambos os kits.

Com o intuito de verificar a possibilidade de obtenção de novos perfis genéticos, amostras que não resultaram em perfis com o kit PowerPlex® Fusion System, e que continham um indivíduo do sexo masculino como doador secundário, foram amplificadas com o kit PowerPlex® Y 23 System, que possui primers para amplificação de 23 marcadores STR do cromossomo Y, sendo eles DYS576, DYS389I/II, DYS448, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438 (penta), DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643 (penta), DYS393, DYS458, DYS385a/b, DYS456 e Y-GATA-H4. Para a reação de amplificação, 5 µl do PowerPlex Y23 Master Mix e 2,5 µl do PowerPlex Y23 Primer Pair Mix foram usados em cada amostra. O volume de entrada de DNA utilizado foi de 5 µl, resultando em um volume final de reação de 15µl.

Tanto para o PowerPlex Fusion System quanto para o PowerPlex Y23 System, amostras de controles positivo (controle de DNA 2800M) e negativo (água) foram amplificadas para monitorar o sucesso da amplificação e os sinais de potenciais contaminações presentes nos reagentes. O número de ciclos usado para a reação de amplificação em amostras de DNA de toque foi elevado para 31, como sugerido pela equipe de suporte técnico da empresa responsável pelos kits. Para as amostras referência, foi mantida a ciclagem original do protocolo, ou seja, 26 ciclos. O tempo de injeção para eletroforese capilar das amostras oriundas de experimentos também foi ajustado de 5 para 10 segundos, conforme sugerido pelo suporte da Promega Corporation.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese capilar em sequenciador automático de quatro capilares de 36cm ABI3130 (Applied Biosystems) e analisados no Software GeneMapper ID versão 3.2. Durante a geração de perfis STR, somente os picos acima de 50 RFU foram interpretados pelo software, valor padrão de análises forenses no laboratório de DNA da Polícia Civil da cidade de São Paulo. O limiar estocástico foi ajustado para 150 RFU.

4.6 Análise dos dados e análise estatística

Após a obtenção dos perfis genéticos, o número total de marcadores STR com correspondência alélica entre o observado e o esperado foi calculado e representado como porcentagem para ambos os doadores presentes nas misturas, considerando que a composição alélica de cada indivíduo já era conhecida graças aos perfis referência obtidos de amostras de sangue. Assim, foi possível calcular a porcentagem média de alelos coincidentes para doadores primários e secundários em cada suporte utilizado, para ambos os métodos de extração. Com base nesses dados, foi possível analisar o impacto do tipo de superfície e a influência de fatores ambientais para geração de perfis genéticos. Os resultados obtidos nessa etapa também permitiram comparar a eficácia de ambos os métodos de extração testados.

Da mesma forma, foi possível contabilizar o número de marcadores STR com correspondência alélica para cada doador da mistura, verificando quantos

desses marcadores tinham *drop-out* alélico para o perfil do indivíduo e quantos deles continham ambos os alelos da pessoa. Uma vez estabelecidos os marcadores STR com correspondência alélica para cada doador da mistura, foi possível analisar a utilidade dos perfis com base no Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos de (2019), que estabeleceu um mínimo de 8 marcadores STR presentes no CODIS original como necessários para considerar um perfil útil para uma investigação. Assim, foi verificada a quantidade de perfis com pelo menos 8 marcadores STR com correspondência alélica para doadores secundários (“criminosos”) das misturas, considerando tanto os 13 marcadores presentes no CODIS original, quanto os 20 marcadores presentes no CODIS atual, permitindo comparar a geração de perfis úteis para ambos os métodos de extração.

Uma vez conhecida a quantidade de alelos para ambos os doadores das misturas obtidos nos perfis oriundos dos experimentos, foi possível calcular a quantidade de alelos extras obtidos em cada perfil. Dessa forma, foi comparada a porcentagem média de alelos extras e verdadeiros para todos tipos de suportes utilizados e kits de extração testados.

Para avaliação do *status shedder* no estudo, foi possível analisar a quantidade de marcadores STR com correspondência alélica para participantes que atuaram em diferentes experimentos.

Para a análise da influência do sexo no estudo, os perfis foram categorizados como nulos, parciais ou completos de acordo com a porcentagem de alelos recuperados de cada doador em cada experimento. Esses dados foram comparados com cada uma das configurações de experimentos realizadas (duas mulheres, uma mulher e um homem, um homem e uma mulher ou dois homens).

Com relação à análise estatística, o teste Kruskal-Wallis foi realizado para checar se os kits de extração, de maneira geral, se comportaram de maneira diferente para cada uma das superfícies testadas. Para isso, o nível de significância estabelecido foi de 0,05. O teste 7 Wilcoxon Rank Sum foi usado para comparar um kit contra o outro em cada superfície, aplicando-se um nível de

significância de 0,007, considerando os sete diferentes tipos de superfícies usados ($0.05 \div 7$). Um teste Chi-Quadrado foi aplicado para comparar os kits de extração com relação à produção de perfis úteis para o Banco Nacional de Perfis Genéticos da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos.

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação de amostras

Após a extração de DNA, todas as 104 amostras coletadas foram quantificadas com o kit Quantifiler Trio™ (Thermo Fisher), capaz de quantificar fragmentos para os marcadores *Large* (>200 bases) e *Small* (>80 bases). As Tabelas 1, 2 e 3 a seguir mostram os dados obtidos nesta etapa para cada uma das amostras coletadas de teclados de computadores, facas de madeira, aço e polipropileno, e volantes e maçanetas de carros sob exposição ao sol e à chuva, respectivamente.

Tabela 1 – Valores de quantificação obtidos para marcadores *Large* e *Small* em teclados de computadores. Amostras ímpares foram extraídas com DNA IQ System e amostras pares extraídas com o Casework Direct Kit.

<i>Teclados de computadores</i>		
Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)
T1	0,000086	IDT
T2	0,00020	0,0029
T3	0,000078	IDT
T4	IDT	IDT
T5	0,001365	0,002737
T6	0,0027	0,01
T7	0,0018	0,0031
T8	0,0024	0,012

IDT – Indeterminado

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 2 – Valores de quantificação obtidos para marcadores *Large* e *Small* em empunhaduras de facas de madeira, aço e polipropileno. Amostras ímpares foram extraídas com DNA IQ System e amostras pares extraídas com o Casework Direct Kit.

<i>Madeira</i>			<i>Aço</i>			<i>Polipropileno</i>		
Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)	Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)	Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)
F1M	0,00032	IDT	F1A	IDT	IDT	F1P	IDT	IDT
F2M	0,000069	0,0010908	F2A	IDT	0,00068	F2P	0,00018	0,0016
F3M	IDT	IDT	F3A	IDT	IDT	F3P	IDT	IDT
F4M	0,000041	IDT	F4A	0,000085	IDT	F4P	0,000065	IDT
F5M	0,00032	IDT	F5A	0,00036	IDT	F5P	0,00033	IDT
F6M	0,000098	IDT	F6A	0,00011	IDT	F6P	0,000092	IDT
F7M	0,00027	IDT	F7A	IDT	0,0032	F7P	IDT	IDT
F8M	0,000060	IDT	F8A	0,000065	IDT	F8P	IDT	IDT
F9M	0,00054	IDT	F9A	IDT	IDT	F9P	0,0012	IDT
F10M	IDT	IDT	F10A	IDT	IDT	F10P	0,000053	IDT
F11M	IDT	IDT	F11A	0,0005	IDT	F11P	IDT	IDT
F12M	0,00016	IDT	F12A	0,0002	IDT	F12P	0,000098	IDT
F13M	IDT	IDT	F13A	IDT	IDT	F13P	0,0006	IDT
F14M	0,00015	IDT	F14A	IDT	0,0016	F14P	0,000094	IDT
F15M	IDT	IDT	F15A	IDT	IDT	F15P	0,00049	0,0016

Continuação - Tabela 2 – Valores de quantificação obtidos para marcadores *Large* e *Small* em empunhaduras de facas de madeira, aço e polipropileno. Amostras ímpares foram extraídas com DNA IQ System e amostras pares extraídas com o Casework Direct Kit.

Madeira			Aço			Polipropileno		
Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)	Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)	Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)
F16M	0,00014	IDT	F16A	0,000096	0,0016	F16P	0,00011	0,0013

IDT – Indeterminado
 FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 3 – Valores de quantificação obtidos para marcadores *Large* e *Small* em volantes e maçanetas de carros. Amostras ímpares foram extraídas com DNA IQ System e amostras pares extraídas com o Casework Direct Kit.

Volantes			Maçaneta (sol)			Maçanetas (chuva)		
Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)	Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)	Amostra	<i>Large</i> (ng/μl)	<i>Small</i> (ng/μl)
C1V	0,0097	0,012	C1M	0,0035	0,014	C17	IDT	IDT
C2V	0,0036	0,017	C2M	0,0016	0,0106	C18	0,00033	0,00295
C3V	0,0068	0,0036	C3M	0,0011	0,0022	C19	0,0047	0,00518
C4V	0,0012	0,0012	C4M	0,000094	IDT	C20	0,0071	0,01232
C5V	0,0012	IDT	C5M	0,00093	IDT	C21	0,0037	0,01453
C6V	0,0007	0,0029	C6M	0,000052	IDT	C22	0,0001	0,00137
C7V	0,0209	0,025	C7M	0,0007	IDT	C23	IDT	IDT
C8V	0,0044	0,015	C8M	0,0002	IDT	C24	0,00108	0,00467
C9V	0,0055	0,0026	C9M	0,005	0,010	C25	0,00063	IDT
C10V	0,00074	0,0031	C10M	0,005	0,049	C26	0,00005	IDT
C11V	0,0018	IDT	C11M	IDT	IDT	C27	IDT	IDT
C12V	0,00043	0,0059	C12M	IDT	IDT	C28	0,00014	IDT
C13V	0,0012	IDT	C13M	IDT	IDT	C29	IDT	IDT
C14V	0,0007	0,0014	C14M	0,000065	0,00085	C30	0,00056	0,00108
C15V	0,0012	0,0025	C15M	0,0035	IDT	C31	0,0022	IDT
C16V	0,00067	0,0026	C16M	0,0016	0,00091	C32	0,002	0,01529

IDT – Indeterminado
 FONTE: elaborado pela autora, 2021.

A média dos valores obtidos a partir da quantificação foi calculada para cada substrato, em ambos os métodos de extração (Tabela 4). Amostras em que os marcadores avaliados (*Small* e *Large*) resultaram em valores indeterminados foram contados e descritos com mais detalhes no Quadro 5. Amostras com quantificação positiva, mas ausência de perfil STR, estão descritas no Quadro 6.

Tabela 4 – Médias de quantificação obtidas em teclados de computadores, empunhaduras de facas, volantes e maçanetas de carros para ambos os métodos de extração.

Teclados de computadores						
Média (ng/µl)						
	DNA IQ		CASEWORK			
Large	0,00066		0,00018			
Small	0,0031		0,0085			

Empunhaduras de facas						
Madeira		Aço		Polipropileno		
Média (ng/µl)		Média (ng/µl)		Média (ng/µl)		
	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK
Large	0,00036	0,0001	0,00043	0,00011	0,0007	0,0001
Small	IDT	0,00109	0,00327	0,0013	0,0016	0,0015

Carros						
Volantes		Maçaneta (sol)		Maçaneta (chuva)		
Média (ng/µl)		Média (ng/µl)		Média (ng/µl)		
	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK
Large	0,0061	0,0016	0,0023	0,0011	0,0028	0,0014
Small	0,0094	0,0062	0,009	0,015	0,0098	0,0063

IDT – Indeterminado

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Quadro 5 – Amostras com valores indeterminados para os marcadores de quantificação *Small* e *Large*, relacionando quantas não obtiveram perfil algum (F13M, F15M, F1A, F3A, F9A, F15A, F3P, F11P, C11M, C12M, C13M, C17 E C29), e quantas geraram perfis de STR (T4, F3M, F10M, F11M, F10A, F13A, F1P, F7P, F8P, C15M, C23 e C27). CW- Casework Direct Kit.

	Nº de amostras com IDT para Small e Large		Sem perfil STR		Com perfil STR	
Teclado	1	-----	0	-----	1 CW	
Madeira	5	-----	2 DNA IQ	-----	2 DNA IQ 1 CW	
Aço	6	-----	4 DNA IQ	-----	1 DNA IQ 1 CW	
Polipropileno	5	-----	2 DNA IQ	-----	2 DNA IQ 1 CW	
Maçaneta (sol)	4	-----	2 DNA IQ 1CW	-----	1 DNA IQ	
Maçaneta (chuva)	4	-----	2 DNA IQ	-----	2 DNA IQ	

IDT – Indeterminado

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Quadro 6 – Amostras com valores positivos para quantificação, mas sem perfil STR (T3, F7M, F5A, F7A, F11A, F13P, F15P e C21).

Substrato	Nº de amostras com quantificação, mas sem perfil STR	Método de Extração
<i>Teclado</i>	1	DNA IQ
<i>Madeira</i>	1	DNA IQ
<i>Aço</i>	3	DNA IQ
<i>Polipropileno</i>	2	DNA IQ
<i>Maçaneta (chuva)</i>	1	DNA IQ

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

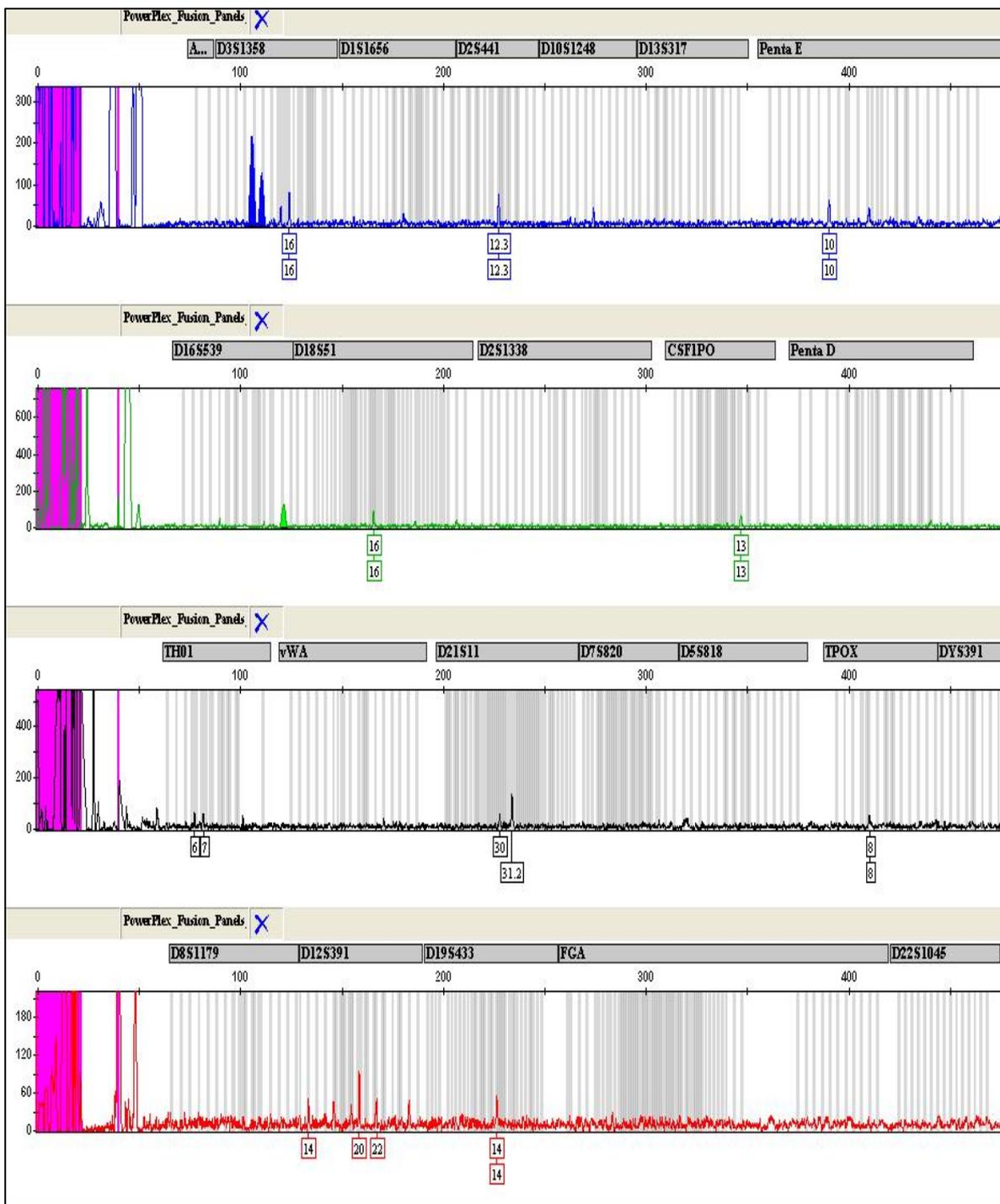
A Figura 8 exemplifica um perfil genético obtido a partir de uma amostra com resultado indeterminado para a quantificação de *Large* e *Small* e que apresentou um perfil parcial.

5.2 Obtenção de perfis com o kit PowerPlex® Fusion System

Dos 104 experimentos realizados, foi possível obter perfis STR com o uso do kit PowerPlex® Fusion System de 83 deles (79,8%), já os outros 21 (20,2%) não geraram nenhum perfil genético. Dos 21 ensaios em que não houve resultados positivos, um deles foi feito em teclado de computador (T3), 14 foram realizados com empunhaduras de facas, sendo 7 de aço (F1, F3, F5, F7, F9, F11 e F15), 4 de polipropileno (F3, F11, F13 e F15) e 3 de madeira (F7, F13, F15), e os 6 restantes foram provenientes de maçanetas de carros, sendo 3 em dias ensolarados (C11, C12 e C13) e 3 em dias chuvosos (C17, C21 e C29). Todas as amostras coletadas em volantes de carros geraram perfis STR.

Dos 21 ensaios em que não foi possível obter perfis genéticos, somente um foi extraído com o Casework Direct Kit (amostra de maçaneta de carro do experimento C12).

Dos 83 perfis obtidos, 7 correspondem a amostras coletadas de teclados de computadores, 34 correspondem a amostras de empunhaduras de facas e 42 são referentes a amostras de maçanetas e volantes de carros.



FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2021.

Figura 8- Perfil parcial obtido de uma amostra com resultado negativos para quantificação no experimento T4.

5.3 Percentual de alelos coincidentes para doadores primários e secundários

Para cada um dos 83 perfis STR gerados, calculou-se o percentual de alelos dos doadores primários e secundários presentes na mistura, baseando-se na razão do número de alelos destes indivíduos encontrados no perfil de mistura pelo total de alelos desses participantes presentes em seus perfis referências, gerados a partir da amostra de sangue coletada.

As Tabelas 5, 6 e 7 resumizam os resultados obtidos em teclados de computadores, empunhaduras de facas e maçanetas e volantes de carros, respectivamente. Os perfis STR gerados nos experimentos F3M e C15M não apresentaram alelos correspondentes para os doadores primários e nem para secundários.

Nos experimentos com teclados de computadores não foi possível gerar perfil genético para o ensaio T3 (Tabela 5). Nos experimentos com empunhaduras de facas não foi possível obter perfil genético para os ensaios F1A, F3A, F3P, F5A, F7A, F7M, F9A, F11A, F11P, F13P, F13M, F15A, F15M e F15P (Tabela 6). Nos experimentos com carros não foi possível obter perfis genéticos para os ensaios C11M, C12M, C13M, C17, C21 e C29 (Tabela 7).

Tabela 5 – Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de teclados de computadores. Experimentos ímpares foram extraídos com DNA IQ System e os pares extraídos com Casework Direct Kit.

Experimento	Nº total de alelos do doador primário *	Nº de alelos do doador primário encontrados no perfil gerado	%	Nº total de alelos do doador secundário *	Nº de alelos do doador secundário encontrados no perfil gerado	%
T1	40	6	15	40	4	10
T2	40	12	30	40	12	30
T4	40	3	7,5	40	2	5
T5	40	15	37,5	44	9	20,4
T6	40	39	97,5	44	21	47,7
T7	40	14	35	44	11	25
T8	40	35	87,5	44	22	50

*Os alelos foram calculados a partir do perfil referência, sendo que alelos em homozigose foram contabilizados apenas uma vez.

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 6 – Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de empunhaduras de facas de aço, madeira e polipropileno, representadas pelas letras “A”, “M” e “P”, respectivamente. Experimentos ímpares foram extraídos com DNA IQ System e os pares extraídos com Casework Direct Kit.

Experimento	Nº total de alelos do doador primário *	Nº de alelos do doador primário encontrados no perfil gerado	%	Nº total de alelos do doador secundário *	Nº de alelos do doador secundário encontrados no perfil gerado	%
F1P	40	0	0	40	1	2,5
F1M	40	4	10	40	2	5
F2A	40	8	20	40	9	22,5
F2P	40	9	22,5	40	11	27,5
F2M	40	13	32,5	40	12	30
F3M	44	0	0	40	0	0
F4A	44	3	6,8	40	6	15
F4M	44	12	27,3	40	16	40
F4P	44	8	18,2	40	8	20
F5M	40	13	32,5	42	18	42,8
F5P	40	4	10	42	4	9,5
F6A	40	14	35	42	6	14,3
F6M	40	13	32,5	42	11	25,2
F6P	40	11	27,5	42	10	23,8
F7P	44	4	9,1	42	7	16,6
F8A	44	6	13,6	42	3	7,1
F8M	44	4	9,1	42	4	9,5
F8P	44	19	43,2	42	25	59,5
F9M	46	4	8,7	42	5	12,5
F9P	46	9	19,5	40	6	15
F10A	46	6	13	40	3	7,5
F10M	46	1	2,2	40	2	5
F10P	46	4	8,7	40	9	22,5
F11M	40	3	7,5	40	5	12,5
F12A	40	6	15	40	7	17,5
F12M	40	4	10	40	11	27,5
F12P	40	3	7,5	40	6	15
F13A	46	10	21,7	42	11	26,2
F14A	46	18	36	42	19	45,2
F14M	46	14	39,1	42	15	35,7
F14P	46	6	13	42	6	14,3
F16A	40	16	40	42	6	14,3
F16M	40	11	27,5	42	8	19
F16P	40	11	27,5	42	5	11,6

* Os alelos foram calculados a partir do perfil referência, sendo que alelos em homozigose foram contabilizados apenas uma vez.

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 7 – Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de maçanetas e volantes de carros, representados pelas letras “M” e “V”, respectivamente. Amostras C18 em diante se referem aos experimentos realizados em maçanetas de carros sob exposição à chuva. Experimentos ímpares foram extraídos com DNA IQ System e os pares extraídos com Casework Direct Kit.

Experimento	Nº total de alelos do doador primário *	Nº de alelos do doador primário encontrados no perfil gerado	%	Nº total de alelos do doador secundário *	Nº de alelos do doador secundário encontrados no perfil gerado	%
C1M	44	15	34,1	40	17	42,5
C1V	44	23	52,3	40	28	70
C2M	44	23	52,3	40	25	62,5
C2V	44	33	75	40	28	70
C3M	40	5	12,5	40	3	7,5
C3V	40	37	92,5	40	14	35
C4M	40	14	35	40	10	25
C4V	40	39	97,5	40	23	57,5
C5M	44	16	81,8	40	12	30
C5V	44	31	70,4	40	18	45
C6M	44	14	31,8	40	12	30
C6V	44	38	86,4	40	24	60
C7M	40	7	17,5	40	10	25
C7V	40	30	75	40	25	62,5
C8M	40	9	22,5	40	9	22,5
C8V	40	39	97,5	40	36	90
C9M	44	16	36,4	42	31	73,8
C9V	44	8	18,2	42	7	16,6
C10M	44	25	56,8	42	28	66,6
C10V	44	28	63,6	42	29	69
C11V	40	37	92,5	42	15	35,7
C12V	40	38	95	42	17	40,5
C13V	44	22	55	42	8	19
C14M	44	13	32,5	42	12	28,6
C14V	44	44	100	42	18	42,8
C15M	40	0	0	42	0	0
C15V	40	11	27,5	42	9	21,4
C16M	40	22	55	42	14	33,3
C16V	40	38	95	42	21	50
C18	44	11	25	40	16	40
C19	40	19	47,5	40	11	27,5
C20	40	22	55	40	40	100
C22	44	17	38,6	40	16	40
C23	40	4	10	40	5	12,5

Continuação - Tabela 7 – Porcentagem de alelos dos doadores primários e secundários em perfis STR de maçanetas e volantes de carros, representados pelas letras “M” e “V”, respectivamente. Experimentos ímpares foram extraídos com DNA IQ System e os pares extraídos com Casework Direct Kit.

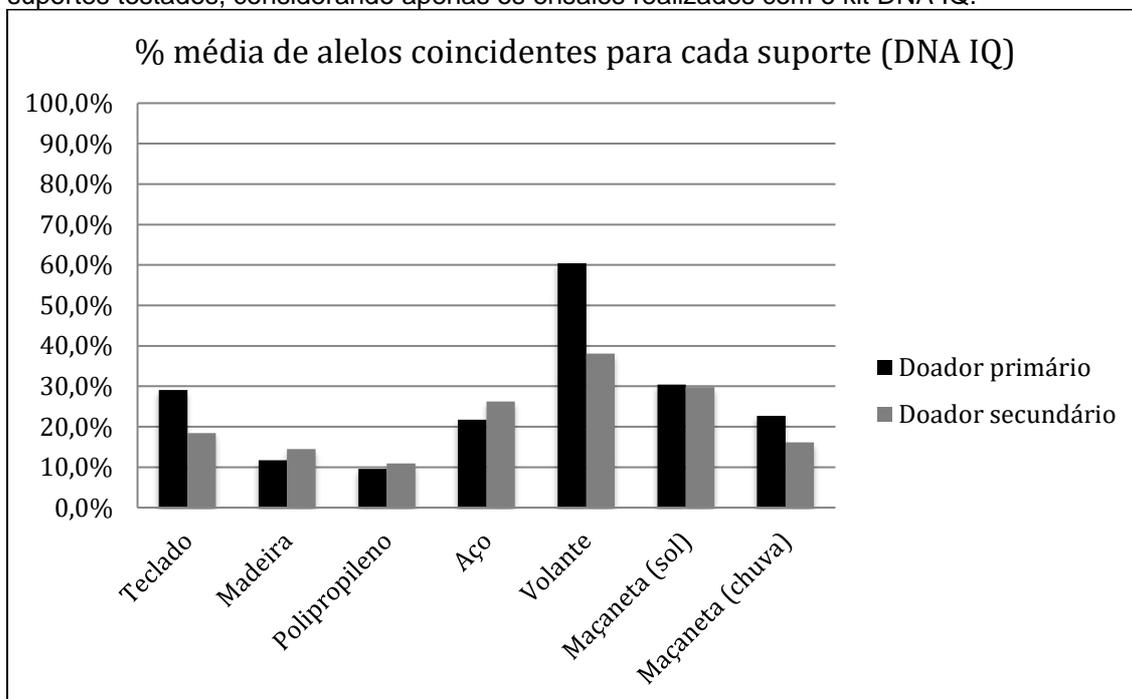
C24	40	35	87,5	40	38	95
C25	44	7	15,9	42	7	16,6
C26	44	5	11,4	42	7	16,6
C27	40	2	5	42	4	9,5
C28	40	4	10	42	11	26,2
C30	44	20	45,4	42	9	21,4
C31	40	14	35	42	6	14,3
C32	40	36	90	42	21	50

*Os alelos foram calculados a partir do perfil referência, sendo que alelos em homozigose foram contabilizados apenas uma vez.

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Com relação à porcentagem de alelos coincidentes para os perfis dos doadores primários, considerando somente os experimentos feitos com o kit DNA IQ, os teclados apresentaram uma média de 29,1%. Já as facas de madeira, polipropileno e aço, 11,7%, 9,6% e 21,7%, respectivamente. Os volantes obtiveram um percentual médio de 60,4%, enquanto as maçanetas em dias de sol e chuva obtiveram médias de 30,4% e 22,7%, respectivamente. No que diz respeito à porcentagem de alelos coincidentes para os perfis dos doadores secundários, os teclados obtiveram uma média de 18,4%, enquanto as empunhaduras de madeira, polipropileno e aço apresentaram médias de 14,5%, 10,9% e 26,2%, respectivamente. Os volantes de carros resultaram numa média de 38,1% de alelos, ao passo que as maçanetas em dias de sol e de chuva resultaram num percentual de 29,8% e 16,1%, respectivamente (Gráfico 1).

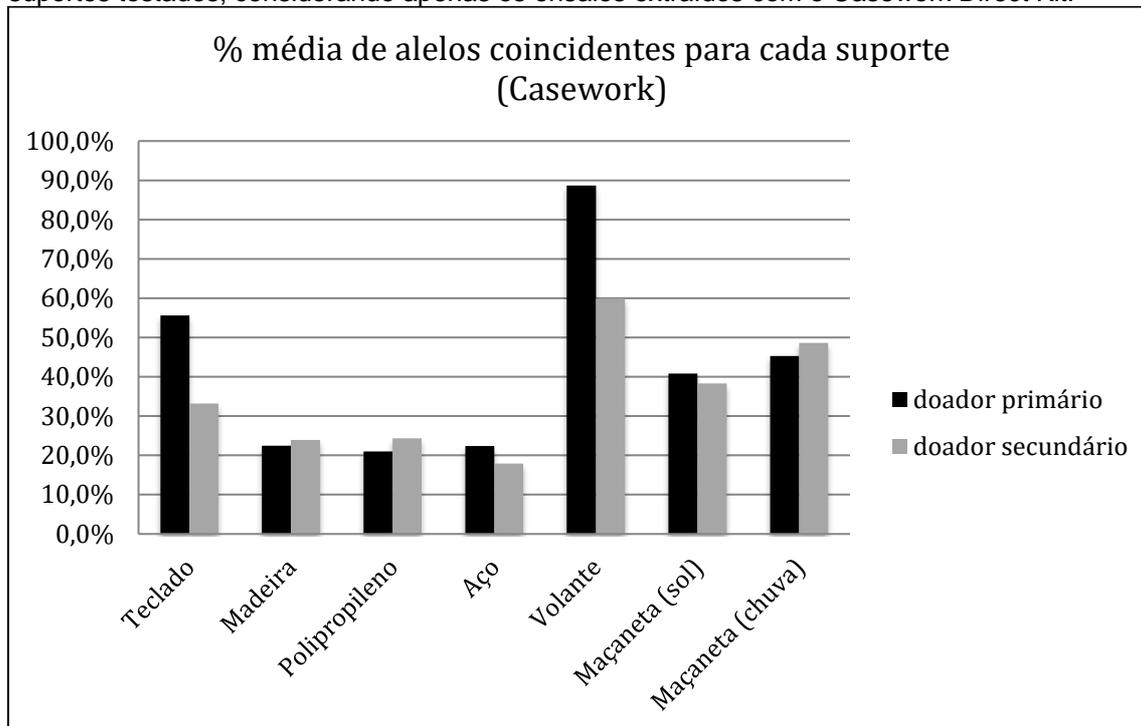
Gráfico 1 – Porcentagem média de alelos coincidentes entre os perfis gerado a partir dos experimentos e os perfis controles dos doadores primários e secundários para cada um dos suportes testados, considerando apenas os ensaios realizados com o kit DNA IQ.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Com relação à porcentagem de alelos coincidentes para os perfis dos doadores primários, considerando somente os experimentos feitos com o kit Casework Direct Kit, os teclados apresentaram uma média de 55,6%. Já as facas de madeira, polipropileno e aço, 22,5%, 21% e 22,4%, respectivamente. Os volantes, por sua vez, obtiveram um percentual médio de 88,7%, enquanto as maçanetas em dias de sol e chuva obtiveram médias de 40,8% e 45,3%, respectivamente. No que diz respeito à porcentagem de alelos coincidentes para os perfis dos doadores secundários, os teclados obtiveram uma média de 33,2%, enquanto as empunhaduras de madeira, polipropileno e aço geraram médias de 23,9%, 24,3% e 17,9%, respectivamente. Os volantes de carros resultaram numa média de 59,9% de alelos, ao passo que as maçanetas em dias de sol e de chuva resultaram num percentual de 38,8% e 48,6%, respectivamente (Gráfico 2).

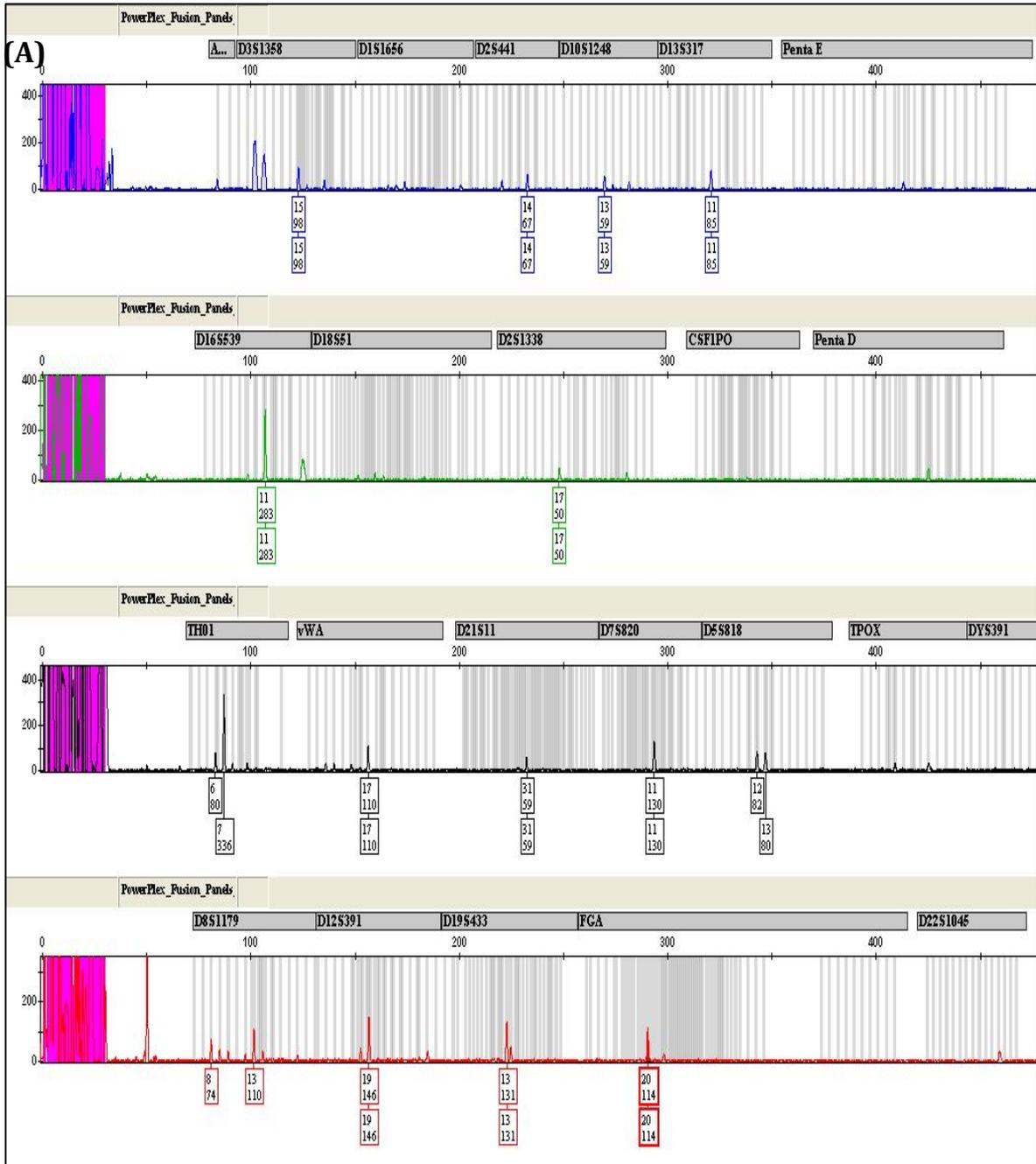
Gráfico 2 – Porcentagem média de alelos coincidentes entre os perfis gerados a partir dos experimentos e os perfis controles dos doadores primários e secundários para cada um dos suportes testados, considerando apenas os ensaios extraídos com o Casework Direct Kit.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

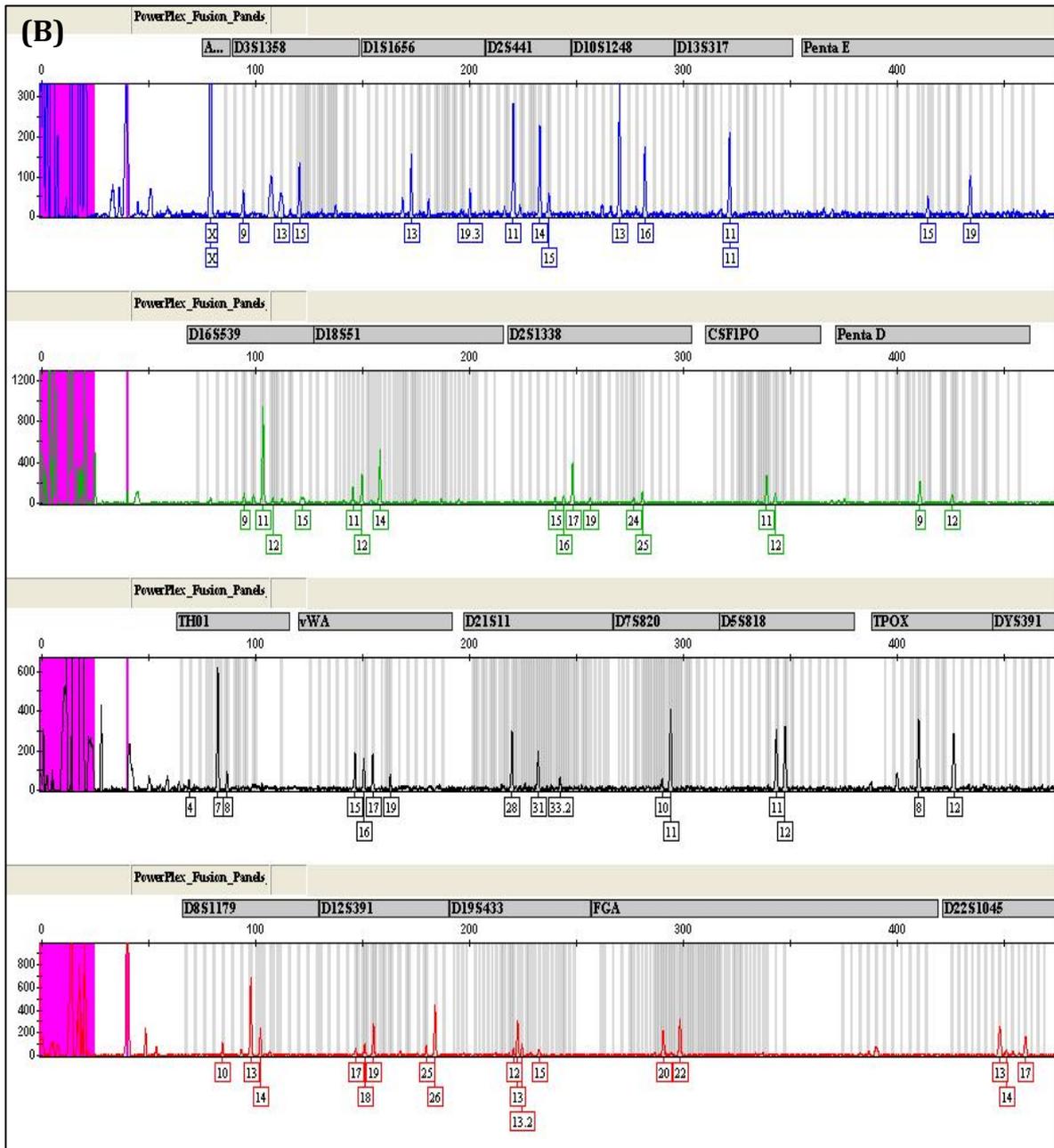
Quando analisadas em relação ao tipo de método de extração utilizado, as porcentagens médias de alelos coincidentes para doadores primários foram de 30,8% e 40,5% para os kits DNA IQ System e Casework Direct Kit, respectivamente. Já para os doadores secundários, essas medidas foram de 23,8% e 34,6%, respectivamente.

Ilustrando o desempenho de cada um dos kits de extração, as Figuras 9 e 10 a seguir comparam perfis obtidos em experimentos extraídos com DNA IQ System e Casework Direct Kit para amostras de teclados de computadores, enquanto as figuras 11 e 12 fazem o mesmo para experimentos em volantes de carros.



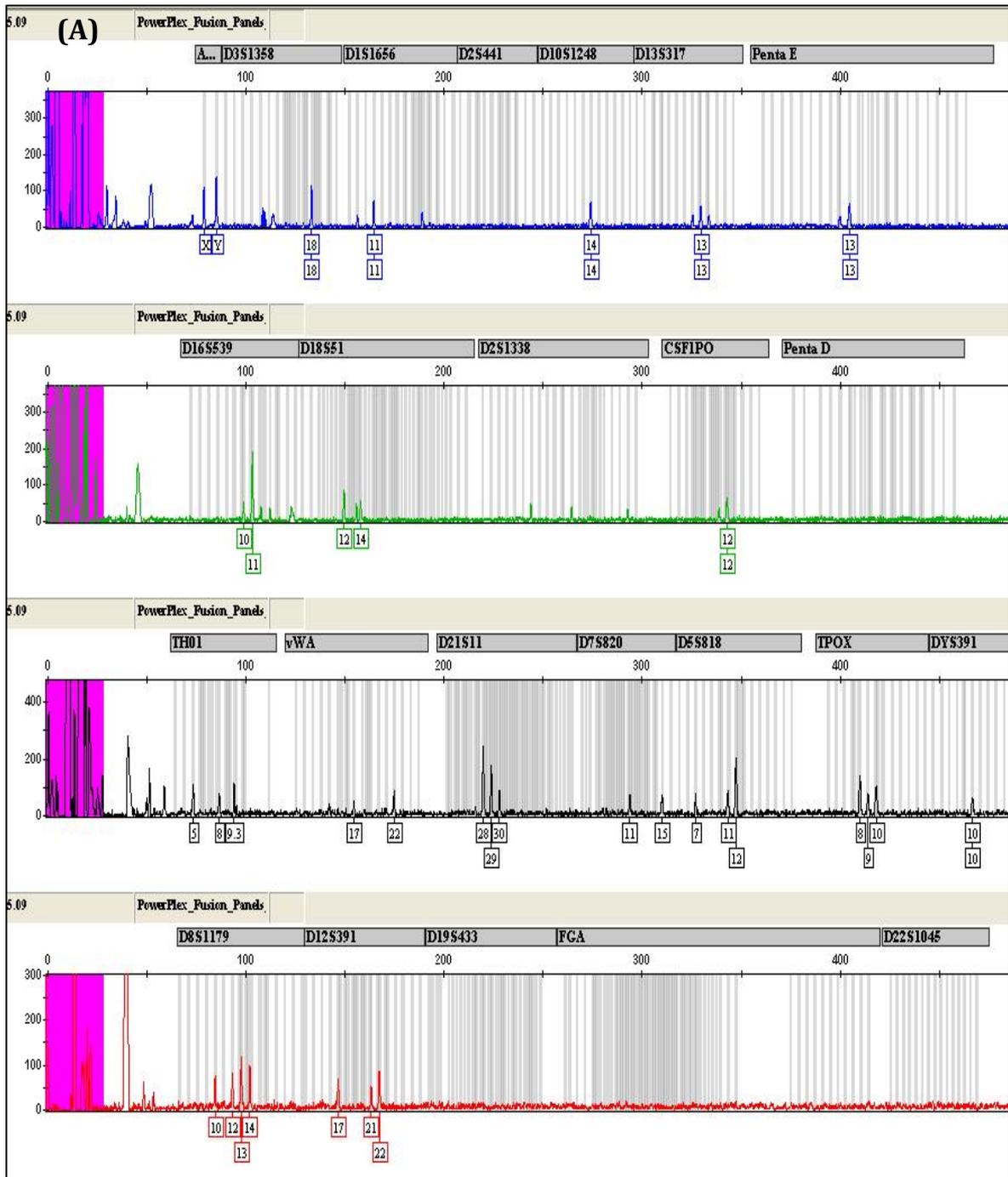
FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2021.

Figura 9 – Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento (com os mesmos participantes) em teclado de computador. Parte A - Experimento (T5), em que a extração do DNA foi feita com o kit DNA IQ.



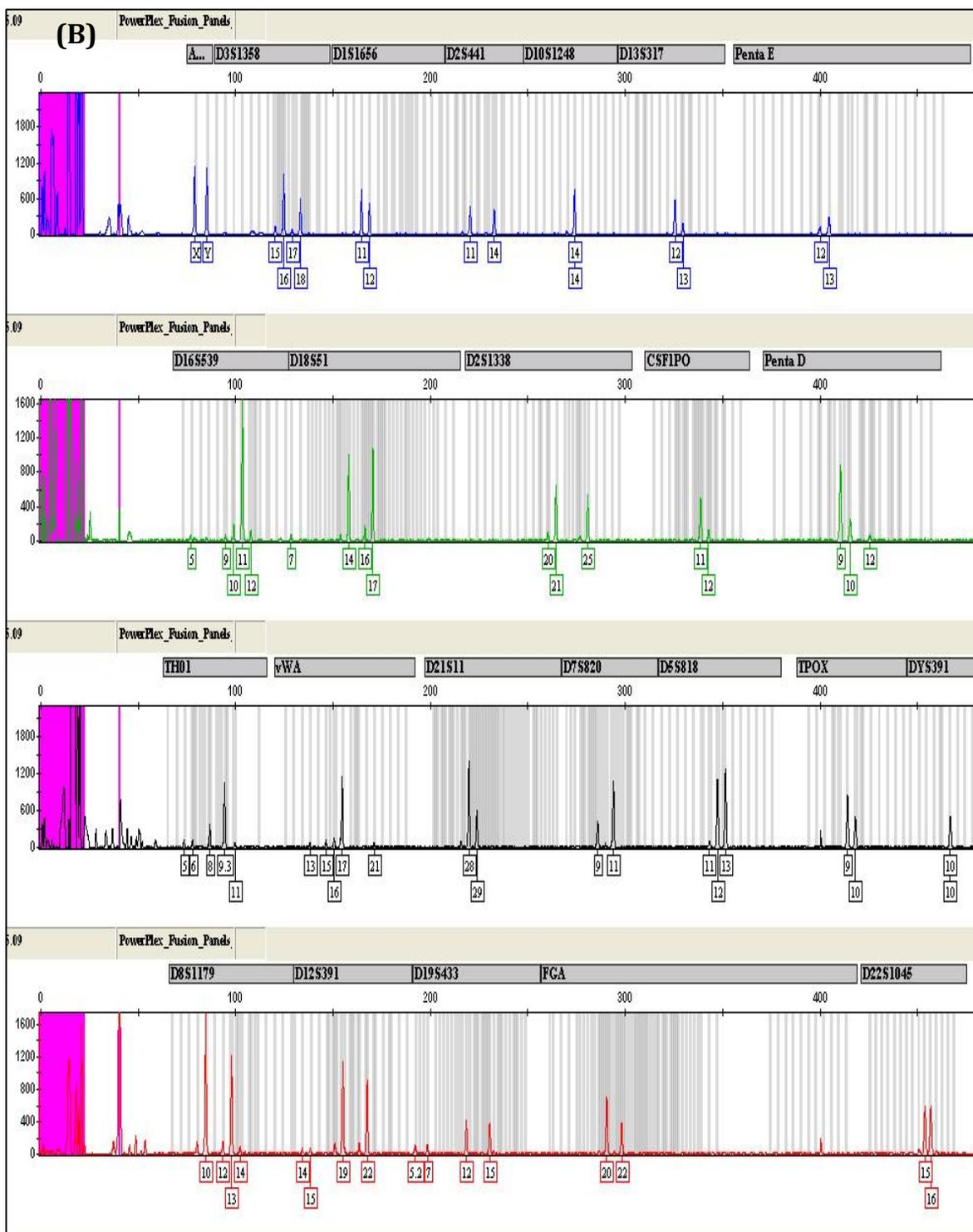
FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2021.

Figura 10 – Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento (com os mesmos participantes) em teclado de computador. Parte B - Experimento (T6), em que a extração de DNA foi realizada com o Casework Direct Kit



FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2021

Figura 11 – Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento (com os mesmos participantes) em volantes de carros. Parte A - Experimento (C13), em que a extração do DNA foi feita com o kit DNA IQ.



FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2021

Figura 12 – Comparação entre perfis obtidos de um mesmo experimento (com os mesmos participantes) em volantes de carros. Parte B - Experimento (C14), em que a extração de DNA foi realizada com o Casework Direct Kit.

5.4 Presença de artefatos nos perfis

Artefatos como *drop-in* (presença de alelos extras) e *drop-out* (perda de alelos) foram observados em todos os perfis obtidos. Para cada marcador STR presente nos perfis, foram analisados os *drop-out* alélicos em ambos os doadores da mistura. Além disso, a quantidade de alelos extras foi contabilizada para cada perfil gerado, permitindo estabelecer uma comparação entre ambos os métodos de extração.

5.4.1 Percentual de marcadores coincidentes para doadores primários e secundários

Com relação ao número de marcadores STR que mostraram resultado para cada perfil gerado, a Tabela 8 apresenta os resultados obtidos em teclados de computadores, considerando o número total de marcadores STR com correspondência alélica para os perfis referências dos doadores primários e secundários. Foram considerados também quantos destes marcadores possuíam correspondência parcial (com *drop-out* alélico) ou completa para estes participantes. As Tabelas 9 e 10 resumizam o mesmo para as empunhaduras de facas e volantes e maçanetas de carros, respectivamente.

Tabela 8 – Número de marcadores com resultado para os doadores primários e secundários em teclados de computadores, considerando marcadores com *drop-out* alélico (correspondência alélica parcial) do indivíduo e marcadores sem perda alélica (correspondência alélica completa).

Experimento	Nº total de marcadores com resultado no perfil do doador primário	Nº de marcadores com <i>drop-out</i> alélico no perfil do doador primário	Nº de marcadores sem perda alélica no perfil do doador primário	Nº total de marcadores com resultado no perfil do doador secundário	Nº de marcadores com <i>drop-out</i> alélico no perfil do doador secundário	Nº de marcadores sem perda alélica no perfil do doador secundário
T1	6	4	2	3	1	2
T2	12	9	3	10	5	5
T4	6	4	2	5	2	3
T5	15	10	5	8	5	3
T6	23	0	23	16	9	7
T7	12	6	6	9	4	5
T8	23	5	18	16	8	8

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 9 – Número de marcadores com resultado para os doadores primários e secundários em facas de madeira, polipropileno e aço (“M”, “P” e “A”), considerando marcadores com *drop-out* alélico (correspondência alélica parcial) do indivíduo e sem perda alélica (correspondência alélica completa).

Experimento	Nº total de marcadores com resultado no perfil do doador primário	Nº de marcadores com <i>drop-out</i> alélico no perfil do doador primário	Nº de marcadores sem perda alélica no perfil do doador primário	Nº total de marcadores com resultado no perfil do doador secundário	Nº de marcadores com <i>drop-out</i> alélico no perfil do doador secundário	Nº de marcadores sem perda alélica no perfil do doador secundário
F1P	0	0	0	1	1	0
F1M	4	2	2	2	2	0
F2A	7	4	3	5	1	4
F2P	7	3	4	8	5	3
F2M	10	4	6	9	5	4
F3M	0	0	0	0	0	0
F4A	3	2	1	5	3	2
F4M	10	5	5	12	6	6
F4P	6	3	3	5	2	3
F5M	12	9	3	16	11	5
F5P	4	4	0	4	4	0
F6A	11	4	7	6	6	0
F6M	10	2	8	10	10	0
F6P	9	3	6	9	8	1
F7P	3	1	2	4	4	0
F8A	6	4	2	3	3	0
F8M	4	3	1	4	4	0
F8P	17	10	7	15	5	10
F9M	4	3	1	4	2	2
F9P	8	8	0	7	5	2
F10A	4	2	2	3	3	0
F10M	1	1	0	2	2	0
F10P	4	4	0	7	3	4
F11M	2	1	1	4	3	1
F12A	6	4	2	5	2	3
F12M	8	6	2	11	7	4
F12P	3	1	2	6	6	0
F13A	8	5	3	7	3	4
F14A	12	5	7	14	7	7
F14M	11	7	4	12	7	5
F14P	5	5	0	6	4	2
F16A	14	4	10	6	6	0
F16M	9	6	3	7	5	2
F16P	11	5	6	5	5	0

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 10 – Número de marcadores com resultado para os doadores primários e secundários em volantes e maçanetas de carros (“V” e “M”), considerando marcadores com *drop-out* alélico (correspondência alélica parcial) do indivíduo e marcadores sem perda alélica (correspondência alélica completa).

Experimento	Nº total de marcadores com resultado no perfil do doador primário	Nº de marcadores com <i>drop-out</i> alélico no perfil do doador primário	Nº de marcadores sem perda alélica no perfil do doador primário	Nº total de marcadores com resultado no perfil do doador secundário	Nº de marcadores com <i>drop-out</i> alélico no perfil do doador secundário	Nº de marcadores sem perda alélica no perfil do doador secundário
C1M	13	10	3	14	7	7
C1V	17	10	7	19	15	4
C2V	20	5	15	20	8	12
C2M	15	6	9	21	11	10
C3M	5	2	3	3	0	3
C3V	23	3	20	10	8	2
C4M	11	6	5	10	6	4
C4V	23	1	22	18	8	10
C5M	11	5	6	9	3	6
C5V	21	9	12	17	12	5
C6M	15	11	4	11	6	5
C6V	24	4	20	19	6	13
C7M	7	5	2	11	8	3
C7V	17	0	17	19	8	11
C8M	10	7	3	9	7	2
C8V	24	0	24	22	3	19
C9M	11	8	3	20	3	17
C9V	6	2	4	6	4	2
C10M	18	9	9	21	9	12
C10V	18	6	12	21	7	14
C11V	23	3	20	12	7	5
C12V	23	2	21	14	11	3
C13V	18	9	9	6	2	4
C14M	11	7	4	10	7	3
C14V	24	0	24	14	10	4
C15M	0	0	0	0	0	0
C15V	9	3	6	6	3	3
C16M	17	5	12	10	5	5
C16V	24	1	23	14	5	9
C18	9	7	2	13	7	6
C19	14	5	9	9	7	2
C20	18	9	9	23	0	23
C22	13	8	5	13	7	6
C23	4	4	0	4	2	2
C24	24	4	20	23	3	20
C25	6	4	2	5	3	2
C26	4	2	2	5	2	3
C27	2	1	1	3	2	1
C28	4	2	2	9	4	5
C30	15	10	5	8	4	4
C31	14	5	9	6	4	2
C32	24	1	23	15	6	9

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Considerando que são necessários pelo menos 8 marcadores STR do CODIS original para que o perfil parcial proveniente de um vestígio possa integrar o Banco Nacional de Perfis Genéticos da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos, 2019), foi realizada uma análise para verificar quantos dos perfis gerados dos doadores secundários estariam dentro dessa categoria e, portanto, poderiam auxiliar na identificação de possíveis criminosos.

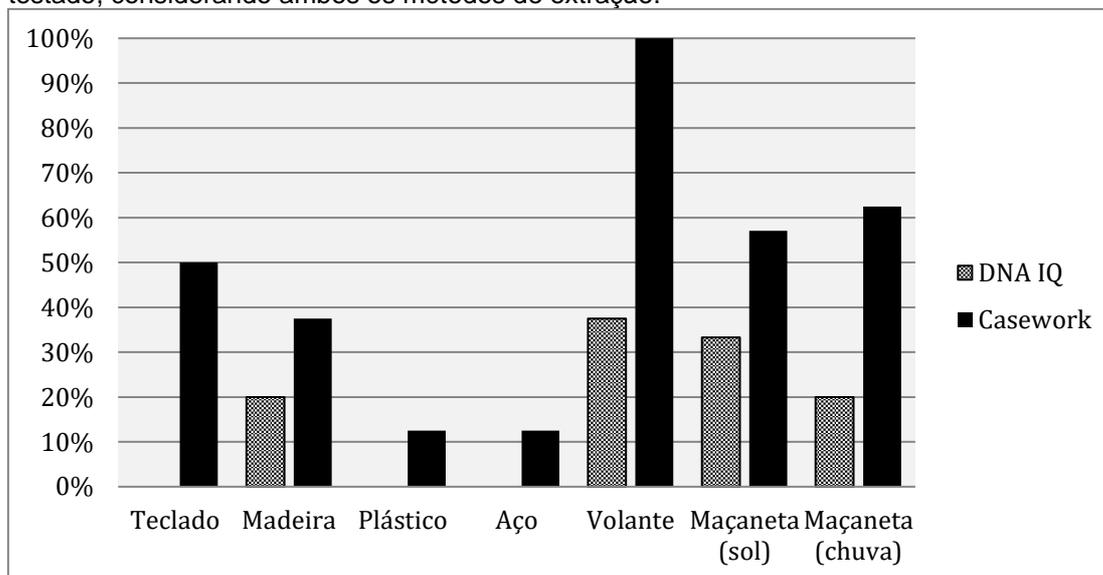
Dessa análise, foi possível observar que, dos 83 perfis gerados, 31 deles seriam úteis para uma investigação em relação ao perfil do doador secundário, sendo 24 (77.4%) oriundos de amostras de Casework e 7 (22.6%) provenientes de amostras de DNA IQ. Desses 31, 2 deles foram provenientes de teclados de computadores, 6 de empunhaduras de facas (sendo 1 de empunhadura de aço, 1 de polipropileno e 4 de madeira), 12 de maçanetas de carros (sendo 6 em dias ensolarados e 6 em dias chuvosos) e 11 de volantes de carros

Para amostras extraídas com DNA IQ, 0% dos perfis de teclados teriam pelo menos 8 marcadores com correspondência para doadores secundários. Já para as facas de madeira, polipropileno e aço, esses valores seriam de 20%, 0% e 0%, respectivamente. As maçanetas de carros em dias ensolarados e dias chuvosos, por sua vez, resultaram em 33,3% e 20% de perfis úteis, respectivamente, enquanto que os volantes de carros obtiveram 37,5% de perfis passíveis de integrar o Banco Nacional de Perfis Genéticos.

Para amostras extraídas com Casework, 50% dos perfis de teclados teriam pelo menos 8 marcadores com correspondência alélica para doadores secundários. Já para as facas de madeira, polipropileno e aço, esses valores seriam de 37,5%, 12,5% e 12,5%, respectivamente. As maçanetas de carros em dias ensolarados e dias chuvosos, por sua vez, resultaram em 57,1% e 62,5% de perfis úteis, respectivamente, enquanto que todos os perfis de volantes se mostraram passíveis de integrar o Banco Nacional de Perfis Genéticos.

O Gráfico 3 mostra os resultados descritos acima para ambos os métodos de extração.

Gráfico 3 – Porcentagem de perfis com pelo menos 8 marcadores STR dos 13 presentes no CODIS original com correspondência alélica para doadores secundários em cada substrato testado, considerando ambos os métodos de extração.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Uma vez que, em 2017 o CODIS foi atualizado com novos marcadores, totalizando 20 STRs ao sistema, uma nova análise foi realizada, pois ainda que não estejam presentes no CODIS original, esses outros marcadores também podem ser fundamentais para uma investigação criminal.

Assim, considerando a presença de pelo menos 8 marcadores STR com correspondência alélica para doadores secundários em qualquer um dos 20 marcadores do CODIS atual, dos 83 perfis gerados no estudo, 42 poderiam ser considerados úteis. Desses 42, 30 (71.4%) correspondem a amostras extraídas com Casework Direct Kit e 12 (28,6%) de amostras extraídas com o kit DNA IQ. Desses 42, 4 foram provenientes de teclados de computadores, 8 de empunhaduras de facas (sendo 1 de empunhadura de aço, 1 de polipropileno e 6 de madeira), 17 de maçanetas de carros (sendo 11 em dias ensolarados e 6 em dias chuvosos) e 13 de volantes de carros.

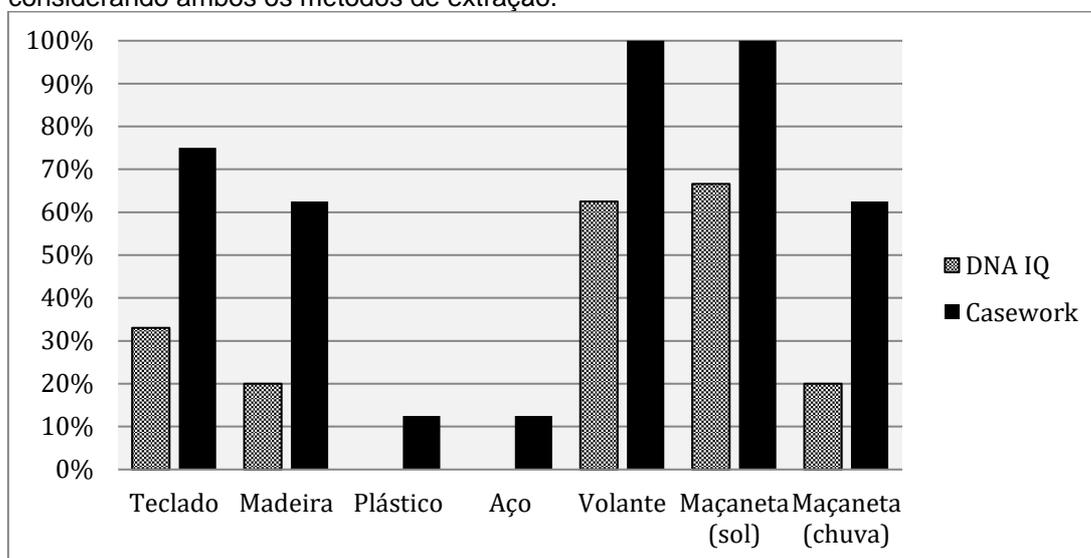
Nessa análise, para os experimentos cuja extração foi feita com o kit DNA IQ, 33,3% dos perfis de doadores secundários obtidos em teclados poderiam ser integrados à rede e colocados à disposição para intercâmbio entre laboratórios forenses. Com relação às facas de madeira, polipropileno e aço, as porcentagens médias de perfis que poderiam ser úteis foram de 20%, 0% e 0%, respectivamente. No que diz respeito aos ensaios realizados em carros,

experimentos feitos em maçanetas sob exposição ao sol obtiveram uma média de 66,6% de perfis com pelo menos 8 marcadores correspondentes ao perfil do doador secundário, enquanto as maçanetas em dias de chuva resultaram em 20%. Já os volantes apresentaram média de 62,5% para essa mesma análise.

Dentre os ensaios extraídos com o Casework Direct Kit, 75% dos perfis gerados em teclados possuíam ao menos 8 marcadores com correspondência alélica para os perfis dos doadores secundários. Já as facas de madeira, polipropileno e aço, 62,5%, 12,5% e 12,5%, respectivamente. Experimentos feitos em volantes e maçanetas sob exposição ao sol apresentaram 100% de perfis com pelo menos 8 marcadores STR correspondentes aos perfis de doadores secundários, enquanto as maçanetas em dias de chuva resultaram em uma média de 62,5% dos perfis.

O Gráfico 4 mostra os resultados descritos acima para ambos os métodos de extração.

Gráfico 4 – Porcentagem de perfis com pelo menos 8 marcadores STR dos 20 presentes no CODIS atual com correspondência alélica para doadores secundários em cada substrato testado, considerando ambos os métodos de extração.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

O Quadro 7 sumariza os resultados obtidos para a análise de utilidade dos perfis nos dois métodos de extração testados, considerando o número total de experimentos e quantos perfis foram gerados para cada substrato, quantos perfis possuíam pelo menos 8 dos 13 marcadores STR (CODIS original) com

correspondência alélica para os doadores secundários das misturas, e quantos perfis obtiveram pelo menos 8 dos 20 marcadores presentes no CODIS atual.

Quadro 7– Análise de utilidade dos perfis para ambos os métodos de extração em cada um dos substratos testados.

Número de experimentos para cada método de extração		Número de experimentos que geraram perfil STR		Perfis com pelo menos 8/13 STR do CODIS original		Perfis com pelo menos 8/20 marcadores STR do CODIS atual	
Teclado	8	4 DNA IQ	3 (75%)	0 (0%)	1 (33,3%)		
		4 CW	4 (100%)	2 (50%)	3 (75%)		
Madeira	16	8 DNA IQ	5 (62.5%)	1 (20%)	1 (20%)		
		8 CW	8 (100%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)		
Aço	16	8 DNA IQ	1 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)		
		8 CW	8 (100%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)		
Plástico	16	8 DNA IQ	4 (50%)	0 (0%)	0 (0%)		
		8 CW	8 (100%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)		
Volante	16	8 DNA IQ	8 (100%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)		
		8 CW	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)		
Maçaneta (sol)	16	8 DNA IQ	6 (75%)	2 (33.3%)	4 (66.6%)		
		8 CW	7 (87.5%)	4 (57.1%)	7 (100%)		
Maçaneta (chuva)	16	8 DNA IQ	5 (62.5%)	1 (20%)	1 (20%)		
		8 CW	8 (100%)	5 (62.5%)	5 (62,5,5%)		

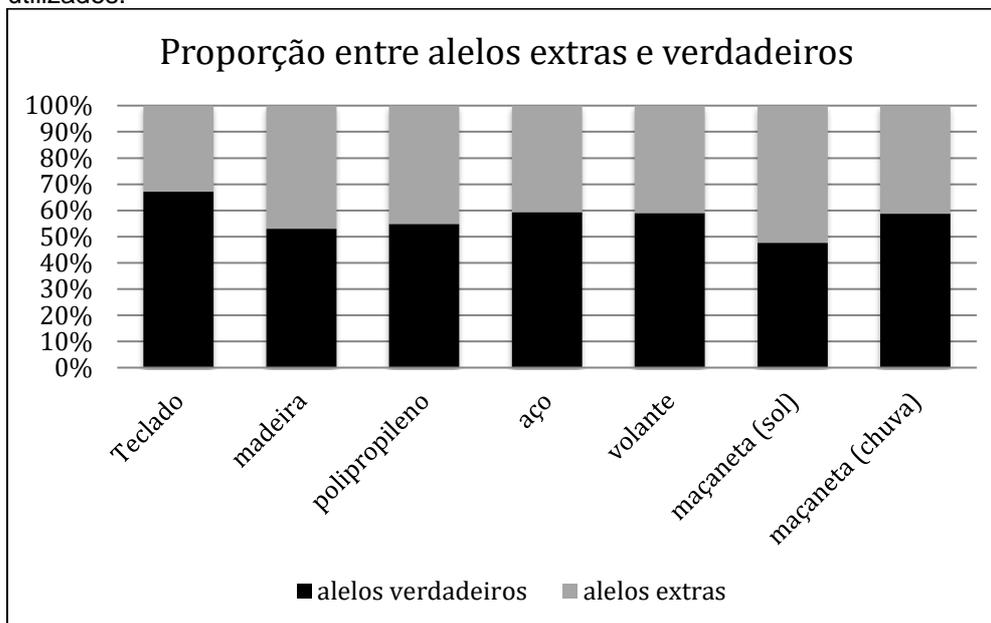
FONTE: elaborado pela autora, 2021.

5.4.2. Aparecimento de alelos extras (drop-in)

Em todos os perfis gerados, alelos extras (que não coincidem com os perfis dos doadores primários ou secundários) foram observados. Em teclados de computadores, constatou-se que em média 32,8% dos alelos eram extras. Já as facas de madeira, polipropileno e aço, obtiveram médias de 47%, 45,2% e 40,6% de alelos extras, respectivamente. Volantes de carro possuíram média de 41%, enquanto maçanetas sob exposição ao sol e à chuva obtiveram médias de 52,3% e 41,3%, respectivamente.

O Gráfico 5 evidencia a proporção entre alelos extras e alelos verdadeiros para cada um dos suportes utilizados, independentemente do método de extração.

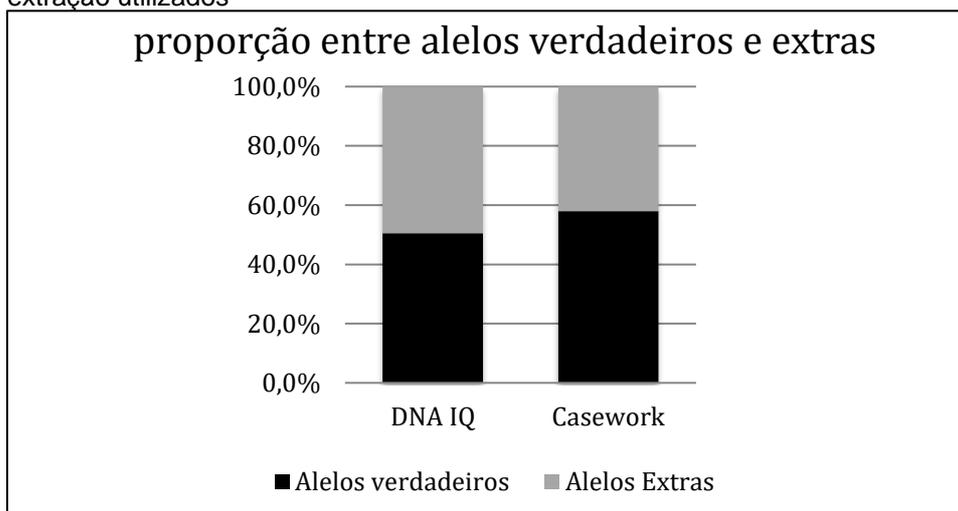
Gráfico 5 – Porcentagem média de alelos extras e verdadeiros para cada um dos suportes utilizados.



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

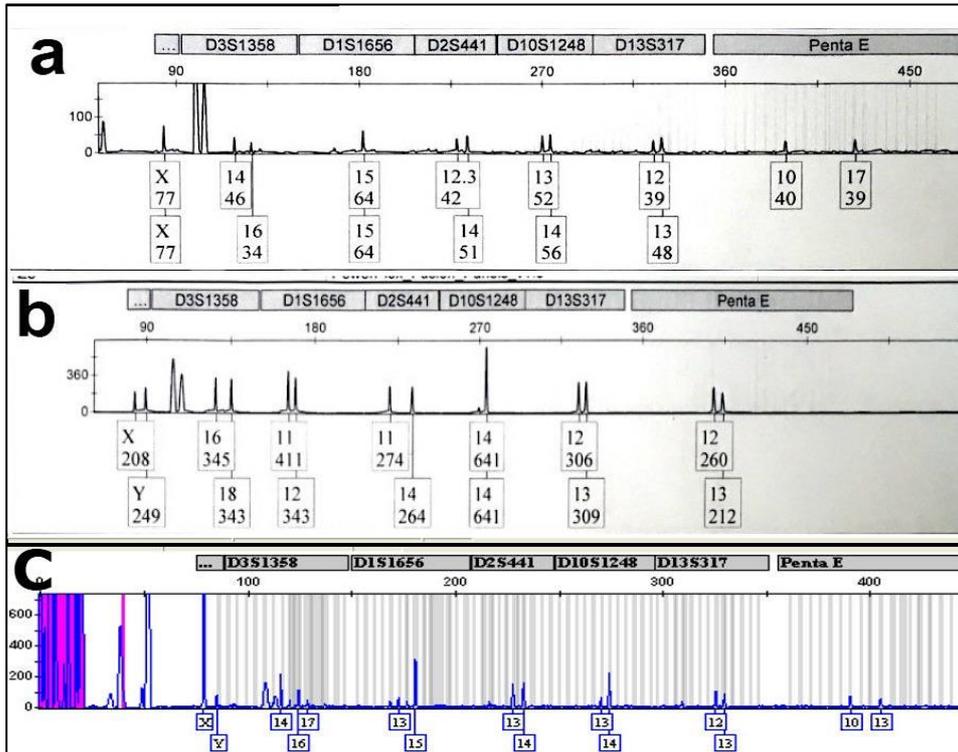
Ensaio cuja extração foi realizada com o kit DNA IQ System apresentaram uma média de 49,5% de alelos extras, enquanto aqueles feitos com o uso do Casework Direct Kit obtiveram média de 42,1% de alelos extras (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Porcentagem média de alelos extras e verdadeiros para cada um dos métodos de extração utilizados



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

A Figura 13 mostra exemplos de *drop-out* e *drop-in* alélicos encontrados em um dos experimentos realizados neste estudo.



FONTE: Laboratório de Biologia Molecular e Genética Forense do LIM40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Figura 13. Exemplo de perfil com *drop-out* e *drop-in alélico* no experimento T8. **a)** Parte do perfil STR referência do doador primário (indivíduo M3). **b)** Parte do perfil referência do doador secundário (indivíduo H1). **c)** Parte do perfil recuperado do experimento T8, com a mistura dos indivíduos M3 e H1. Para o doador primário houve evidência de *drop-out* dos alelos 12.3 (marcador D2S441) e 17 (marcador Penta E). Para o doador secundário, houve evidência de *drop-out* do alelo 18 (marcador D3S1358), 11 e 12 (marcador D1S1656), 11 (marcador D2S441) e 12 (marcador Penta E). Os alelos 17 (obtido no marcador D3S1358), 13 (obtido no marcador D1S1656) e 13 (obtido no marcador D2S441) são extras e não estão presentes nos perfis referência de nenhum dos participantes deste experimento.

5.5 Influência do sexo na obtenção de perfis STR

Dos 104 experimentos realizados, 28 deles foram conduzidos por duas mulheres (M+M), 28 por uma mulher (doadora primária) e um homem (doador secundário) (M+H), 24 por um homem e uma mulher, como doadores primários e secundários respectivamente (H+M) e 24 por dois homens (H+H). Para amostras extraídas com Casework Direct Kit, o único experimento que não gerou perfil foi conduzido na configuração H+M. Para amostras extraídas com DNA IQ System, dos 20 experimentos que não produziram perfis genéticos, 5 eram M+M, 4 eram M+H, 4 eram H+M e 7 eram H+H.

5.5.1 Qualidade dos perfis obtidos

A qualidade dos perfis obtidos nos experimentos foi mensurada por meio da correspondência alélica obtida entre os perfis referência e os perfis STR gerados para ambos os contribuidores na mistura.

Baseado na porcentagem de alelos obtidos para cada doador, os perfis foram categorizados em nulos, completos ou parciais. Perfis parciais foram subdivididos em Perfis Parciais Baixos (PPB), cuja porcentagem alélica obtida para o doador foi de 50% ou menos e Perfis Parciais Altos (PPA), cuja porcentagem alélica correspondente ao doador foi acima de 50%. Perfis Nulos (0% de correspondência) e Perfis Completos (100% de correspondência) foram considerados separadamente. A Tabela 11 mostra a relação entre a qualidade dos perfis obtidos e o tipo de superfície em que o experimento foi realizado para amostras extraídas com DNA IQ System, enquanto que a Tabela 12 mostra a mesma análise para amostras extraídas com Casework Direct Kit, considerando ambos os doadores da mistura

Tabela 11 - Relação entre a qualidade dos perfis obtidos e o tipo de superfície para ambos os doadores presentes na mistura em amostras extraídas com DNA IQ System. N- Perfil Nulo (0%). PPB - Perfil Parcial baixo (1-50% de alelos). PPA - Perfil parcial Alto (51-99% de alelos). PC.- Perfil Completo (100%).

	Doador primário				Doador secundário			
	N	PPB	PPA	PC	N	PPB	PPA	PC
Teclados	0	3	0	0	0	3	0	0
Madeira	1	4	0	0	1	4	0	0
Aço	0	1	0	0	0	1	0	0
Plástico	1	3	0	0	0	4	0	0
Maçaneta (sol)	1	5	0	0	1	4	1	0
Maçaneta (chuva)	0	5	0	0	0	5	0	0
Volante	0	2	6	0	0	6	2	0

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

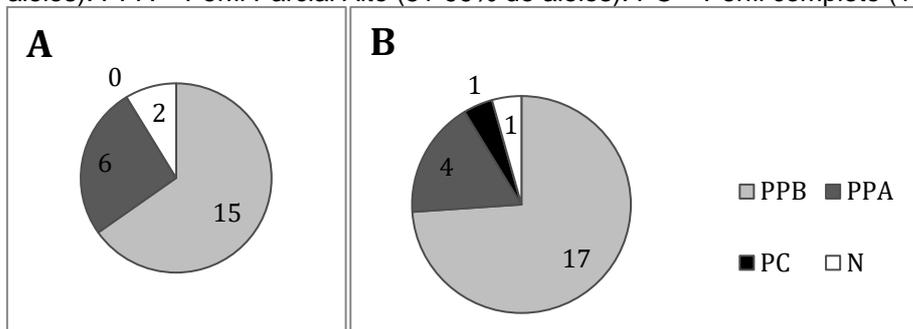
Tabela 12 - Relação entre a qualidade dos perfis obtidos e o tipo de superfície para ambos os doadores presentes na mistura em amostras extraídas com Casework Direct Kit. N- Perfil Nulo (0%). PPB - Perfil Parcial baixo (1-50% de alelos). PPA - Perfil parcial Alto (51-99% de alelos). PC -Perfil Completo (100%).

	Doador primário				Doador secundário			
	N	PPB	PPA	PC	N	PPB	PPA	PC
Teclados	0	2	2	0	0	4	0	0
Madeira	0	8	0	0	0	8	0	0
Aço	0	8	0	0	0	8	0	0
Plástico	0	8	0	0	0	7	1	0
Maçaneta (sol)	0	4	3	0	0	5	2	0
Maçaneta (chuva)	0	5	3	0	0	6	1	1
Volante	0	0	7	1	0	3	5	0

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

A análise da relação entre a qualidade dos perfis e o sexo dos indivíduos foi aplicada para ambos os doadores da mistura. Dos 28 experimentos feitos com duas mulheres, 23 apresentaram perfis, sendo 15 PPB, 6 PPA e 2 nulos em doadores primários e 17 PPB, 4 PPA, 1 nulo e 1 completo em doadores secundários (Gráfico 7). Já para os ensaios M+H, dos 28 experimentos realizados, 24 geraram perfis STR. Para doadores primários, 17 foram PPB e 7 PPA, enquanto que, para doadores secundários, 19 foram PPB e 5 PPA (Gráfico 8). Dentre os 24 ensaios H+M realizados, 19 obtiveram perfis genéticos. Para doadores primários 15 eram PPB e 4 PPA, enquanto que, para os doadores secundários, 16 eram PPB e 3 eram PPA (Gráfico 9). Em experimentos H+H, 17 dos 24 ensaios obtiveram perfis STR, sendo 11 deles PPB, 4 PPA, 1 nulo 1 completo em doadores primários. Já os doadores secundários obtiveram 16 PPB e 1 nulo (Gráfico 10).

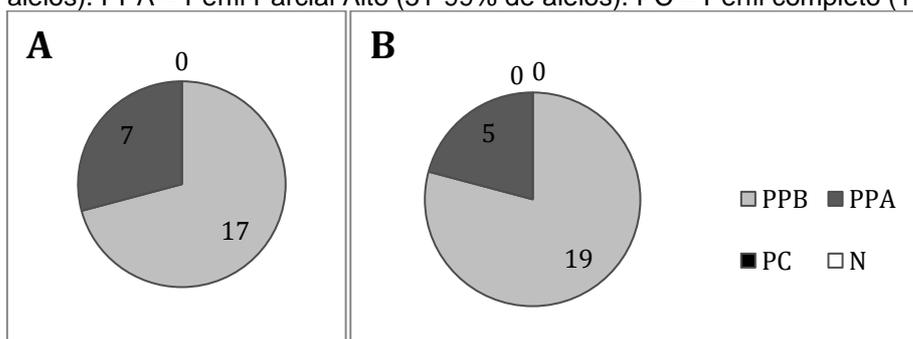
Gráfico 7 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos M+M. A) Doador primário. B) Doador secundário. N – Perfil Nulo (0%). PPB – Perfil Parcial Baixo (1 - 50% de alelos). PPA – Perfil Parcial Alto (51-99% de alelos). PC – Perfil completo (100% de alelos).



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Dentre os 15 perfis PPB obtidos para doadores primários no Gráfico 7.a, 10 eram de experimentos extraídos com Casework e 5 com DNA IQ. Para perfis PPA, 4 eram de Casework e 2 de DNA IQ. Os dois perfis nulos foram provenientes de amostras de DNA IQ. Com relação aos doadores secundários, 10 dos 17 perfis PPB eram de Casework e os 7 restantes eram provenientes da extração com DNA IQ System. Três dos 4 perfis PPA eram de Casework e 1 deles de DNA IQ. O único perfil completo foi proveniente de experimento extraído com Casework e o único perfil nulo foi proveniente de experimento extraído com o DNA IQ.

Gráfico 8 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos M+H A) Doador primário. B) Doador secundário. N – Perfil Nulo (0%). PPB – Perfil Parcial Baixo (1 - 50% de alelos). PPA – Perfil Parcial Alto (51-99% de alelos). PC – Perfil completo (100% de alelos).

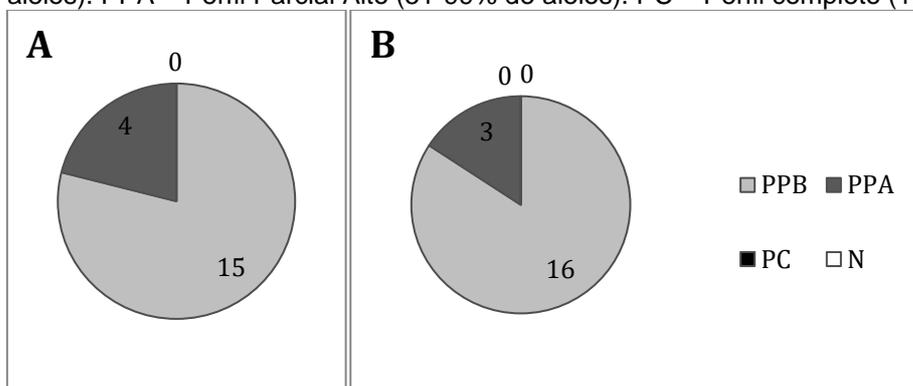


FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Dentre os 17 perfis PPB obtidos para doadores primários no Gráfico 8.a, 9 eram de experimentos extraídos com Casework e 8 com DNA IQ. Para perfis PPA, 5 eram de Casework e 2 de DNA IQ. Com relação aos doadores secundários, 10 dos 19 perfis PPB eram de amostras do Casework Direct kit,

enquanto que os 9 restantes foram provenientes da extração com DNA IQ System. Quatro dos 5 perfis PPA eram de Casework e 1 deles de DNA IQ.

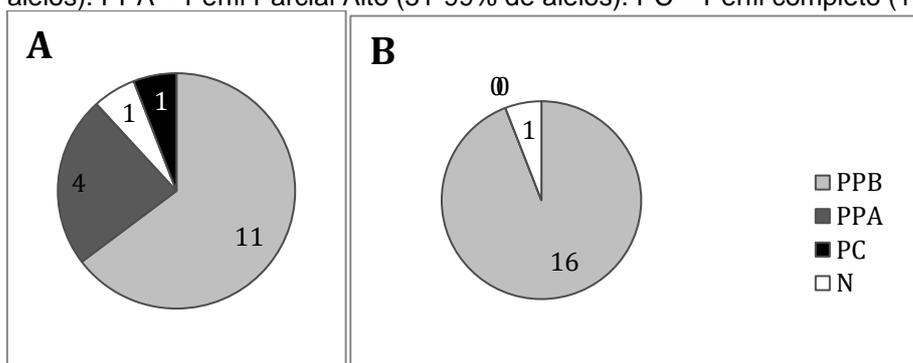
Gráfico 9 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos H+M A) Doador primário. B) Doador secundário. N – Perfil Nulo (0%). PPB – Perfil Parcial Baixo (1 - 50% de alelos). PPA – Perfil Parcial Alto (51-99% de alelos). PC – Perfil completo (100% de alelos).



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Dentre os 15 perfis PPB obtidos para doadores primários no Gráfico 9.a, 8 eram de experimentos extraídos com Casework e 7 com DNA IQ System. Para perfis PPA, 3 eram de Casework e 1 de DNA IQ. Com relação aos doadores secundários, 9 dos 16 perfis PPB eram de Casework e os 7 restantes foram provenientes da extração com DNA IQ System. Dois dos 3 perfis PPA eram de Casework e 1 deles de extração realizada com DNA IQ System.

Gráfico 10 - Número de perfis nulos, parciais e completos em experimentos H+H A) Doador primário. B) Doador secundário. N – Perfil Nulo (0%). PPB – Perfil Parcial Baixo (1 - 50% de alelos). PPA – Perfil Parcial Alto (51-99% de alelos). PC – Perfil completo (100% de alelos).



FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Dentre os 11 perfis PPB obtidos para doadores primários no Gráfico 10.a, 8 eram de experimentos extraídos com Casework e 3 eram oriundos de extração com o DNA IQ. Para perfis PPA, 3 eram de Casework e 1 de DNA IQ. O perfil

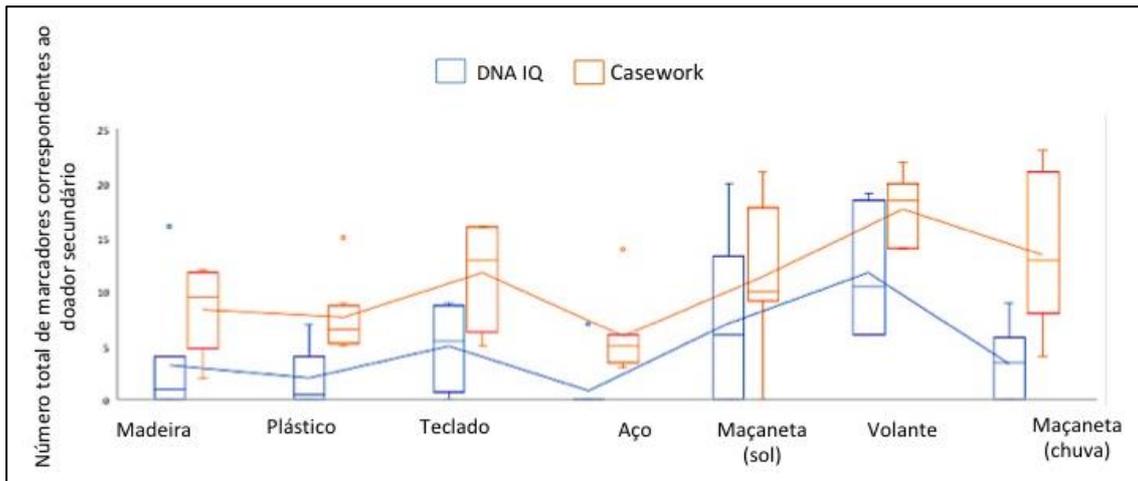
nulo era proveniente de amostra de DNA IQ, enquanto que o perfil completo foi obtido de amostra de Casework. Com relação aos doadores secundários, 12 dos 16 perfis PPB eram de Casework e os 4 restantes eram provenientes da extração com DNA IQ System. O perfil nulo também foi obtido de amostra de DNA IQ.

5.6 Amplificação com PowerPlex® Y 23 System

As amostras F5A, F7A, F7M, F13P, F13M, F15A, F15M, e F15P, C13M, C21 e C29, que não obtiveram perfil genético com o kit PowerPlex Fusion System, e que tinham como doador secundário (“criminoso”) um indivíduo do sexo masculino, foram amplificadas com o kit PowerPlex® Y 23 System, na tentativa de obtenção de algum perfil que pudesse auxiliar em eventuais investigações. Porém, não foi possível obter perfis genéticos específicos para o cromossomo Y em nenhuma dessas amostras.

5.7 Análises estatísticas

Para comparação do desempenho de ambos os kits de extração usados, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado. Considerando o número total de marcadores STR com correspondência alélica para doadores secundários, o resultado do teste mostrou que, de forma geral, o tipo de superfície afetou significativamente a recuperação do DNA para ambos os métodos de extração ($p=0.005$ para DNA IQ System e $p=0.002$ para Casework Direct Kit). O Box Plot apresentado pela Figura 14 mostrou como os kits se comportaram para cada uma das superfícies testadas.



FONTE: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 14 – Desempenho dos kits DNA IQ System e Casework Direct kit em cada superfície, considerando o número total de marcadores STR correspondente para doadores secundários.

O teste 7 Wilcoxon Rank Sum, por sua vez, foi calculado com um nível de significância de 0,007 ($0.05 \div 7$) para comparar o desempenho dos kits na recuperação do perfil do doador secundário para cada uma das superfícies utilizadas. Os resultados obtidos sugerem que o Casework Direct Kit obteve o melhor desempenho que o DNA IQ System em empunhaduras de plástico ($p=0,004$), empunhaduras de aço ($p=0,007$) e maçanetas de carros em dias chuvosos ($p=0,006$). Os demais valores de p obtidos para os outros tipos de substratos não indicaram diferenças significativas.

Para comparar os kits conforme a produção de perfis úteis, o teste Chi-Quadrado foi aplicado. O resultado dessa análise evidenciou uma diferença significativa entre os métodos de extração, tendo o Casework Direct Kit produzido os melhores resultados ($p=0.001$).

6. DISCUSSÃO

6.1 Influência do método de extração na obtenção de perfis STR

Considerando o objetivo desse projeto em analisar a viabilidade de obtenção de perfis de DNA em diferentes materiais de empunhaduras de facas, maçanetas e volantes de carros, e em teclados de computadores, e as diversas variáveis que podem interferir no processo, é possível afirmar que os nossos resultados estão em concordância com aqueles encontrados na literatura. Foi possível observar que 79,8% dos experimentos realizados nesse estudo obtiveram um resultado positivo para gerar um perfil genético, constatando-se assim que as Impressões Digitais, de fato, podem contribuir para a investigação de diversos crimes por meio da geração de perfis de DNA (Wickenheiser e Hons, 2002), ainda que a maior parte das células depositadas nas mesmas sejam anucleadas (Balogh et al., 2003).

Ainda assim, 21 experimentos (20,2%) não obtiveram resultados positivos para gerar perfis de DNA. Nesses casos, apesar das Impressões Digitais representarem fonte potencial de material genético para gerar perfis STR (Wickenheiser e Hons, 2002), o método de extração utilizado pode ter sido um fator crucial para alterar as chances de obtenção desses perfis com o kit PowerPlex® Fusion System.

Os dois kits de extração utilizados são próprios para amostras forenses com baixa quantidade de material genético, como as amostras de DNA de toque. O método de extração com DNA IQ System se baseia em lavagens realizadas com a ajuda de uma enzima magnética, e já é aplicado para casos de DNA de toque pela perícia da cidade de São Paulo. Já o Casework Direct Kit se baseia no uso de uma solução de lise de membranas, desenvolvida especialmente para amostras de baixa quantidade de material genético oriundas de cenas de crimes, e recentemente começou a ser comercializado no Brasil.

Como pôde ser observado, dos 21 experimentos que não resultaram em nenhum perfil, apenas um deles havia sido extraído com o Casework Direct Kit. Os demais (20 ensaios) foram extraídos com o kit DNA IQ System. Esses

achados estão de acordo com o esperado segundo a literatura, pois Graham et al. (2018) relataram que o protocolo do Casework Direct Kit minimiza a perda de DNA das amostras, diferente do que ocorre com o uso do kit DNA IQ System, que, por conter diversas etapas de lavagem, pode ocasionar a perda excessiva de material genético. Nesse sentido, Tang et al. (2020) demonstraram que 56 a 77% do DNA coletado de uma amostra pode se perder durante o seu processamento, um fato que, para vestígios oriundos de toque, pode comprometer toda uma investigação criminal, já que esse tipo de material naturalmente já possui pouco DNA em sua composição. Isso explica, portanto, o porquê o atual kit utilizado pela perícia de São Paulo produziu uma quantidade inferior de perfis STR quando comparado ao Casework Direct Kit

Ainda que estudos anteriores tenham demonstrado a capacidade do kit DNA IQ System em recuperar amostras de baixa quantidade de material genético, como por exemplo, sêmen em swabs de algodão (Colussi et al., 2009), considerando que as amostras de DNA de toque possuem quantidade ínfima de DNA (Wickenheiser e Hons, 2002), podendo inclusive estar na ordem de picogramas (Gill et al., 2000), qualquer perda, por menor que seja, pode ser crucial para um resultado negativo com relação à obtenção de perfis STR. Talvez por isso, o Casework Direct Kit tenha sido capaz de resgatar os alelos dos doadores das misturas numa melhor qualidade que o kit DNA IQ System, pois as médias de alelos coincidentes com os perfis dos doadores primários e secundários desse método de extração (40,5% e 34,6%, respectivamente) foram maiores em relação às obtidas com o kit DNA IQ (30,8 e 23,8%).

Porém, contrariando as expectativas de que os perfis gerados pela extração de DNA IQ fossem mais puros do que aqueles obtidos com o Casework Direct Kit, e considerando que o próprio DNA IQ System é um kit de purificação capaz de remover e separar impurezas que possam prejudicar a amplificação do DNA subsequente (Butler, 2011), o Casework Direct Kit apresentou uma média menor de alelos extras (42,1%) do que o DNA IQ System (49,5%) (Gráfico 6). Sendo assim, por possuir uma média maior de alelos coincidentes com as amostras referências e menor média de alelos extras, o Casework Direct Kit proporcionou a geração de perfis STR com o Kit PowerPlex® Fusion System mais

limpos e verdadeiros do que aqueles gerados a partir da extração com o kit DNA IQ.

Além disso, embora o teste Wilcoxon Rank Sum tenha mostrado que o Casework Direct Kit foi significativamente melhor que o DNA IQ System somente em facas de plástico ($p=0.004$), empunhaduras de aço ($p=0.007$) e maçanetas de carro sob a exposição de chuva ($p=0.006$), pode-se observar na Figura 14, que, apesar do comportamento similar de ambos os kits em cada superfície, para a obtenção de perfis do doador secundário, o Casework resultou em um melhor desempenho do que o DNA IQ System em todos os substratos testados. Esse dado foi confirmado pelo teste Chi-Quadrado, que mostrou uma diferença significativa entre ambos os kits para a obtenção de perfis úteis numa investigação criminal ($p=0.001$), sugerindo que, neste estudo, o Casework Direct Kit foi mais eficaz para a extração de amostras de DNA de toque do que o atual kit utilizado na perícia da cidade de São Paulo. Sendo assim, os resultados do teste Wilcoxon Rank Sum podem ser explicados pela baixa amostragem realizada em cada categoria de superfície que, se fosse maior, também poderia culminar em diferentes graus de significância para os demais tipos de superfície.

6.2 Compatibilidade entre os resultados de quantificação e os perfis obtidos

Avaliando os resultados de quantificação das amostras e a quantidade e qualidade dos perfis de STR obtidos, foi possível observar uma aparente discrepância entre estes dados. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4, os valores médios de quantificação para o marcador *Large* foi sempre superior para amostras extraídas com DNA IQ System. Por exemplo, o valor médio de marcadores *Large* para o kit DNA IQ System em teclados foi de 0,00066 ng/ul, enquanto que para o Casework Direct Kit foi de 0,00018 ng/ul. Isso sugere que swabs processados com o DNA IQ System resultaram em maior quantidade de longos fragmentos de DNA do que aquelas extraídos com o Casework Direct Kit e, portanto, possivelmente gerariam perfis STR mais completos e verdadeiros. No entanto, os dados obtidos nos perfis genéticos revelam o contrário, na medida em que amostras extraídas com o Casework Direct Kit obtiveram médias de alelos coincidentes para doadores primários e secundários superiores às

extraídas com DNA IQ System (40,5% e 34,6% contra 30,8% e 23,8%, respectivamente).

A possível explicação para esta contrariedade nos resultados é a possibilidade de que amostras extraídas com o Casework Direct Kit possam não ser eficazmente quantificadas com o kit Quantifiler Trio™, como sugerido por Silva (2018), ao demonstrar que alguns dos compostos deste kit de extração deve conter inibidores para a reação de quantificação com o Quantifiler Trio™. Segundo este mesmo trabalho, o Casework Direct Kit apresenta melhores resultados de quantificação com o kit PowerQuant®, (Promega). Dessa forma, as amostras processadas com este novo método de extração podem ter resultado em valores de quantificação de menor confiabilidade do que aquelas extraídas com o DNA IQ System.

No entanto, cabe ressaltar que, para nenhum dos métodos de extração usados foi possível estabelecer um limiar acerca da quantidade mínima de DNA necessária para produzir um perfil STR, pois algumas amostras possuíam resultados positivos para quantificação em ao menos um dos marcadores, mas não obtiveram perfil STR (Quadro 6), como por exemplo, a amostra F7M que obteve uma quantificação de 0,00027 *ng/μl* para o marcador *Large* (e não resultou em perfil genético), valor superior ao da amostra F6M (0,000098 *ng/μl*), mas que, por sua vez, resultou num perfil genético (Tabela 2). Da mesma forma, foi possível constatar a existência de amostras, extraídas por ambos os métodos, que apresentaram resultados negativos para a quantificação, mas que geraram perfis STR (Quadro 5).

Das 25 amostras que obtiveram resultados indeterminados para ambos os marcadores de quantificação (Quadro 5), 13 (52%) não resultaram em perfis genéticos, como era esperado, no entanto, as 12 restantes (48%) geraram perfis. Por exemplo, a amostra F13A, apesar de não ter resultado em quantificação para os marcadores *Small* e *Large* (Tabela 1), gerou um perfil parcial com 21,7% e 26,2% de alelos correspondentes para os doadores primários e secundários, respectivamente (Tabela 6). Porém, apesar dessas amostras resultarem em perfis STR, a qualidade desses perfis não seria suficiente para inserção deles no Banco Nacional de Perfis Genéticos, que exige um mínimo de 8 marcadores STR do

CODIS original correspondente ao perfil do criminoso. Ou seja, com exceção da amostra F8P, que obteve um total de 15 marcadores STR com correspondência alélica para o doador secundário (Tabela 9), os demais perfis genéticos dessas amostras negativas para quantificação seriam considerados de baixa qualidade para finalidades forenses.

Ao apresentarem resultados similares com o uso do kit Quantifiler™ em amostras extraídas de swabs bucais, Cupples et al. (2009) concluíram que não é possível estabelecer um valor mínimo no qual acima dele seja possível sempre gerar um perfil STR, existindo, portanto, uma imprecisão nesta etapa. Sendo assim, resultados de quantificação provenientes de amostras com baixa quantidade de DNA, como é o caso de amostras de DNA de toque, não podem ser tomados como mensurações absolutas (Oorschoot et al., 2010), pois ambos os métodos de extração usados neste estudo apresentaram resultados incompatíveis com a presença ou ausência dos perfis STR.

6.3 Influência do tipo de substrato na obtenção de perfis STR

Sabe-se hoje que o tipo de substrato e as características inerentes a ele, como o aspecto físico, a composição, a química ou tipo de fibra que possui, exercem grande impacto na transferência, persistência e recuperação do material biológico depositado (Oorschot et al., 2019). Nesse contexto, tem sido reportado, em diversos achados da literatura, que as superfícies porosas tendem a reter uma quantidade maior de DNA por conterem uma capacidade de aderência superior àquelas não-porosas (Wickenheiser e Hons, 2002; Verdon et al., 2013; Mishra et al., 2020).

Daly et al. (2012), por exemplo, relataram sucesso para obtenção de perfis de DNA em madeira (36%) muito maior do que o obtido em vidro (9%). Fonnelop et al. (2016), por sua vez, relataram que a transferência de DNA por meio do toque ocorre mais facilmente para madeira e plástico do que para metal. Já Kirgiz e Calloway (2017) obtiveram alta taxa de êxito ao obter perfis STR de volantes de carros e concluíram que a coleta de DNA desse material é uma ferramenta poderosa para a solução de crimes, tendo em vista que este tipo de superfície é

capaz de reter vestígios biológicos provenientes de DNA de toque mesmo tendo sido manipulado por um curto período de tempo.

Sendo assim, os resultados obtidos nesse estudo estão em concordância com a literatura, pois o tipo de substrato em que o material genético foi depositado pareceu influenciar na obtenção de perfis STR. Como observado, nenhum experimento realizado em volantes de carros falhou (superfície porosa e irregular), enquanto aqueles feitos em maçanetas de carros e empunhaduras de facas (superfícies lisas) foram responsáveis pela maior parte dos ensaios em que não foi possível obter um perfil genético. Sete experimentos com facas de aço falharam na obtenção de perfis STR, e o mesmo ocorreu para 4 empunhaduras de polipropileno e 3 de madeira, sendo que entre esses três tipos de materiais, a porosidade do aço é a menor. Do mesmo modo, em carros, todos os seis experimentos sem perfis STR eram provenientes de maçanetas (3 em dias ensolarados e 3 em dias chuvosos), cujo material de fabricação geralmente é menos poroso do que o de volantes. Reforçando esses achados, o resultado do teste Kruskal-Wallis aplicado demonstrou que o tipo de superfície afetou significativamente a recuperação do DNA para ambos os métodos de extração ($p=0.005$ para DNA IQ System e $p=0.002$ para Casework), embora o Casework Direct Kit tenha tido um desempenho mais satisfatório para todos os materiais testados (Figura 14).

A qualidade dos perfis obtidos também parece ter relação com o tipo de superfície em que o material genético foi depositado, pois como observado nos Gráficos 1 e 2, dentre os perfis obtidos, as maiores médias de alelos coincidentes para perfis de doadores primários e secundários foi proveniente de volantes de carros, enquanto as menores para ambos os doadores foram oriundas de empunhaduras de facas (polipropileno e aço), considerando ambos os métodos de extração. Em concordância com esses dados, para doadores primários, os volantes apresentaram a maior quantidade de perfis PPA quando comparados às demais superfícies (13 ao todo, considerando amostras de DNA IQ System e Casework Direct Kit), como demonstrado nas Tabelas 11 e 12. Além disso, esse tipo de material também apresentou um perfil completo para essa mesma análise.

Embora os volantes não tenham mantido a mesma *performance* para doadores secundários, ainda assim obtiveram a maior quantidade de perfis PPA (7 ao todo) (Tabela 12). Da mesma forma, as empunhaduras de facas geraram os piores resultados, tendo somente perfis tipo PPB para ambos os componentes da mistura, com exceção às facas de plástico que obtiveram 1 PPA em doadores secundários, quando a amostra foi extraída com o Casework Direct Kit (Tabela 12).

Nesse contexto, o tipo de superfície, aliado ao método de extração utilizado, demonstrou ser crucial para a obtenção e melhoria da qualidade de perfis STR gerados, considerando que somente em empunhaduras de aço com extração pelo DNA IQ System as médias de alelos coincidentes para doadores secundários foram superiores aos valores obtidos com a extração de Casework Direct Kit (26,2% para DNA IQ e 17,9% para Casework). Entretanto, este resultado não reflete a realidade e não é suficiente para afirmar que a funcionalidade do Casework Direct Kit seria inferior ao do DNA IQ System nesse tipo de material, pois, como discutido anteriormente, apenas um dos oito experimentos em facas de aço obteve perfil STR quando extraído com DNA IQ System, enquanto todas as oito amostras de empunhaduras de aço extraídas com o Casework Direct Kit obtiveram perfis genéticos. Assim, a média em relação ao DNA IQ é o dado bruto de apenas 1 experimento, enquanto a do Casework é de 8 experimentos.

Isso sugere que, apesar da baixa capacidade de aderência de material genético ao aço, a quantidade de DNA depositada é suficiente para gerar um perfil genético, sendo o método de extração aplicado determinante para a recuperação do mesmo. Assim, o uso do Casework Direct Kit pode aumentar a chance de obtenção de perfis STR, mesmo que a superfície em questão não possua propriedades favoráveis para esse tipo de análise, como é o caso de substratos duros, polidos e de baixa capacidade abrasiva como o aço (Fonneløp et al., 2016), enquanto a extração com o kit DNA IQ System tende a resultar na perda do pouco DNA que foi depositado em superfícies com essas condições.

6.4 Capacidade individual de deposição de material genético

Sabe-se que uma série de fatores em conjunto podem atuar no sucesso de obtenção de perfis genéticos. Entre eles, muito se discute sobre o papel do *status shedder* dos indivíduos, ou seja, a capacidade que cada pessoa possui em naturalmente depositar mais ou menos material genético num determinado objeto (Oorschot et al., 2019).

Diversos estudos foram realizados a fim de demonstrar que algumas pessoas possuem maior propensão a transferir material genético do que outras. Lowe et al. (2002) obtiveram sucesso para dividir oito pessoas em boas ou más doadoras ao participarem de experimentos envolvendo o toque em tubos plásticos estéreis, sem analisar a influência do sexo dos indivíduos em seus resultados. No entanto, Phipps e Petricevic (2007) afirmam que a categorização entre bons e maus doadores é muito complexa, e que a capacidade de transferência de DNA depende de uma série de fatores, como as atividades que a pessoa estava fazendo antes de segurar o objeto, a natureza do contato, qual foi a mão utilizada para a deposição, entre outros. Dos 60 voluntários que participaram do projeto desses autores, também utilizando tubos plásticos esterilizados, nenhum deles produziu os mesmos resultados de deposição quando submetidos à diferentes situações. Em um estudo sobre o papel de doenças de pele como dermatite e psoríase, Kamphausen et al. (2012) concluíram que estas podem afetar significativamente a quantidade de DNA deixado numa superfície por meio de contato com a pele.

Em nosso estudo, resultados concordantes com os de Phipps e Petricevic (2007) foram obtidos. O indivíduo M1 atuou como doador primário nos experimentos de teclados e facas (Quadro 4), sendo que nos experimentos T1/T2, 6 e 12 marcadores STR com o perfil dessa pessoa foram obtidos, de um total de 23 marcadores possíveis. Já em T5/T6 esses números se elevaram para 15 e 23 (Tabela 8). Partindo-se do pressuposto de que essa pessoa seria uma boa doadora capaz de sempre depositar o seu material genético em uma quantidade suficiente para gerar um perfil STR, outros experimentos realizados com a mesma deveriam possuir resultados semelhantes. No entanto, no experimento F1P

(Tabela 9), esse mesmo indivíduo atuando como doador primário obteve uma correspondência de 0 marcadores para o perfil obtido em uma faca de polipropileno.

O mesmo foi observado com outros participantes do estudo, como por exemplo, o indivíduo H3 que atuou como doador primário em experimentos de empunhaduras de facas (F11/12 e F15/F16) e volantes e maçanetas de carros (C11/C12, C15/C16, C27/C28, C31/C32), como mostrado no Quadro 4. Os experimentos F15 não atingiram nenhum resultado positivo no que diz respeito à obtenção de perfis STR, e o número máximo de marcadores STR com correspondência alélica para esse indivíduo foi de 14, achado no ensaio F16A (Tabela 9). Enquanto isso, o experimento C11V obteve correspondência de 23 marcadores dessa pessoa, sendo 20 deles sem *drop-out* alélico. O ensaio C32, por sua vez, resultou numa correspondência de 24 marcadores STR para o perfil referência desse homem, sendo 23 deles sem nenhum *drop-out* alélico (Tabela 10).

Já para o indivíduo H4, participante como doador secundário em experimentos de facas e carros, a mesma variação de resultados foi observada. Por exemplo, no experimento F7, somente se obteve perfil STR para a empunhadura de polipropileno (Tabela 9), enquanto que para os experimentos C7M e C7V, realizados com o mesmo método de extração, correspondências de, respectivamente, 11 e 19 marcadores STR foram observados (Tabela 10).

As aparentes variações no *status shedder* dos indivíduos obtidas em nossos experimentos estão em concordância com aqueles observados por Manoli et al. (2016), onde 23% de seus participantes permaneceram com o *status shedder* constante, enquanto que nos outros 77% esse *status* foi alterado de um experimento para outro. Em seu estudo, Kanokwongnuwut et al. (2018) tentaram avaliar o *status shedder* de 11 voluntários, mostrando que cinco deles eram intermediários (nem bons, nem ruins), confirmando, portanto, a complexidade existente nessa questão. Da mesma forma, ao notarem a variação da quantidade de DNA recuperado de seus participantes em diferentes experimentos, Samie et al. (2020) questionam o uso de um rótulo fixo como “*good shedder*” ou “*bad*

shedder” para um determinado indivíduo, independentemente das circunstâncias em que se encontram. Por sua vez, Goray e Oorschot (2021) em seu estudo, demonstraram que as pessoas podem manter o seu *status shedder* inalterado por muito tempo, abrangendo longos períodos (até três anos). No entanto, a maioria dos participantes deste estudo se enquadraram em uma categoria intermediária entre bons e maus doadores, sendo que dentro desta categoria ainda havia variação suficiente para subcategorizá-los.

Sendo assim, diante dos nossos resultados, concordamos que não é possível categorizar pessoas como boas ou más doadoras de DNA, pois variações na quantidade de marcadores com correspondência alélica para os doadores primários e secundários foram observadas quando estes participaram de diferentes experimentos. Portanto, uma mesma pessoa pode atuar como boa ou má doadora dependendo de diversos fatores (Gršković et al., 2014) e é difícil determinar em que extensão os fatores genéticos e não-genéticos (como diferenças ambientais ou do suporte usado) podem impactar o *status shedder* de alguém (Oorschot et al., 2019).

6.5 Influência de sexo para a obtenção de perfis genéticos

De um modo geral, a qualidade dos perfis para doadores secundários foi inferior a dos doadores primários e, exceto para facas de plástico (Tabela 12), todas as superfícies obtiveram um menor número de perfis PPA para doadores secundários, quando comparados aos doadores primários. Esse achado é consistente com os estudos que concluíram que o último doador não é necessariamente o maior contribuidor em experimentos cujos objetos tenham sido manipulados por duas ou mais pessoas (Buckingham et al., 2016; Samie et al. 2016; Oorschot et al., 2019; Goray et al. 2020).

É possível que, em nosso estudo, os melhores resultados tenham sido os dos doadores primários, pois os mesmos manipularam os objetos por um maior período de tempo, sendo assim, possivelmente depositaram mais células do que os doadores secundários. No entanto, diversos achados contradizem essa hipótese, concluindo que o tempo de contato não é determinante para a

quantidade de DNA depositado num objeto. Em estudo realizado por Oorschoot et al. (1997), os indivíduos manipularam tubos de plástico estéreis por 5 segundos, 30 segundos, 3 minutos e 10 minutos, respectivamente, permitindo que os autores concluíssem que uma grande quantidade de transferência de DNA ocorre logo no contato inicial das mãos com um objeto. Da mesma forma, Balogh et al. (2003) tentaram obter perfis STR de impressões digitais obtidas após 1, 2, 5, 10, 50 e 60 segundos de contato, tendo sucesso na geração de perfis STR para qualquer um dos tempos testados. De acordo com Sessa et al. (2019), apenas dois segundos são suficientes para liberar DNA num vestuário de modo a obter um perfil genético completo. Similarmente, Kallapurackal et al. (2021) demonstraram que apenas cinco segundos de contato já são suficientes para transferir quantidades razoáveis de DNA, permitindo a geração de perfis genéticos para identificação de criminosos. Portanto, se o tempo de contato não é um fator de impacto para a deposição de material genético, outros fatores, como o sexo, podem ser.

Ao analisar a qualidade de perfis STR em relação ao sexo dos indivíduos na mistura, foi possível observar nas nossas análises que, para doadores primários, os melhores resultados foram observados em experimentos realizados com dois homens. Apesar de 11 perfis serem PPB, 4 foram PPA, além de 1 ser caracterizado como Perfil Completo (Gráfico 10.a). Por outro lado, para doadores secundários, experimentos com dois homens não mantiveram esse desempenho (Gráfico 10.b) ao passo que, experimentos com duas mulheres apresentaram o melhor resultado para essa análise, apresentando 1 Perfil Completo, 4 PPA e 17 PPB (Gráfico 7.b). Um perfil nulo foi obtido tanto para ensaios H+H, quanto para M+M, em doadores primários e secundários, respectivamente.

Parece que essas duas situações simuladas (duas mulheres ou dois homens) apresentaram os resultados opostos, uma vez que o esperado fosse que ensaios H+H apresentassem a melhor qualidade de perfis, já que homens possuem dedos com uma maior superfície de contato e, conseqüentemente maior quantidade de material celular para doar (Kanokwongnuwut et al. 2018), além de suarem mais do que mulheres, tendendo a depositar mais DNA, conforme

sugerido por diversos estudos (Poetsch et al., 2013, Gršković et al., 2014, Manoli et al., 2016 e Goray et al., 2016). Nesse sentido, a maior parte dos estudos aponta que homens tendem a ser classificados como melhores doadores do que mulheres. Lacerenza et al. (2016), ao analisarem amostras coletadas das palmas e dedos de 30 homens e 30 mulheres, sugeriram que o sexo pode influenciar a propensão do indivíduo em carregar e transferir DNA por meio do contato com as mãos, sendo que amostras de homens costumam produzir perfis STR mais íntegros.

No entanto, é possível que, quando um homem é o segundo doador em um cenário composto por dois homens (ambos tendendo a serem bons doadores), a quantidade de DNA deixada por ele durante um curto período não seja suficiente para ultrapassar a quantidade deixada pelo primeiro doador. O homem que é o primeiro doador, manipulando um objeto por um longo tempo, tende a ser o componente predominante na mistura, apresentando um maior número de alelos no perfil genético. Já quando uma mulher é a segunda colaboradora em um cenário composto por duas mulheres (sendo que ambas tendem a serem más doadoras), pode ser que a quantidade de DNA deixada por ela seja maior do que a deixada pela primeira mulher, mesmo manipulando o objeto durante menos tempo que a proprietária. Portanto, supondo que as mulheres suem menos que os homens, é possível que, em experimentos com duas mulheres, os perfis de segundos doadores possam obter melhores resultados do que os primeiros doadores, uma vez que a mulher sendo má doadora pode remover o material depositado pela manipuladora anterior, deixando o seu próprio no lugar.

Buckingham et al. (2016) demonstraram a contribuição de quatro indivíduos em misturas de amostras obtidas de cabos de facas, mas sem investigar o impacto do sexo. Os autores demonstraram que os perfis genéticos dos manipuladores posteriores de uma faca são mais proeminentes do que os manipuladores anteriores e, em um teste específico, o segundo participante desapareceu, enquanto o terceiro foi predominante. Observando que o participante 3 teve uma contribuição maior que o participante 2 em 5 dos 6 testes, e que o participante 2 teve uma contribuição maior que o participante 1 em 4 de 6 testes, talvez a cada toque sucessivo, não apenas as células do novo depositante

são adicionadas, mas também as células do anterior podem estar sendo removidas. Essa remoção é evidenciada em estudos de transferência secundária, que demonstram que é possível levar o DNA de uma pessoa de um lugar para outro (Lee e Ladd, 2002; Goray et al. 2009), podendo inclusive se vincular falsamente uma pessoa a uma cena de crime na qual eles nunca esteve (Cale et al., 2016; Fonnøløpet et al., 2017). Sendo assim, quando uma mulher tocou um objeto após outra mulher já tê-lo feito, ela possa ter atuado mais como uma removedora de células do que uma depositora, explicando o porquê experimentos com duas mulheres obtiveram resultados melhores para os doadores secundários das misturas, nos nossos cenários.

Já os experimentos intermediários (M+H e H+M), por sua vez, apresentaram resultados semelhantes entre si, contendo apenas perfis PPB em sua maioria e PPA em menor quantidade, tanto para doadores primários, quanto para secundários. No entanto, em experimentos M+H os dados foram um pouco mais favoráveis para a identificação dos componentes da mistura, resultando numa maior quantidade de perfis PPA (7 e 5 para doadores primários e secundários, respectivamente) (Gráfico 8.a e 8.b), quando comparado aos ensaios H+M, que obtiveram 4 e 3 perfis PPA para doadores primários e secundários, respectivamente (Gráfico 9.a e 9.b). Esses achados parecem corroborar com os estudos que afirmam que homens devem ser melhores doadores do que as mulheres (Poetsch et al., 2013; Gršković et al., 2014; Manoli et al., 2016), pois nos casos H+M, a mulher também pode ter removido as células do homem e, como má doadora, depositado pobremente as suas próprias células, resultando em perfis menos significativos para uma investigação.

6.6 Aparecimento de artefatos nos perfis gerados

Em todos os perfis gerados nesse estudo, alelos extras foram detectados em menores ou maiores quantidades. Esses alelos podem ter sido originados de diversas maneiras, como por exemplo, os picos *stutter* oriundos dos efeitos estocásticos resultantes do aumento de ciclos durante a reação de amplificação, estratégia conhecida como Low Copy Number (LCN), usualmente utilizada para amostras de DNA de toque devido à baixa quantidade de material genético

encontrado nas mesmas. Nesse método aumenta-se o número de ciclos da reação de 28 para até 34 (Oorschot et al., 2010; Butler, 2011). Além dessa possibilidade, alelos extras também podem ser oriundos de transferência secundária (Lee e Ladd, 2001; Budowle et al., 2009; Meakin e Jamieson, 2013; Oorschot et al., 2019).

Nossos achados estão de acordo com o esperado na medida em que a presença de alelos extras em amostras de DNA de toque é comum, pois DNA de mais de uma pessoa pode ser encontrado nas mãos de um único indivíduo (Buckingham et al., 2016). Por exemplo, Samie et al. (2020) relatam que a quantidade total de DNA obtida das mãos de um participante correspondia apenas à 70% de seu próprio DNA. Ainda nesse sentido, em experimentos com facas, Cale et al. (2016), demonstraram que foi possível detectar transferência secundária em 85% de suas amostras, sendo que os participantes apertaram as mãos uns dos outros durante dois minutos, antes da realização dos experimentos. Nessas condições, uma pessoa poderia ser vinculada falsamente a uma cena de crime.

Além disso, ao aumentar o número de ciclos da PCR Multiplex para 31, era esperado que artefatos aparecessem em maiores quantidades em nosso estudo, pois quando existem poucas sequências de DNA alvo (baixa quantidade de material genético), a ligação destas com o primers da reação de amplificação não ocorre corretamente, podendo inclusive competir com outros componentes presentes na amostra, incluindo DNA de outras pessoas. Como consequência, *drop-in* alélicos podem aparecer no perfil gerado (Whitaker et al., 2001; Budowle et al., 2009; Butler, 2011).

Em nossos experimentos, a média de alelos verdadeiros para cada suporte sempre foi superior à média de alelos extras, com exceção das maçanetas de carros sob período ensolarado (52,3%) (Gráfico 5). Para esse material, era esperado uma maior taxa de contaminação, considerando que o mesmo fica exposto em ambientes abertos, o que pode influenciar os resultados na medida em que interferentes de outros indivíduos podem ser coletados junto ao material genético da pessoa que o manipulou (Oorschot et al., 2019). Além das maçanetas

de carros expostas ao sol, valores mais altos de alelos extras foram obtidos para empunhaduras de facas de madeira (47%) e polipropileno (45,2%), enquanto nestes suportes foi possível observar baixa quantidade de alelos coincidentes com os perfis dos doadores das misturas (Gráficos 1 e 2). Sendo assim, é possível que, por serem pouco porosos, esses suportes permitam baixa retenção de células e possam resultar num aumento da quantidade de artefatos existentes no perfil. Quanto menor a quantidade de DNA presente na amostra, mais propensa ela estará a sofrer com efeitos estocásticos da reação de amplificação com o número de ciclos elevado, aumentando também o número de artefatos obtidos no perfil. Com relação aos alelos extras, é comum que a DNA polimerase cometa falhas ao amplificar sequências repetidas do genoma, gerando picos não relacionados com a amostra (Oorschot et al., 2010; Butler, 2011).

Apesar de comuns em amostras de DNA de toque, os alelos *drop-in* e picos *stutter* devem ser analisados com cautela, pois em um caso real durante a rotina forense eles podem dificultar a caracterização de quantos doadores estão presentes no perfil (Oorschot et al., 2010) e quais são os alelos reais.

Além de alelos extras, todos os experimentos foram afetados pela presença de outro artefato, os *drop-out* alélicos, independentemente do método de extração utilizado (Tabelas 8, 9 e 10). Este resultado está em concordância com os de Whitaker et al. (2001), ao relatarem em seu estudo que todos os seus 68 perfis gerados a partir da técnica de LCN foram afetados por efeitos estocásticos, entre eles, considerável presença de *drop-out* alélicos (taxa de 10% por *locus*). Um problema decorrente de *drop-outs* alélicos a partir do processamento de amostras de DNA de toque é o de que, numa investigação real, não se sabe quais seriam os alelos presentes no perfil do criminoso, e assim, estes artefatos poderiam resultar em exclusões incorretas ou em falsos negativos no que diz respeito à identificação de criminosos (Butler, 2005).

Em muitos laboratórios forenses, é comum adotar a estratégia de amplificação de réplicas de uma mesma amostra, a fim de obter um consenso sobre o genótipo correto do indivíduo, tendo como base os perfis resultantes de todas as réplicas. Dessa forma, se diminui o impacto de artefatos na análise dos

resultados. No entanto, não existe um consenso acerca de quantas réplicas seriam necessárias para garantir a confiabilidade dos resultados e, no caso de amostras de quantidades escassas de DNA, talvez não seja possível gerar tantas repetições para uma mesma amostra, uma vez que a sua disponibilidade pode ser muito limitada (Oorschot et al., 2010; Evans e Hadi, 2018). De fato, em nosso estudo, não foi possível amplificar uma mesma amostra mais de duas vezes, pois a quantidade final de produto extraído, especialmente para amostras com DNA IQ System, era muito baixa.

Esses artefatos evidenciam a necessidade de se buscar estratégias que possam facilitar a análise de perfis STR provenientes de amostras de DNA de toque submetidas à técnica de LCN (Oorschot et al., 2010).

6.7 Eficácia dos perfis gerados para identificação do doador secundário

Os resultados apresentados nos Gráficos 1 e 2 evidenciam que o doador secundário foi o componente minoritário da mistura para quase todos os suportes testados, com exceção das empunhaduras de madeira, polipropileno e aço para as extrações feitas com DNA IQ System, e as empunhaduras de madeira, polipropileno e maçanetas de carros em dias chuvosos para ensaios extraídos com Casework Direct Kit. Na literatura, esses achados variam de um estudo para o outro. Por exemplo, Buckingham et al. (2016) afirmaram que, apesar de outros estudos mostrarem que os perfis genéticos de objetos tocados por vários indivíduos em sequência gerados geralmente costumam evidenciar o último usuário como o mais proeminente, os seus resultados apresentaram o oposto. Quando simularam experimentos em facas com quatro participantes manuseando os instrumentos, o penúltimo doador foi o que apresentou maior contribuição de alelos na maioria dos experimentos. Já os ensaios de Samie et al. (2016) mostraram que apesar de não ter sido possível obter o perfil completo do indivíduo que simulava o crime com facas, em perfis de mistura ele se mostrou o maior contribuidor para 83% dos casos. Em concordância com esses achados, Goray et al. (2020) analisaram a transferência e a recuperação de DNA em itens de um escritório utilizados por um usuário temporário, após o local ter sido previamente usado pelo usuário regular durante um longo período de tempo (até

7 horas seguidas). Neste estudo, os autores demonstraram que o usuário principal foi o majoritário em todos os itens tocados e o doador secundário nem sempre foi observado nos perfis oriundos das superfícies que havia tocado.

Em nossos experimentos, é possível que para as empunhaduras de facas o perfil do doador secundário tenha sido mais evidente (Gráficos 1 e 2), pois o segundo doador pode ter removido parte do material genético depositado pelo primeiro ao manipular o objeto. Considerando que esse DNA depositado pelo doador primário já estava presente em baixa quantidade (devido à baixa capacidade de retenção de células das empunhaduras de facas), a perda desse DNA pode ter sido crucial para a obtenção desse resultado. Para os resultados observados nas maçanetas sob exposição à chuva (Gráfico 2), pode ser que como a prevalência do material genético numa superfície depende de uma série de fatores, incluindo condições ambientais, a chuva tenha removido parte do material biológico depositado nas maçanetas, sendo que o DNA do primeiro participante já havia sido previamente removido, resultando numa proeminência do doador secundário.

Com relação aos demais resultados, mesmo que a contribuição dos doadores secundários não tenha sido maior que a dos doadores primários para a maior parte dos suportes, os perfis STR gerados poderiam ser úteis na tentativa de identificação de criminosos. Tendo em vista que este trabalho foi elaborado segundo as necessidades do laboratório de DNA da Polícia Civil da cidade de São Paulo, buscamos adaptar a análise de nossos resultados de acordo com a maneira oficial realizada no Brasil para interpretação dos resultados, que segue o Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG). Segundo a última versão do Manual, divulgada em 2019, perfis de mistura devem ser analisados a partir da dedução do perfil genético da vítima, pois somente o perfil do suspeito deve ser integrado ao Banco Nacional de Perfis Genéticos. Esforços devem ser feitos para a obtenção de perfis genéticos completos, mas em casos em que isso não seja possível, são aceitos os perfis com pelo menos 8 marcadores STR dos 13 presentes no CODIS original.

Nesse contexto, para os ensaios extraídos com DNA IQ System, com exceção do teclado, e empunhaduras de polipropileno e aço, os perfis gerados dos demais materiais se mostraram passíveis de serem inseridos no Banco Nacional de Perfis Genéticos, sendo que os volantes de carros (37,5% dos perfis) e maçanetas de carro sob exposição ao sol (33,3% dos perfis) foram os materiais com maior eficácia para este fim (Gráfico 3). O Casework Direct Kit, por sua vez, mostrou uma capacidade ainda maior para auxiliar em investigações, pois os valores obtidos em termos de eficácia para identificação do doador secundário foram superiores aos encontrados com o kit DNA IQ System para todos os substratos testados (dos 31 perfis úteis, 24 seriam de Casework Direct Kit e 7 de DNA IQ System), destacando que todos os perfis de amostras obtidas em volantes poderiam ser integrados ao Banco de perfis genéticos (Gráfico 3).

Em 2017, 7 novos marcadores foram incluídos no sistema CODIS, passando o sistema oficial a contar com os 20 STRs. Sendo assim, mesmo que os perfis não contenham pelo menos 8 marcadores dos 13 originais, ainda assim podem ser valiosos, tendo em vista o restante do perfil. Considerando, portanto, para ensaios extraídos com DNA IQ System, perfis com pelo menos 8 marcadores com correspondência alélica para doadores secundários dentre os presentes no CODIS atual de 20 STRs, pelo menos 1 perfil de cada tipo de material, com exceção de empunhaduras de polipropileno e aço, poderiam ser inseridos no Banco Nacional de Perfis Genéticos para auxiliar em investigações, sendo que os volantes e maçanetas de carros sob exposição ao sol foram os materiais com maior eficácia para este fim (Gráfico 4). Da mesma forma, ensaios extraídos com Casework Direct Kit obtiveram maior eficácia para identificação do doador secundário quando comparados ao kit DNA IQ System (dos 42 perfis úteis, 30 seriam de Casework Direct Kit e 12 de DNA IQ System). Neste caso, todos os perfis de amostras obtidas em volantes e maçanetas de carros sob luz solar poderiam ser integrados ao banco de dados nacional (Gráfico 4).

Sendo assim, em maior ou menor grau, todos os suportes podem gerar perfis úteis para a identificação de criminosos. Fundamentalmente, a melhoria da qualidade do material recuperado dependerá do método de extração utilizado.

6.8 Influência de fatores ambientais sobre a obtenção de perfis genéticos

No que diz respeito à influência de fatores ambientais sobre a obtenção dos perfis STR, foi possível gerar perfis genéticos tanto em dias de sol, quanto em dias de chuva, sendo que para ambas as condições ambientais houve três amostras que não geraram nenhum perfil genético (C11M, C12M, C13M para dias de sol e C17, C21 e C29 para dias de chuva). Esse resultado já era esperado, uma vez que fatores ambientais como chuva, umidade, temperatura ou exposição à luz UV poderiam impactar a presença do DNA depositado numa determinada superfície (Raymond et al., 2009; Lee et al., 2019),

No entanto, em termos de utilidade dos perfis gerados, foi possível constatar uma variação nos resultados, dependendo do tipo de análise utilizada. Para perfis com 8 marcadores dos 13 existentes no CODIS original, em amostras de DNA IQ System, 33,3% das amostras em dias ensolarados seriam úteis, valor acima do obtido para amostras em dias chuvosos (20%), como é possível observar no Gráfico 3. No entanto, para amostras de Casework Direct Kit aconteceu o oposto, ou seja, amostras em dias ensolarados foram menos eficazes do que as amostras em dias chuvosos no que diz respeito à obtenção de perfis úteis para uma investigação (57,1% contra 62,5%, respectivamente) (Gráfico 3). Já para a análise de 8 dos 20 marcadores STR do CODIS atual, os perfis obtidos em maçanetas de carros sob exposição ao sol seriam mais eficazes para a identificação dos criminosos que compõem a mistura, em ambos os métodos de extração analisados. Para amostras extraídas com DNA IQ System, 66,6% dos perfis de maçanetas expostas ao sol teriam pelo menos 8 marcadores STR com correspondência alélica para o doador secundário, enquanto que 20% dos perfis de maçanetas em dias chuvosos serviriam para esta finalidade (Gráfico 4).

Para amostras extraídas com o Casework Direct Kit, 100% dos perfis obtidos de maçanetas em dias ensolarados seriam úteis, contra 62,5% dos perfis de maçanetas em dias chuvosos (Gráfico 4). Portanto, as amostras em dias de chuva não obtiveram nenhuma alteração com relação à análise anterior em ambos os kits, feita para 8 dos 13 marcadores do CODIS original. Esse resultado

pode ser explicado devido à presença da água da chuva que, de alguma forma, poderia estar prejudicando as reações de extração ou amplificação, ou mesmo danificando a molécula de DNA (Butler, 2011). É possível que o efeito destrutivo da chuva sobre a molécula de DNA seja mais rápido do que o sol, uma vez que a chuva age mecanicamente sobre o objeto, podendo remover o material depositado, enquanto o sol age quimicamente, de modo a degradá-lo. Além disso, a água da chuva pode ter sido coletada juntamente à amostra, podendo prejudicar o seu processamento mesmo após a coleta. Já a ação do sol se limitaria ao período entre a deposição e a coleta.

Porém, cabe ressaltar que as coletas foram realizadas logo após a deposição do material genético, tanto para amostras em dias ensolarados, quanto para amostras em dias chuvosos. Sabendo que quanto mais tempo as células humanas ficarem expostas em um ambiente aberto, mais se deteriorarão, dificultando a recuperação do DNA presente nas mesmas (Raymond et al., 2009), caso as maçanetas ficassem expostas por mais tempo à chuva ou ao sol, talvez os resultados obtidos no estudo fossem diferentes. Para locais chuvosos e úmidos, existem alguns relatos referentes à recuperação do DNA para geração de perfis genéticos. Por exemplo, Lee et al., (2019) demonstraram que amostras de queratinócitos expostas há pelo menos três semanas em locais abertos de Singapura, cuja chuva é abundante e a umidade alta, ainda podiam ser recuperadas para gerar perfis genéticos completos, em diferentes superfícies, como plástico, alumínio, vidro etc. Por sua vez, Meixner et al. (2020) demonstraram que é possível obter perfis STR de amostras que foram submergidas em ambientes aquáticos por dias seguidos. Usando pedaços de pele de porco que foram manuseadas, esses autores testaram a obtenção de perfis genéticos em amostras colocadas em água fria, quente e a temperatura ambiente, concluindo que a água fria foi propícia para a recuperação do material que havia sido depositado pelo doador, permitindo, inclusive, a geração de um perfil completo de DNA após 7 dias.

Sendo assim, novas pesquisas são necessárias para saber o efeito a longo prazo que a chuva poderia causar nas impressões digitais depositadas em

maçanetas de carros, embora estudos recentes demonstrem que o material genético pode persistir por horas ou dias, mesmo estando em contato com água ou ambientes úmidos.

6.9 Ausência de perfis após amplificação com kit PowerPlex® Y 23 System

Onze amostras não obtiveram perfis STR quando amplificadas com o kit PowerPlex Fusion System e continham como doador secundário um indivíduo do sexo masculino e foram analisadas quanto à possibilidade de obtenção de perfil de cromossomo Y, que pudesse auxiliar na identificação. Oito delas eram provenientes de empunhaduras de facas, sendo 3 de aço, 3 de madeira e 2 de polipropileno, e 3 de maçanetas de carros, sendo 2 de dias chuvosos e 1 de um dia ensolarado. No entanto, quando amplificadas com o Kit PowerPlex Y23 System, também não produziram perfis específicos para o cromossomo Y.

Ainda que o kit PowerPlex® Y 23 System apresente uma alta sensibilidade e seja validado para analisar fluidos com misturas de diferentes indivíduos (Promega Corporation website), podendo inclusive ser capaz de detectar quantidades ínfimas de DNA masculino que esteja mascarado por grandes quantidades de material genético feminino (Thompson et al., 2013; Jain et al., 2016), talvez em amostras de mistura de DNA de toque, que contenham quantidades exíguas de DNA, o kit mostre-se limitado ou, mais provavelmente, essas amostras realmente não continham material genético. Thompson et al. (2013) demonstraram que foi possível obter perfis STR completos do cromossomo Y com o kit PowerPlex® Y 23 System para amostras com quantificação de 0,0625ng, no entanto, amostras abaixo de 0,031ng passaram a gerar perfis incompletos. Considerando que, em nosso estudo, todas as amostras obtiveram valores de quantificação menores do que esse, a perda de alelos, ou a impossibilidade de obtenção de perfis genéticos, já era esperada.

Sendo assim, levando em conta que as amostras testadas já não haviam obtido perfis com o kit PowerPlex® Fusion System, é possível que, de fato, não continham nenhum material genético dos contribuidores da mistura, ou, mesmo tendo DNA, a quantidade era insuficiente para a amplificação. Isso pode ser

devido a características inerentes ao tipo de porosidade das empunhaduras de facas (considerando que a maior parte delas eram provenientes desse tipo de material), ou devido aos fatores ambientais, uma vez que duas dessas amostras foram obtidas de maçanetas sob exposição à chuva, que pode ter lavado a maior parte do material genético depositado. A amostra C13, que não se enquadra em nenhuma dessas alternativas, pode ser consequência de alterações no *status shedder* dos participantes, tendo em vista que já se foi relatado que uma pessoa pode depositar mais ou menos DNA em diferentes ocasiões (Goray et al., 2016).

Considerando que 5 dessas 11 amostras não continham dados de quantificação (F13M, F15A, F15M, C13M, e C29), outras 5 (F5A, F7A, F7M, F13P e C21) continham quantificação para apenas um dos marcadores *Large* ou *Small* e apenas 1 continha quantificação para ambos (F15P), esses resultados reforçam a percepção de que amostras de DNA de toque de fato estão sujeitas a uma imprecisão na etapa de quantificação (Cupples et al. 2009), como já foi discutido anteriormente.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo, conclui-se que é possível gerar perfis de STR para amostras de DNA de toque provenientes de misturas com o kit PowerPlex® Fusion System (Promega) após a deposição de material genético em teclados de computadores, empunhaduras de facas e volantes e maçanetas de carros, para auxiliar na elucidação de cibercrimes, homicídios com armas brancas e roubos de veículos, respectivamente. No entanto, a identificação do perfil do criminoso na mistura e a utilidade dos perfis gerados para as investigações dependerá de uma série de fatores. De um modo geral, para a recuperação e processamento de amostras de toque obtidas de teclados de computadores, empunhaduras de facas e maçanetas de carros, o Casework Direct Kit foi o método de extração mais vantajoso, permitindo gerar perfis mais completos e úteis para a identificação humana. Isso significa que, em termos práticos, este kit poderia substituir o uso do DNA IQ System, visando aumentar a eficácia dos resultados para a elucidação de crimes.

Para ambos os métodos de extração, a quantificação das amostras de DNA de toque não foi precisa, pois foram constatados resultados contraditórios entre valores de quantificação e qualidade dos perfis STR gerados. Isso evidencia a necessidade de aprimorar esta etapa do processamento de amostras de baixa quantidade de DNA que sejam provenientes de cenas de crimes, uma vez que neste estágio se determina como será realizada a amplificação subsequente, pois o volume de reagentes utilizados na PCR multiplex pode variar de acordo com a quantidade de DNA presente na amostra.

O método de extração com o Casework Direct Kit se mostrou mais eficaz para a recuperação do material genético depositado pelos participantes do estudo do que o kit DNA IQ System, tanto em relação à média de alelos verdadeiros presentes nos perfis, quanto no percentual menor de alelos extras que dificultam a análise dos mesmos. Além disso, com esse mesmo método foi possível obter uma maior quantidade de marcadores sem *drop-out* alélico para o doador secundário da mistura, fator necessário para que o perfil seja integrado ao Banco

Nacional de Perfis Genéticos da Rede Integrado de Bancos de Perfis Genéticos. Em termos estatísticos, o kit Casework se mostrou significativamente mais eficaz para a produção de perfis úteis para uma investigação.

O tipo de superfície em que o material genético foi depositado também influencia na obtenção e qualidade de perfis STR, dependendo da porosidade e rugosidade que o mesmo possui. Nesse contexto, volantes foram os que melhor representaram possibilidades de obtenção de perfis genéticos e identificação de criminosos, seguidos por maçanetas de carros e teclados de computadores. Por fim, as empunhaduras de facas representaram os materiais mais difíceis de obter perfil STR, e novas estratégias precisam ser pensadas para melhorar a recuperação do DNA deixado neste tipo de objeto. Ainda assim, a deposição e recuperação do DNA parece ser possível para todos os tipos de materiais estudados.

O *status shedder*, por sua vez, não pareceu ser um fator relevante para a qualidade dos perfis gerados, tendo em vista que não se manteve igual para todos os indivíduos quando estes foram submetidos a diferentes experimentos. Isso sugere que uma mesma pessoa pode atuar como boa ou má doadora, dependendo de outros fatores que possam influenciar a capacidade de deposição e recuperação do material genético.

No que diz respeito ao sexo dos indivíduos, foi possível observar que a existência de duas mulheres na mistura parece ser mais favorável à recuperação do perfil de doadores secundários, enquanto que a presença de dois homens mostra melhor resultado para doadores primários. É possível, portanto, que alguns indivíduos atuem mais como removedores de células do que depositores e, se mulheres tendem a ser más doadoras, elas devem estar mais propensas a remover as células previamente depositadas pela primeira pessoa que tocou o objeto. No entanto, esse fenômeno requer mais atenção e novos estudos para melhor compreender e esclarecer a nossa hipótese e, assim, compreender até que ponto um indivíduo será capaz de agir como depositante ou removedor de células deixadas na superfície.

Artefatos tais como *drop-in* ou *drop-out* alélico se mostraram presentes em todos os experimentos, independentemente do tipo de material ou método de extração usado, evidenciando a necessidade de se buscar maneiras de diminuir o impacto sofrido pelos mesmos na análise dos perfis STR, considerando que o grau em que estão presentes pode impossibilitar a identificação do criminoso na mistura.

Por fim, foi possível obter perfis genéticos tanto em dias de sol quanto em dias de chuva e a eficácia de ambas as condições ambientais para obtenção de perfis úteis variou conforme o tipo de análise utilizada (8 dos 13 marcadores STR do CODIS original ou 8 dos 20 marcadores do CODIS atual). Porém, como a coleta dos experimentos foi feita logo após a deposição, novos estudos acerca da influência da chuva e do sol a longo prazo sobre amostras de DNA de toque são fundamentais para verificar se, numa investigação real, em que os veículos não são analisados pela perícia imediatamente após o ato criminoso e tendem a ficar expostos à ambientes abertos por um longo período de tempo, esses resultados se manteriam.

8. PUBLICAÇÃO REULTANTE DESSE TRABALHO

1. Francisco DO, Lopez LF, Gonçalves FT, Fridman C. Casework direct kit as an alternative extraction method to enhance touch DNA samples analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2020 Jul;47:102307. doi: 10.1016/j.fsigen.2020.102307. (Apêndice 1).

9. ANEXOS

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

2. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo de DNA de Toque em situações simuladas para finalidades forenses

PESQUISADOR: Cintia Fridman

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Responsável

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRBio Nº 020694/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e Trabalho - LIM/40

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Carta de informação ao sujeito.

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar como voluntário da pesquisa “Estudo de DNA de Toque em Situações Simuladas para Finalidades Forenses”, que tem como objetivo investigar a possibilidade de auxiliar o trabalho da polícia técnico-científica. Para isso, sua participação envolverá necessariamente manipular com as mãos diferentes objetos, como facas, maçanetas e volantes de carros e teclados de computadores. Por meio desse contato com tais materiais teremos acesso às suas Impressões Digitais, as quais serão utilizadas como uma tentativa de obter seu perfil de DNA, que estará misturado a uma segunda pessoa, que também manipulará esses materiais. Além disso, como voluntário será necessário doar uma amostra de sangue do dedo anelar que será coletado com o uso de uma pequena agulha, para obtermos também o seu perfil de DNA individual. Ao todo serão seis participantes, sendo que quatro deles serão os proprietários dos carros e teclados utilizados, sendo assim, serão contatadas pessoas que estejam dispostas a permitir o uso de seu carro e/ou teclado de computador para os experimentos que serão conduzidos. Também será necessário que o participante tenha disponibilidade de ir até a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo nos dias em que forem combinados para a realização dos experimentos, que serão efetuados em dias diferentes de uma mesma semana e serem repetidos em semanas diferentes. Cada experimento poderá durar até 15 minutos.

Gostaríamos de informar que esse perfil de DNA obtido não serve para nenhuma outra finalidade e não identifica nenhuma doença ou característica física sua.

Informamos a você que os riscos durante a realização desse estudo são mínimos e estão envolvidos com a coleta do sangue, pois no momento da picada no dedo anelar pode ser que seja sentida uma leve dor ou desconforto. Não haverão benefícios diretos para nenhum participante, mas pretende-se que os resultados dessa pesquisa possam beneficiar a polícia técnico-científica na identificação de suspeitos em futuras investigações criminais. Ressaltamos que os resultados da mesma serão divulgados apenas para esse trabalho acadêmico, obedecendo ao sigilo e impossibilitando a sua identificação. Quaisquer dúvidas que existirem agora ou a qualquer momento até a conclusão do estudo poderão ser esclarecidas, bastando entrar em contato com a pessoa responsável pelo projeto, Doutora Cintia Fridman, que pode ser encontrada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo, 455, (11)30618423 ou (11)30618409. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da

pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): **Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000** Tel: 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br. Os voluntários não serão obrigados a participarem da pesquisa, podendo desistir a qualquer momento, ou seja, em eventual situação de desconforto, poderão cessar sua colaboração sem consequências negativas. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Fica garantida a indenização em caso de qualquer dano comprovado resultante de sua participação na pesquisa.

Termo de consentimento

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto “Estudo de DNA de Toque em Situações Simuladas para Finalidades Forenses”. Eu discuti com a pesquisadora Prof. Dra. Cintia Fridman sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Esse Termo será assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará com você e outra com a(s) pesquisador(as).

Assinatura do sujeito

Data / /

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

ANEXO B

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE DNA DE TRANSFERÊNCIA EM SITUAÇÕES SIMULADAS PARA FINALIDADES FORENSES

Pesquisador: Cintia Fridman

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 57976516.5.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.056.555

Apresentação do Projeto:

O projeto esta apresentado de maneira clara e objetiva e será a dissertação de Mestre da aluna Daniela de Oliveira Francisco, pelo programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Experimental da FMUSP, sob orientação da Dra. Cintia Fridman.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto irá analisar e aprimorar a viabilidade de obtenção de perfis de DNA em diferentes materiais de empunhaduras de facas, maçanetas e volantes de carros, e em teclados de computadores, por meio de situações simuladas de transferência direta e secundária, considerando as variáveis que podem interferir no processo, com a finalidade de auxiliar o trabalho da polícia técnico-científica na identificação de criminosos. Um grupo de seis pessoas, sendo três homens e três mulheres, produzirão Impressões Digitais (Touch DNA) ao serem submetidos a três diferentes situações simuladas envolvendo empunhaduras de facas, volantes e maçanetas de carros e teclados de computadores. Quatro desses indivíduos (dois homens e duas mulheres) serão os doadores primários em todos os experimentos, e os outros dois (um homem e uma mulher) desempenharão o papel de doadores secundários. Dessa forma, esperamos poder

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.056.555

comparar a diferença individual de transferência em materiais distintos, o que não seria possível caso cada experimento fosse realizado com indivíduos diferentes. Os participantes estarão na faixa de 20 a 45 anos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos durante a realização desse estudo são mínimos e estão envolvidos com a coleta do sangue, pois no momento da picada no dedo anelar pode ser que seja sentida uma leve dor ou desconforto e poderá haver, eventualmente, a formação de hematoma no local da picada.

Benefícios: Não haverá benefício diretos para nenhum participante. O benefício da pesquisa será a possibilidade de beneficiar a polícia técnico-científica na identificação de suspeitos em futuras investigações criminais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda é exclusiva do Centro Coordenador, então as alterações realizadas neste projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

Recomendações:

nenhuma recomendação a ser considerada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto com emenda que não apresenta pendências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_893192 E1.pdf	31/03/2017 11:59:53		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	SAGe.pdf	19/07/2016 09:56:50	Fernanda de Toledo Gonçalves	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	14/07/2016 11:43:59	Cintia Fridman	Aceito
Outros	Cadastro_Online.pdf	12/07/2016 16:07:40	Cintia Fridman	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.056.555

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FINAL_12072016.docx	12/07/2016 16:06:27	Cintia Fridman	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_FINAL_12072016.docx	12/07/2016 16:06:11	Cintia Fridman	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Maio de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

10. REFERÊNCIAS

- Alessandrini F, Cecati M, Pesaresi M, Turchi C, Carle F, Tagliabracci A. Fingerprints as evidence for a genetic profile: Morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing. **J Forensic Sci.** 2003;48(3):586-92.
- Balogh MK, Burger J, Bender K, Schneider PM, Alt KW. Fingerprints from fingerprints. **Int Congr Ser.** 2003;1239:953-57.
- Bender K, Farfán MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. **Forensic Sci Int.** 2004;139:135-40.
- Bezerra CC. Exame de DNA: coleta de amostras biológicas em local de crime. **Perícia Federal: DNA forense - técnicas de coleta em locais de crimes** 2004;18:6-14.
- Brown TA. Clonagem Gênic e Análise de DNA na Ciência Forense. In: BROWN, T. A. **Clonagem Gênica e análise de DNA.** Porto Alegre: Artmed. 2003.p. 335-345.
- Buckingham AK, Harvey ML, Oorschot RAHV. The origin of unknown source DNA from touched objects. **Forensic Sci Int Genet.** 2016;25:26-33.
- Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A. Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science. **Croat Med J.** 2009;50(3):207-17.
- Butler JM. **Forensic DNA Typing.** San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- Butler JM. **Fundamentals of Forensic DNA Typing.** San Diego: Elsevier Academic Press. 2010.
- Butler JM. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.** San Diego: Elsevier Academic Press. 2011.
- Butler JM. The future of forensic DNA analysis. **The R Soc.** 2015;5;370(1674):20140252.
- Cale CM, Earll ME, Latham KE, Bush GL. Could secondary DNA transfer falsely place someone at the scene of a crime? **J Forensic Sci.** 2016;61(1):196-203.
- Champion J, Kanokwongnuwut P, Oorschot RAHV, Taylor D, Linacre A. Evaluation of a fluorescent dye to visualize touch DNA on various substrates. **J Forensic Sci.** In press 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14695>
- Colussi A, Viegas M, Beltramo J, Lojo M. Efficiency of DNA IQ System in recovering semen DNA from cotton swabs. **Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.** 2009;2:87-8.

Federal Bureau of Investigation. **Combined DNA Index System (CODIS)**. [citado em 4 fev 2021]. Disponível em: <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>.

Cupples CM. STR Profiles from DNA Samples with “Undetected” or Low Quantifier Results. **J Forensic Sci**. 2009;54(1):103-107.

Daly DJ, Murphy C, McDermott SD. The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. **Forensic Sci Int Genet**. 2012;6(1):41-6.

Dierig L, Schmidt M, Wiegand P. Looking for the pinpoint: Optimizing identification, recovery and DNA extraction of micro traces in forensic casework. **Forensic Sci Int Genet** . 2020;44:102191.

Dolinsky LC, Pereira LMCV. DNA Forense – Artigo de Revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**. 2007; 2(2):11-22.

Evans J, Hadi S. Low Template DNA: Tad, Touch and Traces. **J Foren Path**. 2018;3(1):1-5.

Farmen RK, Jaghø R, Cortez P, Frøyland-ES. Assessment of individual shedder status and implication for secondary DNA transfer. **Forensic Sci Int Genet Suppl Ser**. 2008;1(1):415-17

Fonneløp AE, Johannessen H, Egeland T, Gill P. Contamination during criminal investigation: Detecting police contamination and secondary DNA transfer from evidence bags. **Forensic Sci Int Genet**. 2016;23:121-29.

Fonneløp AE, Ramse M, Egeland T, Gill P. The implications of shedder status and background DNA on direct and secondary transfer in an attack scenario. **Forensic Sci Int Genet**. 2017;29:48–60.

Gans J, Urbas G. DNA Identification in the Criminal Justice System. **Trends & issues in crime and criminal justice**. 2002;226:1-6

Garrido RG. Evolução dos processos de Identificação Humana: Das características antropométricas ao DNA. **Genética na Escola**. 2009;5(2):30-40.

Giardina E, Spinella A, Novelli G. Past, present and future of forensic DNA typing. **Nanomedicine (Lond)**. 2011;6(2):257-70.

Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. **Forensic Sci Int**. 2000;112(1):17-40.

Gill P. Application of low copy number DNA profiling. **Croat Med J**. 2001;42(3):229-32.

Goaray M, Eken E, Mitchell RJ, van Oorschot RA. Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions. **Forensic Sci Int Genet.** 2009;4(2):62-7.

Goaray M, Mitchell RJ, van Oorschot RA. Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions. **Leg Med (Tokyo).** 2010;12(3):117-20.

Goaray, M., Fowler, S., Szkuta, B., Oorschot, R. A. H. Shedder status - an analysis of self and non-self DNA in multiple handprints deposited by the same individuals over time. **Forensic Sci Int Genet.** 2016; 23:190-196.

Goaray M, Kokshoorn B, Steensma K, Szkuta B, Oorschot RAH. **DNA detection of a temporary and original user of an office space.** *Forensic Sci Int Genet.* 2020;44:102203.

Goaray M, Oorschot RAHV. Shedder status: Exploration means of determination. **Sci. Justice.** In press 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2021.03.004>

Graham EK, Loten M, Thompson J, Drobac J, Gopalakrishnan A. Developmental Validation of the Casework Direct Kit, Custom: A Method for the Rapid Processing of Casework Samples. **Promega Corporation.** 2018:1-16.

Gršković B, Markulin D, Crnjac J, Anđelinović S, Marijanović I, Tomašević L, Popović M, Primorac D. Impact of Donor Age, Gender and Handling Time on the DNA Concentration Left on Different Surfaces. **Int J Biomed.** 2014;4(3):169-17.

Hares, DR. Selection and implementation of expanded CODIS core *loci* in the United States. **Forensic Sci Int Genet.** 2015;17:33–34.

Jain T, Shrivastava P, Bansal DD, Dash HR, Trivedi VB. PowerPlex Y23 System: A Fast, Sensitive and Reliable Y-STR Multiplex System for Forensic and Population Genetic Purpose. **Mol Biomark Diagn.** 2016; 7(3): 1-7.

Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nat Rev Genet.** 2004;5(10):739-51.

Kaushal N, Kaushal P. Human Identification and Fingerprints: **A Review. Journal Biom Bioest.** 2011;2(4):1-5.

Kamphausen T, Schadendorf D, von Wurmb-Schwark N, Bajanowski T, Poetsch M. Good shedder or bad shedder--the influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions. **Int J Legal Med.** 2012;126(1):179-83

Kirgiz IA, Calloway C. Increased recovery of touch DNA evidence using FTA paper compared to conventional collection methods. **J Forensic Leg Med.** 2017;47:9-15.

Kokshoorn B, Aarts LHJ, Ansell R, Connolly E, Drotz W, Kloosterman AD, McKenna LG, Szkuta B, Oorschot RAH. Sharing data on DNA transfer, persistence, prevalence and recovery: Arguments for harmonization and standardization, **Forensic Sci Int Genet.** 2018; 37: 260-269.

Lacerenza D, Aneli S, Omedei M, Gino S, Pasino P, Berchiolla C, Robino C. A molecular exploration of human DNA/RNA co-extracted from the palmar surface of the hands and fingers. **Forensic Sci Int Genet.** 2016; 22: 44-53.

Lee HC, Ladd C. Preservation and collection of biological evidence. **Croat Med J.** 2001;42(3):225-8.

Lee LYC, Wong HY, Lee JY, Waffa ZBM, Aw ZQ, Fauzi SNABM, Hoe SY, Lim M, Syn CK. Persistence of DNA in the Singapore context. **Int J Legal Med.** 2019; 133:1341-1349.

Linacre A. Review of low template DNA typing. **Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.** 2009;2:549-50.

Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P. The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. **Forensic Sci Int.** 2002;129(1):25-34.

Lowe A, Murray C, Richardson P, Wivell R, Gill P, Tully G, Whitaker J. Use of low copy number DNA in forensic inference. **Int Congr Ser.** 2003; 1239:799-801.

Kallapurackal V, Kummer S, Voegeli P, Kratzer A, Dorum G, Haas C, Hess S. Sampling touch DNA from human skin following skin-to-skin contact in mock assault scenarios—A comparison of nine collection methods. **J Forensic Sci.** In press 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14733>.

Kanokwongnuwut, P, Martin, B, Kirkbride, K. P, Linacre, A. Shedding light on shedders. **Forensic Sci Int Genet.** 2018; 36: 20-25.

Manoli P, Antoniou A, Bashiardes E, Xenophontos S, Photiades M, Stribley V, Mylona M, Demetriou C, Cariolou MA. Sex-specific age association with primary DNA transfer. **Int J Legal Med.** 2016;130(1):103-12.

Mapes, AA, Kloosterman AD, Marion V, Poot CJ. Knowledge on DNA success rates to optimize the DNA analysis process: from crime scene to laboratory, **J. Forensic Sci.** 2016; 61(4):1055-1061.

McCartney C, Williams R, Wilson T. The Future of Forensic Bioinformation. London: Nuffield Council on Bioethics. 2010.

Meakin G, Jamieson A. DNA transfer: review and implications for casework. **Forensic Sci Int Genet.** 2013;7(4):434-43.

Meixner E, Kallapurackal V, Kratzer A, Voegeli P, Thali MJ, Bolliger SA. Persistence and detection of touch DNA and blood stain DNA on pig skin exposed to water. **Forensic Sci Med Pathol.** 2020;16(2):243-251

Ministério da Segurança Pública. **Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos**. 2019.

Brasil. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos. **XIII Relatório da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos**: dados estatísticos e resultados - Mai/2020 a Nov/2020. Brasília (DF): RIBPG; 2020 [citado em 6 Fev 2020]. Disponível em: https://politica.estadao.com.br/blogs/fausto-macedo/wp-content/uploads/sites/41/2021/01/xiiirelatoriodaredeintegradadebancosdeperfisgeneticosnovembro2020_290120212555.pdf.

Mishra IK, Singh B, Mishra A, Mohapatra BK, Kaushik R, Behera C. Touch Dna as Forensic Aid: A Review. **Indian J Forensic Med Toxicol**. 2020;14(2):58-62.

Moretti TR., Moreno LI, Smerick JB, Pignone ML., Hizon R, Buckleton JS, Onorato AJ. (2016). Population data on the expanded CODIS core STR *loci* for eleven populations of significance for forensic DNA analyses in the United States. **Forensic Sci Int Genet**. 2016; 25:175–181.

Estados Unidos da América. Norton by Symantec. **Norton Cyber Security Insights Report 2017: Global Results**; 2017 [citado em 6 Fev 2020]. Disponível em: <https://www.nortonlifelock.com/us/en/newsroom/press-kits/ncsir-2017/>

Olewi AA, Morris MR, Schmerer WM, Sutton R. The relative DNA-shedding propensity of the palm and finger surfaces. **Sci. Justice**. 2015;55 (5):329–334.

Oorschot RAHV, Phelan DG, Furlong G, Scarfo M, Holding NL, Cummins MJ. Are you collecting all the available DNA from touched objects? **Int Congr Ser**. 2003;123:803-80.

Oorschot RAHV, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review. **Investig Genet**. 2010;1(1):1-17

Oorschot RAHV, McArdle R, Goodwin WH, Ballantyne KN. DNA transfer: The role of temperature and drying time. **Leg Med (Tokyo)**. 2014;16(3):161-3.

Oorschot RAHV, Szkuta B, Meakin GE, Kokshoorn B, Goray M. DNA transfer in forensic science: A review. **Forensic Sci Int Genet**. 2019;38:140-166.

Pang BC, Cheung BK. Double swab technique for collecting touched evidence. **Leg Med (Tokyo)**. 2007;9(4):181-4.

Pena SDJ. **Segurança Pública: Determinação da identidade genética pelo DNA**. In: Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas; 2005;20:447-460.

Phipps M, Petricevic S. The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. **Forensic Sci Int**. 2007;168(2-3).

Poetsch M, Bajanowski T, Kamphausen T. Influence of an individual's age on the amount and interpretability of DNA left on touched items. **Int J Legal Med.** 2013;127(6):1093-6.

Poetsch M, Pfeifer M, Konrad H, Bajanowski T, Helmus J. Impact of several wearers on the persistence of DNA on clothes—a study with experimental scenarios. **Int J Legal Med.** 2017;132(1):117–123.

Promega Corporation website. **PowerPlex® Y23 System.** [citado em 15 ago 2019]. Disponível em:<https://www.promega.com.br/products/forensic-dna-analysis-ice/str-amplification/powerplex-y23-system/?catNum=DC2305>.

Quinones I, Daniel B. Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. **Forensic Sci Int Genet.** 2012;6(1):26-30.

Raymond JJ, van Oorschot RA, Gunn PR, Walsh SJ, Roux C. Trace evidence characteristics of DNA: A preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. **Forensic Sci Int Genet.** 2009;4(1):26-33.

Reno J, Marcus D, Leary ML, Samuels JE. **The Future of Forensic DNA Testing: Predictions of the Research and Development Working Group.** Washington, DC: National Institute of Justice. 2000.

Samie L, Hicks T, Castella V, Taroni F. Stabbing simulations and DNA transfer. **Forensic Sci Int Genet.** 2016;22:73-80.

Samie L, Taroni F, Champod C. Estimating the quantity of transferred DNA in primary and secondary transfers. **Sci Justice.** 2020;60:128-135.

Secretaria da Segurança Pública. **Indicadores da criminalidade do Estado de São Paulo.** 2018. Disponível em:<<http://www.ssp.sp.gov.br/novaestatistica/default.aspx>>. Acesso em: 5 mar 2018.

Sessa F, Salerno M, Bertozzi G, Messina G, Ricce P, Ledda C, Rapisarda V, Cantore S, Turillazzi E, Pomara C. Touch DNA: impact of handling time on touch deposit and evaluation of different recovery techniques: An experimental study. **Sci Rep.** 2019; 9(1): 1-9.

Silva JP. **Avaliação da utilização do reagente Casework Direct na análise genética de rotina de amostras forenses.** Relatório de Estágio do Mestrado em Engenharia Biológica e Química. Setúbal: Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico Setúbal. 2018.

Szkuta B, Oorschot RAH, Ballantyne KN. DNA decontamination of fingerprint brushes, **Forensic Sci Int.** 2017; 277: 41-50.

Smith PA. When DNA Implicates the Innocent. **Scientific American,** 2016;314(6):11–12.

Smith C, Cox JO, Rhodes C, Lewis C, Koroma M, Hudson BC, Cruz TD. Comparison of DNA typing success in compromised blood and touch samples based on sampling swab composition. **J Forensic Sci**. In press 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14694>

Social Progress Imperative. **Índice de Progresso Social 2015**; Washington, DC; 2015 [citado 9 nov 2019]. Disponível em: <http://www.socialprogressimperative.org/pt/data/spi#map/countries/com4/dim1,com4,dim2,dim3>

Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. **J Forensic Sci**. 1997;42(2):320-2.

Tang J, Ostrander J, Wickenheiser R, Hall A. Touch DNA in forensic science: The use of laboratory-created eccrine fingerprints to quantify DNA loss. **Forensic Sci Int**. 2020; 2:1–16.

Thompson JM, Ewing MM, Frank WE, Pogemiller JJ, Nolde CA, Koehler DJ, Shaffer AM, Rabbach DR, Fulmer PM, Sprecher CJ, Douglas R. Storts a Developmental validation of the PowerPlex1 Y23 System: A single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. **Forensic Sci Int Genet**. 2013;7:240-250.

Tobias SHA, Jacques GS, Morgan RM, Meakin GE, The effect of pressure on DNA deposition by touch. **Forensic Sci Int Genet Suppl**. 2017;Ser. 6:e12–e14.

Tozzo P, Giuliadori A, Rodriguez D, Caenazzo L. Effect of dactyloscopic powders on DNA profiling from enhanced fingerprints: results from an experimental study. **Am J Forensic Med Pathol**. 2014;35(1):68-72

Organização das Nações Unidas. United Nations Office on Drugs and Crime. **Global Study on Homicide**. 2013 [citado em 5 mar 2016]. Disponível em: <http://www.unodc.org/gsh/>.

Verdon TJ, Mitchell RJ, Oorschot RAHV. The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency. **Forensic Sci Int Genet**. 2013;7(1):167-75.

Wickenheiser RA, Hons BS. Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. **J Forensic Sci**. 2002;47(3):442-50.

Whitaker JP, Cotton EA, Gill P. A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR SGM Plus multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. **Forensic Sci Int**. 2001;123(2-3):215-23

APÊNDICE 1

Francisco DO, Lopez, LF, Gonçalves FT, Fridman, C. Casework Direct Kit as an alternative extraction method to enhance touch DNA samples analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2020:102307.

Forensic Science International: Genetics 47 (2020) 102307



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen



Research paper

Casework direct kit as an alternative extraction method to enhance touch DNA samples analysis



Daniela de Oliveira Francisco^a, Luis Fernandez Lopez^{a,b}, Fernanda de Toledo Gonçalves^a, Cintia Fridman^{a,*}

^a Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Center for Internet Augmented Research and Assessment (CIARA), Florida International University, Miami, FL, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Touch DNA
Crime
Forensic genetics
DNA extraction
Transfer DNA
STR

ABSTRACT

Latent fingerprints are commonly found in crime scenes, and currently used in forensic analysis to obtain STR profiles from DNA recovered from finger contact. Analysis of STR profiles obtained from touch DNA has been very useful to elucidate crimes and the extraction method may be determinant for the recovery of genetic material collected from different surfaces. This study aimed to verify and compare the efficiency of two different extraction kits for processing touch DNA samples obtained from fingerprints deposited on computer keyboards, knife handles and exterior door handles and steering wheels of cars.

One hundred and four experiments were conducted to simulate crime scenes and evaluate the efficiency of two extraction kits for touch DNA samples: the DNA IQ™ System and the Casework Direct Kit (both Promega Corporation). Each experiment was conducted with two individuals in order to obtain a mixture profile. The genetic material deposited was collected by double swab method (Sweet et al. 1997) and DNA quantification was conducted using Quantifiler Trio™ (ThermoFisher Scientific). Samples were amplified by PowerPlex® Fusion System kit (Promega).

It was possible to obtain STR profiles for 32 (61.5%) out of the 52 extracted using DNA IQ and 51 (98.1%) out of the 52 extracted using the Casework Direct Kit. Samples extracted by DNA IQ had higher average of quantification values for long targets (> 200bp) across all tested surfaces. That seems to be due to an incompatibility between the Quantifiler Trio and the Casework Direct Kit. Samples with positive quantification but without STR profile, as well as samples without quantification but with STR profiles were also observed.

Statistical analysis showed that the Casework Direct Kit produced significantly more useful profiles than DNA IQ (p -value = 0.001), since these profiles had more STR markers with allelic correspondence to second donors present in the mixture.

This study provides insights about the effect of different surfaces and extraction methods on recovery and generation of STR profiles. Limitations for the quantification step for these samples with a low quantity of DNA were highlighted as well. We concluded that the Casework Direct Kit was much more efficient for processing touch DNA samples than DNA IQ.

1. Introduction

A biological sample can be obtained from a crime scene in several forms, for example, as a blood or semen stain, a tissue sample or a fingerprint. Touch DNA samples are those left on crime scenes by skin contact on a surface, and contain low quantities of DNA, often achieving picogram levels [1–4]. The DNA present in these samples, despite the low quantity, can be used to obtain individual STR genetic profiles that can help an investigation to link suspect and traces found

in a crime scene [4].

Current studies in this area are focused on analyzing different variables that can impact the DNA transfer, like the kind of surface touched [5–9], the shedder status that varies among different people or within the same person under different conditions [10–16], the persistence of a transferred sample [17–20], activities performed before or during the contact [21–23], and identifying the best methodology for recovery of the DNA present in a trace [19,24–27], and others.

Touch DNA samples are quite challenging because their analysis can

* Corresponding author at: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho – FMUSP, Rua Teodoro Sampaio 115, CEP: 05405-000, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: cfridman@usp.br (C. Fridman).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102307>

Received 14 October 2019; Received in revised form 28 April 2020; Accepted 30 April 2020

Available online 15 May 2020

1872-4973/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

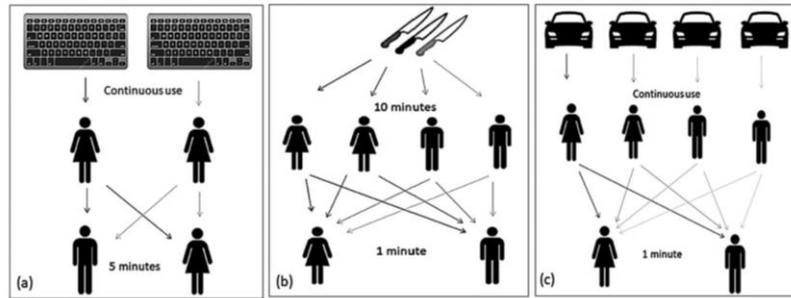


Fig. 1. Scheme of experiments performed on (a) computer keyboards, (b) knife handles and (c) steering wheels and exterior door handles of cars. Each line refers to a single experiment.

be compromised in some situations as such complex mixture profiles that can be provided from many contributors [2,3,7,18]. The surface can be unfavorable to recovering DNA deposited and degradation by environmental factors, such as high temperatures or excessive light exposure [17,18], may complicate the interpretation of touch DNA results. Inappropriate collection, extraction or amplification methods [28–33] can compromise the processing of these samples.

Many DNA extraction methods currently utilized do not recover all DNA collected from the crime scene, and studies have focused on optimizing extraction techniques [3]. As most epithelial cells from latent fingerprints are nuclei-free corneocytes, and touch DNA samples obtained from fingerprints have a low concentration of DNA [34], new methodologies for this kind of sample are desired to optimize extraction results. These methodologies should be capable of extracting most DNA and removing amplification inhibiting elements with minimal DNA loss [3,33]. As demonstrated by Tang et al. [35], 56–77% of DNA can be lost during touch DNA samples processing, and this could potentially impair an investigation.

The DNA IQ™ System (DNA IQ) is an extraction and magnetic bead-based purification of nucleic acids kit developed for forensic purposes, capable of extracting DNA from a variety of sample types, including stains and liquid samples, and removing PCR inhibitors and contaminants frequently encountered in casework samples through multiple wash steps [36]. Studies had demonstrated that DNA IQ presented best results for DNA extraction when compared to other methods, like conventional organic extraction [37] and Chelex®100 [38]. Due these advantages, DNA IQ is the current method used in many laboratories around the world, including for forensic analysis in São Paulo city, Brazil.

Recently, another kit for forensic purposes, the Casework Direct Kit (Casework), was developed as a new method of extraction based in a no-wash protocol, maximizing the chance of recovering DNA collected from fingerprints. Graham et al. [39] demonstrated that Casework is a suitable, accurate and reproducible method for the rapid isolation of DNA. However, when compared with the Maxwell 16 System DNA IQ Casework Pro Kit, another magnetic-resin method, Hakim et al. [40] suggested that Casework produces less DNA template for STR allele calls in autosomal and Y-STR analyses. As a new kit, more studies are necessary to verify the ability of Casework to recover touch DNA in different scenarios.

It is known that some of the most common crimes in Brazil involve cybercrimes, weapon crimes and cars theft, and that the porosity of objects can influence the retention of cells [2,7,30]. So, in order to obtain useful profiles to be inserted in the National Databank, this study aimed to test and compare the efficiency of DNA IQ and Casework for recovering touch DNA samples obtained from fingerprints deposited on different surfaces.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

Simulated situations of crimes were conducted on computer keyboards, 3 types of knife handles and exterior door handles and steering wheels of cars. Nine volunteers (4 men and 5 women) participated in the study. All volunteers signed an informed consent form, and the research protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Medical School, University of São Paulo.

Fifty-two experiments were performed in duplicate (104 experiments) in order to test two different extraction methods, as described below. Eight of these 104 experiments were performed on computer keyboards, 48 on knife handles and 48 on exterior door handles of cars or cars steering wheels, as described below.

Experiments with computer keyboards were conducted with 4 individuals on 2 different keyboards. Each keyboard had an owner who used it daily (first donor). One of the other participants (a man or a woman/second donors) manipulated the item after use by the owner, for 5 min, simulating a cybercrime (Fig. 1a).

Experiments with knives were conducted with 3 different types of handles: plastic, wood and steel. Four individuals (first donor) simulated the habitual use of these objects by the owners, manipulating each one for 10 min, following by the other 2 participants (a man and a woman/second donors) who manipulated each of these objects for 1 min, simulating a cold weapon crime (Fig. 1b). So, 16 experiments were conducted on wood handles, 16 on steel handles and 16 on plastic handles.

Experiments with cars were conducted with 6 participants and 4 cars, each one with a different owner who used it daily (first donor). The other participants (a man and a woman/second donors) manipulated exterior door handles and steering wheels of cars for 1 min, simulating a theft (Fig. 1c). Experiments on exterior door handles were performed in different environmental conditions: sunny/hot days and rainy/cold days. So, 16 experiments were conducted on steering wheels, 16 on exterior door handles during sunny days and 16 on exterior door handles during rainy days.

In order to simulate real crime situations, participants performed their daily activities normally and a method for controlling secondary transfer of unknown individuals was not applied. Each experiment described above was conducted in different days with only 2 participants and the objects were sterilized before each test with 70% alcohol. Both sides of the knife handles were exposed to UV light for 30 min before each experiment.

2.2. Collection, extraction, quantification and amplification of DNA

Biological material deposited on each tested surface was collected by the double swab method [41] 5 min after deposition;

Table 1

Average of quantification values obtained from computer keyboards, knife handles and steering wheels and door handles of cars for both extraction methods, considering the number of samples with positive quantification results for each substrate.

Computer Keyboards						
Average (ng/ μ l) – (Number of samples with quantification results)						
	DNA IQ		CASEWORK			
Large	0.00083 (4)		0.00018 (2)			
Small	0.0029 (3)		0.0085 (3)			
Knife handles						
Wood	Steel			Plastic		
Average (ng/ μ l) – Number of samples with quantification results			Average (ng/ μ l) – Number of samples with quantification results		Average (ng/ μ l) – Number of samples with quantification results	
	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK
Large	0.00036 (4)	0.0001 (7)	0.00043 (2)	0.00011 (5)	0.0007 (4)	0.0001 (7)
Small	UDT* (0)	0.00109 (1)	0.00327 (1)	0.0013 (3)	0.0016 (1)	0.0014 (2)
Cars						
Steering Wheels		Door handles (sun)		Door handles (rain)		
Average (ng/ μ l) – Number of samples with quantification results		Average (ng/ μ l) – Number of samples with quantification results		Average (ng/ μ l) – Number of samples with quantification results		
	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK	DNA IQ	CASEWORK
Large	0.0061 (8)	0.0016 (8)	0.0023 (5)	0.0011 (7)	0.0028 (4)	0.0014 (8)
Small	0.0094 (5)	0.0062 (8)	0.009 (3)	0.015 (4)	0.0098 (2)	0.0063 (6)

UDT- Undetermined.

* All results were undetermined for *small* targets in wood samples extracted by DNA IQ.

decontamination of surfaces was done immediately after each experiment collection. In order to test and compare two different methodologies of extraction, DNA IQ (Promega Corporation) and Casework (Promega Corporation), all the experiments were done in duplicate. So, half of the experiments obtained from a surface were extracted by one method and the remaining was extracted by the other. Both kits were used according manufacturer's protocols, respectively. After the extraction, all samples were quantified with Quantifiler Trio™ (Applied Biosystems) and amplified with PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation), according manufacturer's protocol, respectively. A positive (2800 M DNA template) and a negative control samples were also amplified to monitor amplification success and a potential reagent contamination.

For amplification reaction, 5 μ l of PowerPlex Fusion Master Mix and 5 μ l of PowerPlex Fusion Primer Mix were used for each sample. Input trace DNA volume was set to 5 or 15 μ l in a final reaction volume of 15 or 25 μ l, respectively. Samples with a quantification value \geq 0.02 ng/ μ l for large targets, an input of 5 μ l was added. For the other samples, an input of 15 μ l was added. Parameters of cycling were adjusted for 31 cycles, according to Promega Corporation support. The amplified products were injected for capillary electrophoresis on the automatic sequencer ABI3130 (Applied Biosystems) and were analyzed by the GeneMapper ID software, version 3.2. Injection time was adjusted according to Promega Corporation support (from 5 to 10 s). Only peaks above 50 RFU were interpreted and stochastic threshold was set to 150 RFU.

2.3. Reference samples

Using the FTA card (Whatman*), blood samples were collected from all participants in order to generate references STR profiles that were used to compare with the mixtures profiles obtained from the experiments. DNA extraction was performed according manufacturer's

protocols, using the purification FTA reagent capable of washing away PCR inhibitors. Amplification and analysis were performed by the same methods used on the mixture samples, but 26 cycles were applied for amplification.

2.4. Data analysis

Because allelic composition of each individual that comprises the mixture was known, the total number of STR markers with allelic correspondence between the observed and the expected profile was counted and represented by percentage. The utility of these profiles was evaluated according to the Operational Procedures Manual of National DNA Index System (NDIS) [42], which established that at least 8 STR markers present in the original CODIS Core Loci are necessary to consider a STR profile useful to an investigation.

Statistical analysis was performed in three steps. First a Kruskal-Wallis test was performed to check if the kits behaved differently for different surfaces. A significance level of 0.05 was considered. The second step was to test the kits against one another for each surface. For that 7 Wilcoxon Rank Sum tests were performed with significance level of 0.007 each (0.05 \div 7). In the third step the kits were compared by a Chi-Squared test to check if they are different in terms of producing useful profiles for databases.

3. Results

3.1. Quantification of samples

Samples were quantified by Quantifiler Trio (Applied Biosystems) and the quantity of *large* (> 200 bases) and *small* (> 80 and < 200 bases) targets were measured for each sample. The average of values obtained from quantification was calculated for each substrate and each extraction method, considering the number of samples that resulted in a

Table 2

Samples with undetermined values for *Small* and *Large* targets and correlation with positive and negative profiles, as well as with the extraction kit used.

	Number of samples with UDT for <i>Small</i> and <i>Large</i>	Without STR profile		With STR profile	
		DNA IQ	Casework	DNA IQ	Casework
Keyboard	1	0	0	0	1
Wood	5	2	0	2	1
Steel	6	4	0	1	1
Plastic	5	2	0	2	1
Door handles (sun)	4	2	1	1	0
Door handles (rain)	4	2	0	2	0

UDT- Undetermined.

positive value of quantification (Table 1).

Samples with undetermined quantification values weren't included in the average shown on Table 1 but are described with more details on Table 2. The raw data obtained from quantification for each sample are available on Supplementary Table 1.

3.2. Correlation between quantification and STR profiles results

From 104 samples collected, it was possible to generate 83 STR profiles (79.8%), being 32 (61.5%) out of 52 from the DNA IQ samples and 51 (98.1%) out of 52 from the Casework samples. The remaining 21 samples (20.2%) did not produce any profile (1 from computer keyboard, 14 from knife handles and 6 from exterior door handles of cars). Only 1 of these 21 samples was extracted with Casework, whereas the other 20 were extracted with DNA IQ (Table 3). All samples collected from steering wheels generated STR profiles. Samples with positive quantification but negative STR profile were observed (Table 4).

3.3. Analysis of STR profiles

Known reference profiles were used to determine the number of expected alleles from each donator (see supplementary Table 2). The number of expected alleles observed was higher for each donator in samples extracted with Casework for all surfaces tested. Fig. 2 shows the average percentage of expected alleles recovered from each donator for the DNA IQ samples and Fig. 3 shows the same data for the Casework samples.

For the DNA IQ samples, on computer keyboards the average percentage of expected alleles recovered from first and second donators were 29.1% and 18.4%, respectively. For the same analysis, wood knife handles obtained 11.7% and 14.5%, plastic knife handles 9.6% and 10.9%, and steel knife handles 21.7% and 26.2%, respectively. Steering wheels obtained 60.4% and 38.1% of the average percentage of expected alleles recovered from first and second donators, while exterior door handles of cars during sunny days obtained 30.4% and 29.8%, respectively. Door handles of cars during rainy days resulted in

Table 3

Results obtained from failed experiments.

Surface Type	Total number of experiments	Number of failed experiments	
		DNA IQ	Casework
Keyboard	8	1	0
Steel	16	7	0
Plastic	16	4	0
Wood	16	3	0
Door handles (sun)	16	2	1
Door handles (rain)	16	3	0

Table 4

Samples with positive quantification but negative results for STR profile.

Surface	Number of samples with positive quantification, but without STR profile	
	DNA IQ	Casework
Keyboard	1	0
Wood	1	0
Steel	3	0
Plastic	2	0
Door handles (rain)	1	0

averages of 22.7% and 16.1%, respectively.

For the Casework samples, on computer keyboards the average percentage of expected alleles recovered from first and second donators were 55.6% and 33.2%, respectively. For the same analysis, wood knife handles obtained 22.5% and 23.9%, plastic knife handles 21% and 24.3%, and steel knife handles 22.4% and 17.9%, respectively. Steering wheels obtained 88.7% and 59.9% of the average percentage of expected alleles recovered from first and second donators, while door handles of cars during sunny days obtained 40.8% and 38.8%. Door handles of cars during rainy days resulted in averages of 45.3% and 48.6%, respectively.

According to the Operational Procedures Manual of National DNA Index System (NDIS) [42], a minimum of 8 STR original CODIS Core Loci (original CODIS was composed of 13 STR) are required for a profile to be submitted to NDIS. So, out of the 83 profiles obtained only those with at least 8 STR markers from the second donator in the mixture (presenting partial or full genotypes) were considered. Thirty-one of the 83 STR profiles (37.3%) would be useful for this purpose, being 24 (77.4%) from the Casework samples and 7 (22.6%) from the DNA IQ samples. Fig. 4 shows the results obtained from the Casework and DNA IQ samples for each surface used.

Since 2017, 7 new markers have been included to the CODIS core, for a total of 20 STR markers. So, we did another evaluation considering at least 8 STR markers corresponding to the second donator in the mixture for any of these 20 STR (partial or full genotypes). Now, 42 of the 83 STR profiles (50.6%) would be useful, being 30 (71.4%) from the Casework samples and 12 (28.6%) from the DNA IQ samples. Fig. 5 shows the results obtained from the Casework and DNA IQ samples for each substrate used.

Fig. 6 summarizes the results of the experiments performed with each extraction methods. For each experiment, the number of profiles generated and the ultimate number of useful profiles, considering the minimum number of STR makers required for CODIS, are provided. The number of STR markers with allelic correspondence to second donators for each experiment can be found in Supplementary Table 3.

3.4. Statistical analysis

When considering the total number of STR markers obtained for the secondary donator, the Kruskal-Wallis test demonstrates that surface type significantly affects recovery when using either extraction method ($p = 0.005$ for DNA IQ and $p = 0.002$ for Casework). Yet, a look at the box plot in Fig. 7 shows that the surface affects the kits performance in a similar way, suggesting that Casework performs slightly better in general.

To understand how differently each kit performs with respect to the total number of markers obtained for the secondary donator on each surface, 7 Wilcoxon Rank Sum tests were made with significance level of 0.007 each ($0.05 \div 7$). The results show that Casework performs better than DNA IQ on plastic ($p = 0.004$), steel handles knives ($p = 0.007$) and on the door handles in rainy days ($p = 0.006$). For the other surfaces, the p values were not small enough to suggest differences.

Finally, a Chi-Squared test showed that Casework produced

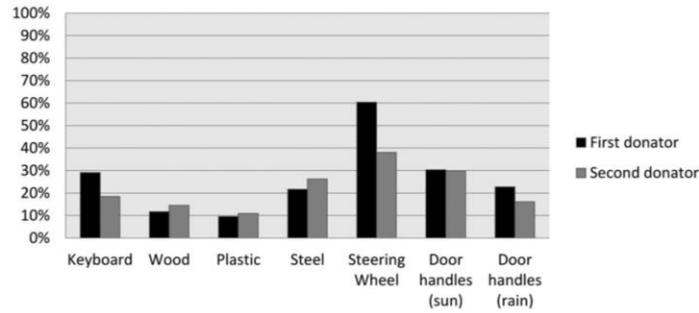


Fig. 2. Average percentage of expected alleles recovered from first and second donors for each substrate on the DNA IQ samples. Data from steel handle knife are not averages, but single data point, because only 1/8 sample resulted in a STR profile.

significantly more useful profiles than DNA IQ (p -value = 0.001), based on NDIS analysis.

4. Discussion

4.1. Efficiency of extraction methods

In this study we aimed to verify and compare the efficiency of the DNA IQ System and the Casework Direct Kit for processing touch DNA samples obtained from fingerprints deposited on different surfaces, simulating real crime situations.

Our results showed that Casework is better to recover the DNA, since only 1 sample performed with this method failed, while for 20 samples extracted with DNA IQ was not possible to obtain a STR profile, as observed in Table 3. Apparently, Casework increases the chance of generating DNA profiles, even if the surface does not contain the optimal properties for this type of analysis, as hard, polished and low porosity, as the steel knife handle [32].

The higher efficiency demonstrated by Casework could be explained by the difference established for the protocol of these two methods of extraction. The DNA IQ System was developed to be used in many kinds of forensic samples and this method is based on successive washes of a paramagnetic resin to capture a consistent amount of DNA [36]. After the magnetic particles capture the DNA, they can be washed multiple times to purify the DNA, making it safe for the subsequent amplification process [4]. Compared to the conventional organic extraction method, the DNA IQ process offers similar reproducibility but with a higher purity [36]. For touch DNA samples, DNA IQ yielded extracts with a higher success rate for the subsequent DNA typing analysis, when compared to Chelex[®]100 [37].

When comparing Casework with the Maxwell 16 System DNA IQ Casework Pro Kit, an automated DNA IQ magnetic resin-based

extraction method, Hakim et al. [40] concluded that both are similar in their capacity to extract DNA but the latter produces STR profiles with better quality and more alleles called.

Interestingly, our results showed the opposite, samples extracted with Casework resulted in better STR profiles when compared to samples extracted with DNA IQ. A comparison between Figs. 2 and 3 shows how the Casework STR profiles were better to identify both contributors in the mixture, since the number of alleles recovered with this kit was much higher than those samples extracted with DNA IQ. For example, with Casework extraction, samples collected from steering wheels yielded an average of 88.7% and 59.9% of expected alleles from first and second donors, respectively, while the DNA IQ samples obtained 60.4% and 38.1%, respectively. Only the steel knife handle was an exception for this analysis. In this case, DNA IQ presented 26.2% of the expected alleles from second donors against an average of 17.9% from the Casework samples. However, it is important to emphasize that the value obtained for DNA IQ is representative of only a single sample, while all samples extracted with Casework generated STR profiles. So, the calculation of the averages may have been impaired.

Studies reported that in DNA IQ, from one wash to another, a portion of the genetic material can be lost, because not all the DNA binds to the resin [4,39]. Considering that Touch DNA samples already have low DNA quantity in their composition [1], as it was observed by the quantification results, any loss due to a wash could explain the inability to obtain a useful STR profile or any STR profile at all. On the other hand, Casework contains a buffer and a reducing agent capable of producing a DNA lysate from casework samples in approximately 35 min, without any wash step. So, this method is based on the use of a solution for membrane lysis and was developed to minimize the loss of DNA [39]. This could explain why samples extracted with this method showed more positive and better results when compared with DNA IQ.

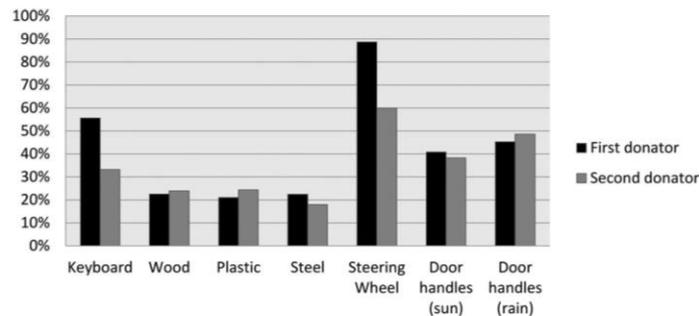


Fig. 3. Average percentage of expected alleles recovered from first and second donors for each substrate on the Casework samples.

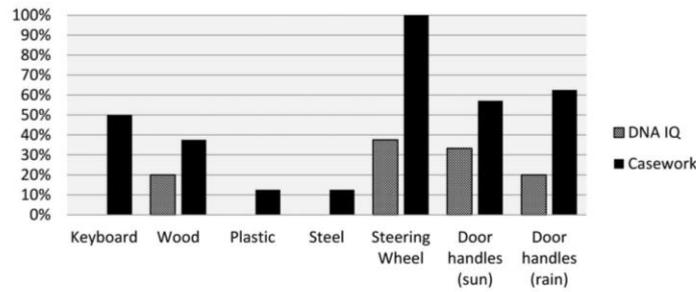


Fig. 4. Percentage of profiles with at least 8 STR markers from 13 original CODIS loci corresponding to second donators for each substrate, considering both extraction methods.

4.2. Features of the surfaces

Differences observed in the quality of profiles obtained from the different objects used in our study could be explained by the fact that features of the surface such as its composition, chemistry or porosity level, can influence the transfer, persistence and recovery of the trace deposited [33]. It is already known that porous surfaces retain more cells than non-porous surfaces which have greater adhesion capacity [2,7]. Results obtained from Kruskal-Wallis test analysis agree with this, demonstrating that the surface type significantly affects recovery when using either extraction method. Both kits perform differently depending on the surface ($p = 0.005$ for DNA IQ and $p = 0.002$ for Casework), but the Casework samples were better in general (Fig. 7). For example, on computer keyboards no samples extracted with DNA IQ were useful for National DNA Index System insertion (at least 8/13 STR CODIS analysis), while 50% of profiles obtained from the Casework samples could be inserted in the system (Fig. 4). This new extraction kit could be, therefore, a more efficient method to help solve a crime for any of those surfaces tested, as suggested by Chi-Square test that showed a significant difference between both kits to obtain a useful profile ($p = 0.001$).

Surprisingly, even for exterior door handles of cars under the rain, this method was a good alternative for extraction, since 62.5% of the profiles would be useful for forensic purposes, despite the knowledge that environmental factors, such as high exposure to light, high temperature or moisture can degrade DNA and impair its analysis [17,18,29,31]. Regardless of the presence of rain water in our samples, collected together with the genetic material exposed for 5 min at that weather, results were better than expected. However, Wilcoxon Rank Sum tests showed that Casework was significantly better only on plastic ($p = 0.004$), steel handles knives ($p = 0.007$) and on the exterior door handles in rainy days ($p = 0.006$). This result could be explained by the

small size of the sampling for each category of surface.

As observed, steering wheels were the best surface to recover DNA and generate genetic profiles. When these samples were extracted by Casework, 100% of the profiles obtained had at least 8 STR markers corresponding to second donators for both analyses, considering 8/13 or 8/20 markers, while samples extracted by DNA IQ showed 37.5% or 62.5% of their STR profiles useful, respectively (Figs. 4 and 5). This data is in accordance with the Kirgiz and Calloway [43] study, which concluded that steering wheel is a powerful tool to solve crimes, since the surface retains biological traces even when it is manipulated during a short period of time. As expected, based on the porosity, all knife handles showed worse results for both extraction methods, but wood had better results than steel and plastic given both analyses demonstrated on Figs. 4 and 5. Compared to the other knife handles, wood showed the higher percentage (62.5%) of profiles with at least 8/20 STR markers present in CODIS when extracted by Casework. This is consistent with Fonnelop et al. [32] findings, that related that transfer of DNA seems to occur easier to wood than plastic or steel.

4.3. Quantification results

Compared with STR profiles obtained, quantification showed contradictory results, since the average of values for *Large* marker was always higher for DNA IQ, suggesting that samples performed with this extraction method should have longer fragments of DNA than those extracted with Casework, and therefore, should obtain better profiles (Table 1). However, as we already discussed above, STR profiles showed the opposite results, since profiles generated from the Casework samples were better than those provided by the DNA IQ samples.

Probably samples extracted with Casework are not effectively quantified by Quantifiler Trio, as suggested by Silva et al. [44], who demonstrated that Casework contains more inhibitors for this reaction

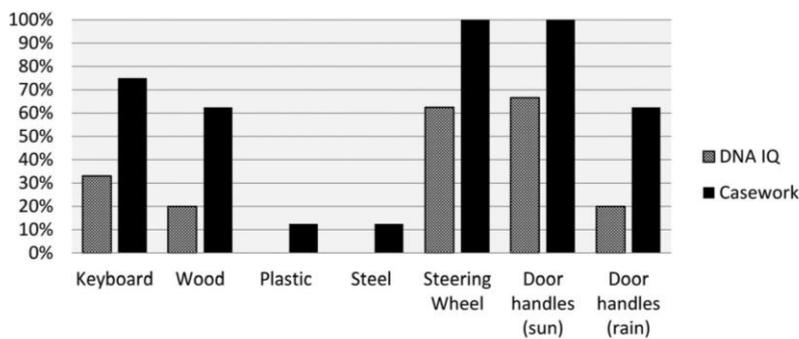


Fig. 5. Percentage of profiles with at least 8 STR markers from 20 current CODIS loci corresponding to second donators for each substrate, considering both extraction methods.

Number of experiments for each extraction method	Number of experiments that generated STR profile	Profiles with at least 8/13 original STR CODIS	Profiles with at least 8/20 current STR CODIS
Keyboard (8)	4 DNA IQ (3 (75%))	0 (0%)	1 (33.3%)
	4 CW (4 (100%))	2 (50%)	3 (75%)
Wood (16)	8 DNA IQ (5 (62.5%))	1 (20%)	1 (20%)
	8 CW (8 (100%))	3 (37.5%)	5 (62.5%)
Steel (16)	8 DNA IQ (1 (12.5%))	0 (0%)	0 (0%)
	8 CW (8 (100%))	1 (12.5%)	1 (12.5%)
Plastic (16)	8 DNA IQ (4 (50%))	0 (0%)	0 (0%)
	8 CW (8 (100%))	1 (12.5%)	1 (12.5%)
Steering Wheel (16)	8 DNA IQ (8 (100%))	3 (37.5%)	5 (62.5%)
	8 CW (8 (100%))	8 (100%)	8 (100%)
Door handle (sun) (16)	8 DNA IQ (6 (75%))	2 (33.3%)	4 (66.6%)
	8 CW (7 (87.5%))	4 (57.1%)	7 (100%)
Door handle (rain) (16)	8 DNA IQ (5 (62.5%))	1 (20%)	1 (20%)
	8 CW (8 (100%))	5 (62.5%)	5 (62.5%)

Fig. 6. Results obtained for second donators from each surface and extraction method used. CW – Casework Direct Kit

when compared with another quantification kit, the PowerQuant® System (Promega). One explanation could be the fact that this extraction method does not have a purification step, resulting in a large amounts of inhibitory compounds that could be in excess of dna [44]. Besides, it is important to highlight that quantification process is looking at ALU repeats. Considering that different types of DNA have different degradation rates, the assumption that quantification of DNA equates to success in generating a STR profile is not completely true when working with very low quantities of DNA, such as touch DNA samples.

It was observed that there were 12 samples (4 Casework and 8 DNA IQ) without positive quantification data but with STR profile (Table 2), and 8 samples with quantification data but without STR profile (all extracted by DNA IQ) (Table 4), which was not expected. Because of this, it was not possible to establish a pattern that relates the quantity of DNA necessary to produce a STR profile. The same was observed in a study by Samie et al. [45] that simulated stabbing with knives, and traces with the same concentration showed different quality of profiles. However, in that case, other kits were used for extraction, quantification and amplification. Likewise, using Quantifiler®, Cupples et al. [46] concluded that a minimum threshold value above which it is possible to obtain a STR profiles doesn't seem to exist. This could be explained by stochastic effects that impair quantification of samples with a low quantity of DNA, generating an inaccuracy of this step. So, results with a very low amounts of template cannot be taken as an absolute measurement [3].

5. Conclusion

This study provides insights about the effect of different surfaces and extraction methods on recovery and generation of STR profiles using PowerPlex Fusion System to amplify touch DNA samples. Limitations on the quantification step for these samples with a low quantity of DNA were also highlighted.

Although the possibility of generating STR profiles from DNA deposited on computer keyboards, knife handles or steering wheels and door handles of cars could be demonstrated, in many cases the profiles generated would not be useful to identify the person of interest, especially those provided by non-porous surfaces, like steel handle knives, because of the insufficient number of STR markers amplified. However, despite the challenging nature of touch DNA samples, the collection of DNA shouldn't be disregarded in any criminal situation, because new methods are being developed to help solve such problems. Besides, Casework seems to be more promising for touch DNA analysis, showing a higher number of alleles from both donators in the mixtures for almost all the surfaces, enhancing the chance of identifying an individual.

A correlation between DNA concentrations and the quality of DNA profiles was not established, probably due an incompatibility of Casework and Quantifiler Trio. More studies are necessary to compare quantification kits using samples extracted with Casework to understand better this contradictory result.

Even with no possibility of quantification, and considering those profiles that could be useful for all analyzed surfaces, Casework showed better efficiency for processing touch DNA samples, enhancing the

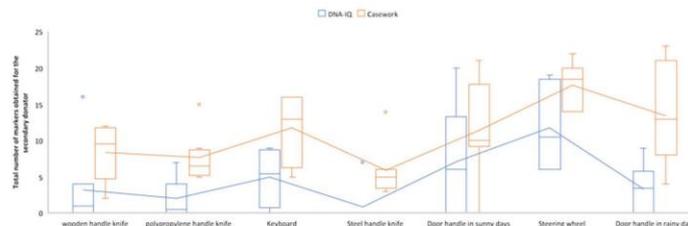


Fig. 7. Boxplot showing the results for both kits.

chance of recovering deposited DNA, and improving STR profile quality when compared with DNA IQ. Only 1 experiment extracted by Casework failed, and most profiles that could be useful for NDIS were obtained with this extraction method.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-16/14355-3,17/06484-0,19/09622-0), LIM 40/HCFMUSP and Promega Corporation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102307>.

References

- [1] P. Gill, J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, J. Buckleton, An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Sci. Int.* 112 (1) (2000) 17–40.
- [2] R.A. Wickenheiser, Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact, *Journal of Forensic Science*. 47 (3) (2002) 442–450.
- [3] R.A.H. van Oorschot, K.N. Ballantyne, R.J. Mitchell, Forensic trace DNA: a review, *Investigation Genetics* 1 (1) (2010) 1–17.
- [4] J.M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2011.
- [5] M. Goray, R.J. Mitchell, R.A.H. van Oorschot, Investigation of secondary DNA transfer of skin cells under controlled test conditions, *Leg. Med. (Tokyo)* 12 (3) (2010) 117–120.
- [6] D.J. Daly, C. Murphy, S.D. McDermott, The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (1) (2012) 41–46.
- [7] T.J. Verdon, R.J. Mitchell, R.A.H. van Oorschot, The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (1) (2013) 167–175.
- [8] A.K. Buckingham, M.L. Harvey, R.A.H. van Oorschot, The origin of unknown source DNA from touched objects, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 25 (2016) 26–33.
- [9] T. Ruan, M. Barash, P. Gunn, D. Bruce, Investigation of DNA transfer onto clothing during regular daily activities, *Int. J. Legal Med.* 132 (4) (2018) 1035–1042.
- [10] A. Lowe, C. Murray, J. Whitaker, G. Tully, P. Gill, The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces, *Forensic Sci. Int.* 129 (1) (2002) 25–34.
- [11] M. Phipps, S. Petricevic, The tendency of individuals to transfer DNA to handled items, *Forensic Sci. Int.* 168 (2–3) (2007).
- [12] R.K. Farnen, R. Jagho, P. Cortez, E.S. Frøyland, Assessment of individual shedder status and implication for secondary DNA transfer, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 1 (1) (2008) 415–417.
- [13] T. Kamphausen, D. Schadendorf, N. von Wurmb-Schwark, T. Bajanowski, M. Poetsch, Good shedder or bad shedder—the influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions, *Int. J. Legal Med.* 126 (1) (2012) 179–183.
- [14] A.A. Oleiwi, M.R. Morris, W.M. Schmerer, R. Sutton, The relative DNA-shedding propensity of the palm and finger surfaces, *Sci. Justice* 55 (5) (2015) 329–334.
- [15] M. Goray, S. Fowler, B. Szkuta, R.A.H. van Oorschot, Shedder status - an analysis of self and non-self DNA in multiple handprints deposited by the same individual over time, *Forensic Sci. Int. Genet.* 23 (2016) 190–196.
- [16] A.E. Fonnelløp, M. Ramse, T. Egeland, P. Gill, The implications of shedder status and background DNA on direct and secondary transfer in an attack scenario, *Forensic Sci. Int. Genet.* 29 (2017) 48–60.
- [17] J.J. Raymond, R.A.H. van Oorschot, P.R. Gunn, S.J. Walsh, C. Roux, Trace evidence characteristics of DNA: a preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (1) (2009) 26–33.
- [18] G. Meakin, A. Jamieson, DNA transfer: review and implications for casework, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (4) (2013) 434–443.
- [19] B. Kokshoorn, L.H.J. Aarts, R. Ansell, E. Connolly, W. Drotz, A.D. Kloosterman, L.G. McKenna, B. Szkuta, R.A.H. van Oorschot, Sharing data on DNA transfer, persistence, prevalence and recovery: arguments for harmonization and standardization, *Forensic Sci. Int. Genet.* 37 (2018) 260–269.
- [20] M. Poetsch, M. Pfeifer, H. Konrad, T. Bajanowski, J. Helmus, Impact of several wearers on the persistence of DNA on clothes - a study with experimental scenario, *Int. J. Legal Med.* 132 (1) (2018) 117–123.
- [21] S. Noël, K. Lagace, A. Rogic, D. Granger, S. Bourgoin, C. Jolicoeur, D. Séguin, DN transfer during laundering may yield complete genetic profiles, *Forensic Sci. Int. Genet.* 23 (2016) 240–247.
- [22] S.H.A. Tobias, G.S. Jacques, R.M. Morgan, G.E. Meakin, The effect of pressure on DNA deposition by touch, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 6 (2017) e12–e14.
- [23] M. van den Berge, L. van de Merwe, T. Sijen, DNA transfer and cell type inference assist activity level reporting: post-activity background samples as a control in dragging scenario, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 6 (2017) e591–e592.
- [24] N. Rudin, K. Inman, The collection and preservation of physical evidence, in: N. Rudin, K. Inman (Eds.), *An Introduction to Forensic DNA Analysis*, CRC Press Boca Raton, Florida, 2001, pp. 13–17.
- [25] S. Baechler, Study of criteria influencing the success rate of DNA swabs in operational conditions: a contribution to an evidence-based approach to crime scene investigation and triage, *Forensic Sci. Int. Genet.* 20 (2016) 130–139.
- [26] A.A. Mapes, A.D. Kloosterman, V. van Marion, C.J. de Poot, Knowledge on DNA success rates to optimize the DNA analysis process: from crime scene to laboratory, *Journal of Forensic Science* 61 (4) (2016) 1055–1061.
- [27] B. Szkuta, R.A.H. van Oorschot, K.N. Ballantyne, DNA decontamination of finger print brushes, *Forensic Sci. Int.* 277 (2017) 41–50.
- [28] H.C. Lee, C. Ladd, Preservation and collection of biological evidence, *Croat. Med.* 42 (3) (2001) 225–228.
- [29] K. Bender, M.J. Farfán, P.M. Schneider, Preparation of degraded human DNA and controlled conditions, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 135–140.
- [30] M. Goray, E. Eken, R.J. Mitchell, R.A.H. van Oorschot, Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2009) 62–67.
- [31] R.A.H. van Oorschot, R. McArdle, W.H. Goodwin, K.N. Ballantyne, DNA transfer the role of temperature and drying time, *Leg. Med. (Tokyo)* 16 (3) (2014) 161–166.
- [32] A.E. Fonnelløp, H. Johannessen, T. Egeland, P. Gill, Contamination during crimin investigation: detecting police contamination and secondary DNA transfer from evidence bags, *Forensic Sci. Int. Genet.* 23 (2016) 121–129.
- [33] R.A.H. van Oorschot, B. Szkuta, G.E. Meakin, B. Kokshoorn, M. Goray, DNA transfer in forensic science: a review, *Forensic Sci. Int. Genet.* 38 (2019) 140–166.
- [34] M.K. Balogh, J. Burger, K. Bender, P.M. Schneider, K.W. Alt, Fingerprints from fingerprints, *Int. Congr. Ser.* 1239 (2003) 953–957.
- [35] J. Tang, J. Ostrander, R. Wickenheiser, A. Hall, The use of laboratory-created crime fingerprints to quantify DNA loss, *Forensic Science International: Synergy* (2019) 1–16.
- [36] DNA IQ™ System Database Protocol, Promega Corporation, <https://www.promega.com.br/products/genetic-identity/genetic-identity-workflow/dna-isolation/dna-iq-system/?catNum=DC6701>. (Accessed 15 August 2019).
- [37] C.J. Fregeau, C.M. Lett, R.M. Fourney, Validation of a DNA IQ-based extraction method for TECAN robotic liquid handling workstations for processing casework, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (5) (2010) 292–304.
- [38] S.C. Ip, S.W. Lin, K.M. Lai, An evaluation of the performance of five extraction methods: chelex® 100, QIAamp® DNA blood mini kit, QIAamp® DNA investigator kit, QIASymphony® DNA investigator® kit and DNA IQ™, *Sci. Justice* 55 (3) (2015) 200–208.
- [39] E.K. Graham, M. Loten, J. Thompson, et al., Validation of the Casework Direct Kit Custom: A Method for the Rapid Processing of Casework Samples, (2018) (Accessed 15 August 2019), <https://www.promega.com/-/media/files/resources/white-papers/wp108.pdf>.
- [40] H.M. Hakim, H.O. Khan, S.A. Ismail, et al., Assessment of autosomal and male DN extracted from casework samples using Casework Direct Kit, Custom and Maxwe 16 System DNA IQ Casework Pro Kit for autosomal-STR and Y-STR profiling, *Science Reports* 9 (14558) (2019) 1–8.
- [41] D. Sweet, M. Lorente, J.A. Lorente, A. Valenzuela, E. Villanueva, An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique, *Journal of Forensic Science* 42 (2) (1997) 320–322.
- [42] National DNA Index System (NDIS) Operational Procedures Manual, FBI Laboratory, <https://www.fbi.gov/file-repository/ndis-operational-procedures-manual.pdf/view>. 2019 (Accessed 15 August 2019).
- [43] I.A. Kirgiz, C. Calloway, Increased recovery of touch DNA evidence using FTA pap compared to conventional collection methods, *J. Forensic Leg. Med.* 47 (2017) 9–15.
- [44] J.P. Silva, Avaliação da utilização do reagente Casework Direct na Análise Genética de Rotina de amostras Forenses, Master Degree's thesis (2018) (Accessed 15 August 2019), <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/25563>.
- [45] L. Samie, T. Hicks, V. Castella, F. Taroni, Stabbing simulations and DNA transfer, *Forensic Sci. Int. Genet.* 22 (2016) 73–80.
- [46] C.M. Cupples, J.R. Champagne, K.E. Lewis, T.D. Cruz, STR profiles from DNA samples with "undetected" or low quantifier results, *Journal of Forensic Science* 54 (1) (2009) 103–107.