

MÁRIO JOÃO SEIXAS-SOARES

*Touch-DNA em armas de fogo:
Análise Genética em diferentes momentos
após o disparo realizado por duas
populações etnicamente diferentes*

**FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DO PORTO
SETEMBRO DE 2017**

Mário João Seixas-Soares

Porto, 2017



Dissertação elaborada para a obtenção de grau de Mestre no âmbito do
Mestrado em Ciências Forenses, pela Faculdade de Medicina da Universidade
do Porto

Orientação

Professora Doutora Laura Sofia Mendes Cainé
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (*FMUP*)
Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
(*INMLCF*)

Coorientação

Professor Doutor Agostinho José Carvalho dos Santos
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (*FMUP*)
Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
(*INMLCF*)

Mestre Benedita Abreu Ferreira da Silva
Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
(*INMLCF*)

Trabalho realizado no Serviço de Biologia e Genética Forenses da
Delegação do Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal e
Ciências Forenses, I.P.

Agradecimentos

Aos meus Orientadores, Doutora Laura Cainé, Mestre Benedita Silva e Doutor Agostinho Santos, o meu muito obrigado pela paciência, apoio, tempo, e por não terem desistido de mim.

Ao Mestre Luís Marques Fernandes, pelo tempo, espaço e bens materiais fornecidos, sem os quais nunca seria possível concluir esta dissertação.

À Doutora Margarida Fonseca Cardoso, pela valiosa ajuda na realização da análise estatística.

À Doutora Vanessa Bogas, sem a qual esta ideia não teria avançado.

Aos Voluntários, sem os quais este projeto demorado não veria a luz do dia.

Aos meus amigos.

E por fim, mas nunca por último, aos meus Pais. Porque sem eles eu não estaria onde estou, nem seria quem sou. **A vocês, dedico-vos esta tese.**

Obrigado.

Resumo

Ao manusear um objeto, um indivíduo pode depositar material genético no mesmo. Este, pode ser recolhido, analisado, e posteriormente usado como prova forense numa investigação criminal.

A este DNA, transferido para uma superfície quando ocorre um contacto, dá-se o nome de *touch-DNA* o qual, é já aceite como uma amostra capaz de fornecer um perfil genético onde mais nenhum fluido biológico é identificado. Este trabalho teve como objetivo analisar se duas populações distintas (negróides e caucasianos) diferem entre si na deposição de *touch-DNA* – quanto à qualidade e quantidade – analisando conjuntamente a persistência deste em diferentes intervalos de tempo: aquando do contacto (0 horas), e depois de 24 e 72 horas do manuseamento. Para tal, foram usadas armas *Glock*[®], realizando-se a colheita na zona lisa e rugosa das mesmas.

Os resultados obtidos demonstraram que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre a quantidade de DNA possível de ser analisada nos diferentes intervalos de tempo entre o manuseamento e a colheita. Constatou-se que até às 72 horas após a manipulação ainda é possível recolher DNA suficiente para identificar o perfil genético de quem manipulou a arma.

A qualidade dos perfis genéticos obtidos foi superior nos caucasianos em relação aos negróides. Todavia, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,184$) entre a quantidade de DNA depositada por estas duas populações. Existe, no entanto, uma tendência para o aumento da quantidade de DNA obtido nas amostras dos caucasianos.

Será cientificamente relevante a realização de novos estudos sobre esta temática com um maior número de indivíduos voluntários.

Abstract

When handling an object, an individual may deposit genetic material in it. Such can be swabbed, analyzed, and subsequently used as forensic evidence in a criminal investigation.

This DNA, transferred to a surface when a contact occurs, is called *touch*-DNA, and it is already accepted as a sample capable of providing a genetic profile where no further biological fluid is identified.

This study aimed to analyze whether two distinct populations (Negroid and Caucasians) differ in *touch*-DNA deposition – in terms of quality and quantity – by jointly analyzing the persistence of this in different time intervals: on contact (0 hours) and after 24 and 72 hours of handling. For this, *Glock*[®] guns were used. Samples were obtained from the smooth and rough area of the gun.

The results obtained showed that there are statistically significant differences ($p < 0.001$) between the amount of DNA that could be analyzed at different intervals between handling and collect of samples. We found that up to 72 hours after the gun manipulation it was possible to collect enough DNA to identify the genetic profile of those who handled the gun.

The quality of the genetic profiles obtained was higher in the Caucasians than in the Negroid group. However, there were no statistically significant differences ($p > 0.184$) found between the amount of DNA deposited by these two populations. There is, however, a tendency-growth in the quantity of DNA obtained in the Caucasians samples.

Thus, it will be scientifically relevant to carry out new studies on this subject with a larger number of volunteers.

Índice

Justificação do estudo e objetivos	18
Introdução	20
<i>Touch</i> -DNA – Conceito	21
Fatores influenciadores	22
Transferência Secundária	25
Persistência do <i>touch</i> -DNA	27
Diferenças Étnicas	28
Armas de fogo	29
Materiais e Métodos	32
Simulação do disparo	34
A arma e os ensaios experimentais	34
Procedimentos prévios aos ensaios experimentais	34
Ensaio experimentais	35
Colheitas para DNA	36
Zaragatoas de controlo	37
Extração	37
Extração das Amostras de Referência	38
Extração das Amostras Problema	38
Quantificação	39
Amplificação	40
Análise de Fragmentos	41
Resultados	43
Discussão	50
Conclusões	56
Referências Bibliográficas	58

Índice de Figuras

- Figura 1** Arma Glock®, desprovida de carregador de munição e corredeira 34
- Figura 2** Arma usada por um dos voluntários, armazenada, na qual será efetuada a colheita 24 horas após a simulação do disparo. 35
- Figura 3** Zonas lisas e rugosas de uma das armas Glock® usados no estudo 36
- Figura 4** Zonas lisas e rugosas de uma das pistolas Glock® usadas no estudo 36
- Figura 5** Arma usada por um dos voluntários, armazenada, na qual será efetuada a colheita 24 horas após a simulação do disparo. 37

Índice de Tabelas

Tabela 1 Condições do programa de PCR realizado.	41
Tabela 2 Limiar de amplitude dos picos. À esquerda encontram-se os limiares estabelecidos pelo SGBF-N INMLCF, I.P.. À direita, aqueles utilizados neste estudo.	42
Tabela 3 Concentração de DNA (ng/μL). Valores obtidos por RT-PCR.	44
Tabela 4 Comparação das misturas com o perfil do proprietário.	49

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Médias da concentração de DNA obtidas.	45
Gráfico 2 Qualidade dos perfis obtidos (24h) (%).	46
Gráfico 3 Qualidade dos perfis obtidos (0h) (%).	46
Gráfico 4 Qualidade dos perfis obtidos (72h) (%).	47
Gráfico 5 Marcadores amplificados das amostras problema correspondentes ao perfil genético do indivíduo.	48

Justificação do estudo e objetivos

Segundo a Teoria de Locard [1], sempre que um indivíduo entra em contacto com um objeto, deposita células epiteliais na superfície do mesmo, libertando DNA, este tem a denominação de *touch-DNA*.

Dado o reduzido número de trabalhos publicados sobre o tema em análise, entendemos que será importante e necessário adquirir um conhecimento mais vasto sobre o *touch-DNA*, para que este se torne num meio de prova forense mais robusto.

O estudo aqui apresentado teve como objetivos:

- I. Estudar se duas populações etnicamente diferentes – caucasianos e negróides – diferem entre si na deposição de DNA aquando do contacto com uma superfície;
- II. Analisar a persistência do *touch-DNA* em armas de fogo, no momento em que são manuseadas, e após intervalos de 24 e 72 horas.

Introdução

Num universo onde o conhecimento científico da Genética Forense se modifica de modo constante, aumenta também o número de novas técnicas que permitem recolher e analisar amostras com interesse forense.

Em 1980 a amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), descrita por Kary Mullis, permitiu a amplificação de quantidades exíguas de DNA. Cinco anos depois, Jeffreys *et al.* [2] revelou a existência de repetições sequenciais no DNA entre 10 e 100 *pb*, denominadas como *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR). Estes minissatélites, possíveis de ser observados através do método RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram, na área da Genética Forense, substituídos pelos microssatélites *STR* (*Short Tandem Repeats*). O tamanho reduzido destes (entre 2 e 7 *pb*), juntamente com a alta taxa de mutação faz com que estes marcadores sejam um método de eleição na distinção genética entre indivíduos [3].

Desta forma, tornou-se possível analisar e estudar quantidades exíguas de DNA com resultados satisfatórios, com *kits* desenvolvidos para analisar os STR. Atualmente é possível obter perfis genéticos de amostras com quantidades tão exíguas como 50 *pg* de DNA [4], tornando a análise de STR num procedimento frequente.

Touch-DNA – Conceito

Foi em 1997, que o estudo de van Oorschot and Jones [5] comprovou, pela primeira vez, ser possível recolher e analisar material genético proveniente do contacto estabelecido entre um indivíduo e uma superfície. Ao entrar em contacto com uma superfície, um indivíduo poderá deixar material genético que pode ser recolhido e analisado, podendo ser, posteriormente, usado como prova forense. A este DNA transferido para uma superfície de

contacto dá-se o nome de *touch*-DNA, ou *trace* DNA. A análise deste DNA é atualmente aceite como uma amostra capaz de fornecer um perfil genético, nos casos em que nenhum fluido biológico foi possível de ser identificado.

O mecanismo de transferência de DNA das mãos de um indivíduo para um objeto não está, ainda, totalmente entendido, e é um assunto que tem gerado discussão.

O estudo de Wickenheiser, apresentado em 2002 [6], defende que as células da epiderme são nucleadas, enquanto que outro estudo [7], publicado em 2014, mostra que diferentes interações entre os diversos tipos celulares presentes na derme – melanócitos, queratinócitos e fibroblastos - causam a deslocação de queratina, juntamente com melanina, para a epiderme, tornando estas células anucleadas. Todavia, Wickenheiser [6] defende que a origem do DNA nas mãos pode ser também explicada pelo facto destas funcionarem como “vetores” de outras zonas corporais que constituem fontes de fornecimento de DNA, nomeadamente a cavidade oral.

Assim sendo, a origem do *touch*-DNA de um indivíduo não deve ser tida em conta com uma única origem, podendo ter origem noutras áreas corporais, que não só a pele.

Fatores influenciadores

Wickenheiser [6] defende no seu estudo que a quantidade de DNA transferido para um determinado objeto é independente do tempo de manuseamento deste. No entanto, noutros estudos, observou-se que essa transferência é dependente do indivíduo que o usa e do material de que é feito o objeto [8-12].

Objetos porosos, como a madeira, aderem células libertadas pela pele com mais facilidade do que objetos não porosos, como o vidro, tal como defende um estudo realizado em 2012 [12].

Daly *et al.* [12] estudou três superfícies diferentes entre si: madeira, tecido e vidro. Usou 300 amostras, 100 por cada tipo de material estudado, e não possuindo informação prévia sobre os perfis genéticos, de modo a mimetizar possíveis situações observadas e/ou ocorridas em laboratório nas quais os investigadores podem não ter acesso a essa mesma informação. Assim, provou que das 3 superfícies estudadas, aquela onde foi mais fácil obter perfis genéticos, foi a madeira - talvez por ser um material poroso - demonstrando assim que a natureza do objeto afeta, de facto, a quantidade de DNA que é transferido aquando do contacto.

A textura do objeto é outro fator que também foi alvo de estudo por Cale *et al.* [1], que analisou dois tipos de superfície: lisa e rugosa. Usando cabos de facas selados (novos), demonstrou que a textura não é um fator de interesse no que diz respeito à quantidade de DNA extraído e analisado.

Quanto à forma como o objeto em estudo é utilizado e as características individuais do utilizador, devem ser tidos em conta vários fatores [13] tais como: a pressão exercida, o tipo de movimentos realizados pela mão do indivíduo sobre a superfície, o *stress* emocional do mesmo, e possíveis vestígios anteriores que estivessem presentes nas mãos ou no objeto, podendo originar a transferência de diferentes quantidades de DNA, que, aquando da análise, dificulta a interpretação dos resultados obtidos.

No entanto, foi efetuado um estudo [14] que comprovou que o género do utilizador não está correlacionado com a quantidade de DNA que o indivíduo pode depositar na superfície manuseada.

Com a evolução dos estudos do *touch*-DNA, foi introduzido em 2002 um novo termo – *shedder type* – por Lowe *et al.* [15], separando os indivíduos em “dadores não ideais” ou “dadores ideais” de células epiteliais, baseando-se na qualidade do perfil genético obtido.

Todavia, um outro estudo [14] publicado em 2007 por Phipps *et al.* tentou reproduzir o estudo publicado por Lowe *et al.* [15], seguindo rigorosamente o mesmo método. Este constatou que num grupo de 60 indivíduos nenhum foi definido como um dador ideal de células. Comprovou, no entanto, que um mesmo indivíduo, em diferentes dias, poderia ser um dador ideal ou não ideal de células. Sendo assim, não se devia definir o *shedder type* de modo linear, devendo ter em conta outros fatores. Entre eles, os fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura atmosférica que se faz sentir no momento da transferência. Não porque esta altere diretamente a quantidade de DNA depositada, mas sim as condições do dador, que pode sofrer um maior *stress* térmico, alterando, possivelmente, a quantidade de DNA transferido.

Recentemente, em 2016, Goray *et al.* [16] verificou diferenças constantes, entre indivíduos, em relação à quantidade de DNA libertada, em testes realizados ao longo de várias semanas. Este estudo concluiu que, de facto, existe uma grande variação nas quantidades de DNA depositadas não só entre diferentes indivíduos, como em diversos períodos do dia. Ainda assim, observaram que certos indivíduos depositavam maior quantidade de DNA comparativamente aos outros, em todos os testes realizados.

Desta forma, a discrepância entre resultados obtidos quanto ao *shedder type* (pela própria natureza do *touch*-DNA) não permite para já concluir se este é, ou não, um fator influenciador.

Transferência Secundária

Devido às atividades normais do dia-a-dia, o DNA transferido para uma superfície pode não pertencer unicamente ao indivíduo que entrou em contacto com a mesma, mas a outro indivíduo, isso deve-se ao facto de poder ocorrer a chamada transferência secundária. Esta transferência foi observada inicialmente no estudo realizado por van Oorschot and Jones [5] quando, após a colheita e análise de amostras de luvas usadas, se verificou que nos perfis obtidos surgiam alelos adicionais que não pertenciam aos utilizadores das mesmas.

van Oorschot and Jones introduziram, assim, o tema da transferência secundária de DNA, acautelando os peritos para esta possibilidade e advertindo para as dificuldades na interpretação dos resultados obtidos.

Este problema deve ser tido em conta pois pode ligar erroneamente um indivíduo a um crime [17, 18] - introduzindo DNA exógeno numa amostra forense – podendo, desta forma, precipitar conclusões, como por exemplo o DNA ter sido depositado no objeto por transferência primária (contacto direto).

Daly *et al.* [12] concluiu do seu estudo que é mais provável que um perfil genético obtido seja de transferência primária do que secundária. Porém, tal foi concluído a partir de deduções teóricas, não de resultados científicos, uma vez que no seu estudo os perfis genéticos dos voluntários não foram tidos em conta para mimetizar possíveis situações em laboratório.

Cale *et al.* [1] procurou saber se a sensibilidade aumentada da metodologia utilizada para obter perfis genéticos, como por exemplo, o *kit PowerPlex® 16 HS System (Promega®)* que permite amplificações com menos de 100 pg de DNA [19-24], pode conduzir a melhores e mais corretas

interpretações da possibilidade de ter existido transferência secundária de DNA, estudou também se a existir essa transferência secundária isso pode dificultar a interpretação dos resultados obtidos.

Podemos então afirmar, com base num grande número de estudos [22, 24-27], que a quantidade de DNA mínima para se obter um perfil genético diminuiu ao longo dos anos, graças ao desenvolvimento de novos *kits*, em que perfis completos podem ser obtidos com menos de 50 *pg* de DNA, alterando, por exemplo, o número de ciclos [4]. Contudo, esta alteração pode promover o aparecimento de artefactos, pelo que, tal procedimento não é recomendado [25].

O estudo de Cale *et al.* [1] obteve uma grande variedade de perfis genéticos. Os resultados indicaram que ocorreu transferência secundária de DNA em 85% das 20 amostras analisadas, e em cinco destas, os alelos presentes em consequência da transferência secundária de DNA foram suficientes para identificar um indivíduo que não esteve em contacto direto com o objeto em estudo.

Estudos publicados em 2016 [9, 16] analisaram o *non-self* DNA, ou seja, DNA presente nas mãos de um indivíduo devido às diferentes actividades que desenvolve no seu dia-a-dia, e que pode ser transferido juntamente com o seu próprio DNA para um objeto. Comprovaram que o penúltimo e último indivíduo que entrou em contacto com o objeto a estudar, são os maiores contribuidores para os perfis genéticos obtidos, sendo o último, geralmente, o maior contribuidor.

Em jeito de conclusão, os resultados obtidos aquando do estudo do *touch-DNA* devem ser interpretados tendo em conta o seu enquadramento no contexto de outras evidências disponíveis, prevenindo e diminuindo o risco de erros na sua análise.

Persistência do *touch*-DNA

Um desafio que a metodologia que estuda o *touch*-DNA enfrenta, atualmente, é a falta de análise à sua persistência e a qualidade dos perfis genéticos gerados consoante o tempo decorrido entre a sua deposição e colheita. Numa situação real, em tribunal, a defesa possivelmente conseguiria ilibar o suspeito devido à falta de robustez da prova.

Até à data, escassos estudos foram efetuados, sendo conhecidos apenas quatro [8, 10, 28, 29].

Raymond *et al.* [10] estudou a persistência do *touch*-DNA usando uma mistura de glóbulos brancos e plaquetas na tentativa de diminuir possíveis erros na análise laboratorial. Concluiu que a capacidade de obter perfis genéticos através das amostras por ele utilizadas diminuiu significativamente passado duas semanas. O facto de ter sido usada uma mistura e não o contacto direto fez com que a quantidade libertada fosse até 300 000 vezes superior àquela que seria deixada com este tipo de contacto.

Assim sendo, Raymond *et al.* [10] concluiu que o DNA depositado numa superfície aquando do manuseamento seria indetetável decorridas menos de 2 semanas.

Roland *et al.* [8] examinou também a persistência do *touch*-DNA, não numa escala temporal, mas sim na sua capacidade de persistir num objeto depois deste ter sido manuseado por um segundo indivíduo.

Em 2016, Szkuta *et al.* [29] estudou a transferência do *touch*-DNA e quais as atividades da vida diária que influenciariam a sua persistência. O seu estudo teve como objetivo final perceber se o *non-self* DNA transferido através de um cumprimento de mão persistia na mão do segundo indivíduo após 15 minutos, enquanto este realizava tarefas quotidianas. Comprovou que, à medida que ia

aumentando o número de itens que iam sendo manuseados pelo indivíduo, a quantidade de DNA obtida ia diminuindo.

Um estudo mais recente (2017), conduzido por Pfeifer *et al.* [28], analisou a persistência do DNA num objeto quando este é manuseado por mais do que um indivíduo. Nesse estudo, foi testada a persistência do DNA num objeto de um indivíduo (proprietário), quando este era posteriormente manuseado por outro indivíduo de forma moderada ou intensa.

O propósito deste estudo [28] foi comprovado que o perfil genético do proprietário de um objeto poderia ser detetado neste, mesmo após não estar em contacto com o mesmo por mais de duas semanas. Os resultados mostraram ainda que, em apenas um dos trinta objetos analisados, foi possível obter o perfil genético do proprietário, aparecendo este sob a forma de mistura com o perfil genético do indivíduo que entrou em contacto com o objeto num segundo tempo.

Assim, pareceu-nos que seria importante aprofundar os conhecimentos da comunidade científica acerca da persistência do *touch*-DNA. Com este estudo procuramos caracterizar a persistência do *touch*-DNA ao longo do tempo, após a manipulação de uma arma de fogo, e estimar o tempo máximo que ainda permita fazer uma amostragem da superfície do objeto de forma a obter um perfil genético.

Diferenças Étnicas

É sabido que existem diferenças na pele entre indivíduos negróides e caucasianos. Estas diferenças refletem-se também a níveis mais profundos, para além da cor, e de outras características visíveis.

Em 2012, Girardeau-Hubert *et al.* [30] estudou a junção derme-

epiderme e verificou que na pele de caucasianos as quantidades de colagénio IV e VII, laminina e nidogénio eram maiores do que na pele dos negróides.

Recentemente, em 2014, Yin *et al.* [7] estudou a expressão genética da epiderme e como esta altera a pigmentação entre caucasianos, negróides e asiáticos.

Concluiu ainda que, a pigmentação da pele depende de três tipos celulares: melanócitos, queratinócitos e fibroblastos. Os melanócitos são responsáveis pela produção e armazenamento da melanina, sendo esta depois transferida para os queratinócitos, que, por sua vez, ao amadurecerem migram para a epiderme, ocorrendo, deste modo, a distribuição da melanina pela superfície da pele, o que se traduz nas diferenças visíveis entre negróides e caucasianos.

A queratina, presente nos queratinócitos, é uma proteína secundária estrutural responsável por proteger os mamíferos, répteis e anfíbios, das agressões do meio ambiente, e é sabido — desde 1986 — que esta é uma proteína inibidora da reação de PCR [31]. Por serem os queratinócitos os responsáveis por transportar a melanina para a superfície da derme e ser esta a responsável das diferenças cromáticas entre negróides e caucasianos, pressupõe-se que estes apresentem diferentes níveis de queratina na sua pele afetando assim, possivelmente, a posterior análise genética.

Não são conhecidos, até ao momento, estudos publicados sobre este tema, sendo fundamental adquirir conhecimentos sobre o mesmo.

Armas de fogo

Segundo a Lei nº 5/2006, de 23/02, na sua alínea p) do N° 1 do artigo 2º, é uma arma de fogo *“todo o engenho ou mecanismo portátil destinado a*

provocar a deflagração de uma carga propulsora geradora de uma massa de gases cuja expansão impele um ou mais projéteis”, e é considerado “arma de fogo curta a arma de fogo cujo cano não exceda 30 cm ou cujo comprimento total não exceda 60 cm”, conforme a alínea q) do mesmo preceito legal.

As pistolas *Glock*[®] englobam-se nestas normas, sendo armas de fogo curtas.

Num caso de crime ocorrido com uma arma de fogo, podem ser estudados diversos parâmetros como, por exemplo, o estudo dos resíduos de disparo (*GSR – Gun Shot Residues*), resíduos esses que podem fornecer informações importantes para uma identificação positiva ou negativa de uso de arma de fogo por parte de um suspeito, podem também ser estudados os ângulos e posições de disparo do atirador, projéteis, cápsulas ou invólucros, entre outros.

Podem, ainda serem realizados estudos de dactiloscopia, ciência que estuda as impressões digitais presentes nas superfícies [32].

Similarmente, podemos também recolher amostras de DNA para a investigação do perfil genético [33], que nela possa existir.

A pistola *Glock*[®], é fabricada por uma empresa austríaca, e é considerada uma das armas mais seguras do mundo, graças ao sistema de segurança triplo independente, o que a torna numa das armas de fogo curtas mais adotada no mundo pelas forças policiais, e militares.

Em Portugal a pistola *Glock*[®] tem uma grande expressão, uma vez que foi adotada pelos principais órgãos de polícia criminal, nomeadamente a Polícia de Segurança Pública (PSP), Guarda Nacional Republicana (GNR), Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), Polícia Judiciária (PJ), Polícia Judiciária Militar (PJM), e por diversas unidades militares como Fuzileiros e Comandos, levando à escolha desta para a realização do presente

estudo.

Em concreto a pistola *Glock*[®] é composta por uma armação (*frame*) em polímero rugoso e liso, o que teoricamente permite o depósito de células epiteliais.

Materiais e Métodos

Com o objetivo de mimetizar situações reais de disparo de arma de fogo foi realizado um conjunto de procedimentos experimentais que se descrevem de seguida e que foram realizados num laboratório de balística forense.

A execução do trabalho experimental em laboratório contou com a colaboração de 10 voluntários (masculinos e femininos), com idades compreendidas entre os 19 e os 24 anos e com afinidades populacionais distintas (cinco negroides e cinco caucasianos).

O estudo das amostras de DNA foi realizado no laboratório de Biologia e Genética Forenses do INMLCF, I.P..

Após informação detalhada sobre o desenho experimental e da aceitação de participação no estudo foi ainda solicitado a cada um dos voluntários e ao proprietário das armas, o consentimento escrito para colheita, por zaragatoa oral, de "amostras referência".

Na primeira fase do estudo, aquela que conduziu à colheita das amostras que posteriormente foram sujeitas a estudo de DNA, foram usados os seguintes materiais:

- 3 armas da marca *Glock*[®];
- envelopes D4;
- álcool etílico a 70%;
- zaragatoas de algodão estéreis (*Collection Swab Viscose, Bioplaslab*[®]); soro fisiológico.

Simulação do disparo

A arma e os ensaios experimentais

Face à Lei nº 5/2006, de 23/02, atualmente em vigor em Portugal, um indivíduo que não possua licença de uso e porte de arma, não pode disparar uma arma de fogo. Face a esta disposição legal e uma vez que o investigador não possuía essa condição de licença de uso e porte de arma, optou-se por realizar simulações de disparo de arma de fogo em laboratório de Balística Forense.

Por questões de segurança, as armas utilizadas nos ensaios experimentais (simulação de disparo) eram constituídas apenas pela empunhadura, sem o carregador de munição e a corredeira, conforme se mostra na Figura 1.



Figura 1 Arma Glock®, desprovida de carregador de munição e corredeira

Procedimentos prévios aos ensaios experimentais

Foi definido não impor aos voluntários envolvidos neste estudo qualquer restrição às suas atividades da vida diária, só lhes foi pedido que não lavassem as mãos nos 15 minutos anteriores ao início dos ensaios experimentais (simulação de disparo).

Antes de cada ensaio experimental, o investigador devidamente equipado com bata, luvas e máscara começava por limpar e descontaminar os componentes da arma, de qualquer vestígio de DNA que pudesse existir, utilizando para o efeito algodão embebido em álcool etílico a 70%.

De seguida, antes de cada colaborador voluntário empunhar a arma, o investigador realizava uma “zaragatoa de controlo” que acondicionava de imediato.

Ensaio experimentais

Em cada ensaio experimental a arma era empunhada durante dois minutos pelo voluntário. Durante este tempo, a arma passava de uma mão para a outra, procurando-se sempre que ocorresse um contato firme da mão do voluntário contra a empunhadura da arma (Figura 2).



Figura 2 Arma usada por um dos voluntários, armazenada, na qual será efetuada a colheita 24 horas após a simulação do disparo.

Cada voluntário simulou um disparo em três ocasiões diferentes.

Colheitas para DNA

A colheita foi realizada nas regiões rugosa e lisa do cabo da arma, como mostram as Figuras 4 e 5, usando uma zaragatoa humedecida (*Collection Swab Viscose, Bioplaslab®*) com uma gota de soro fisiológico, que foi friccionada em ambas as zonas, com pressão moderada, rodando a zaragatoa e incluindo o ápice.



Figura 4 Zonas lisas e rugosas de uma das pistolas Glock® usadas no estudo



Figura 3 Zonas lisas e rugosas de uma das armas Glock® usados no estudo

Estas foram posteriormente secas à temperatura ambiente durante 30 minutos, em local adequado para evitar possíveis contaminações. Posteriormente, foram identificadas e armazenadas para análise.

No final de cada ensaio experimental (simulação de disparo) o investigador procedia a colheita de amostras de DNA em 3 tempos diferentes (1ª colheita: imediatamente após o ensaio experimental; 2ª colheita: passadas

24h; 3ª colheita: passadas 72h).

No fim de cada colheita e para evitar contaminação da superfície da arma esta era colocada dentro de envelope de papel D4 e aí permanecia até se completarem as colheitas (Figura 5).

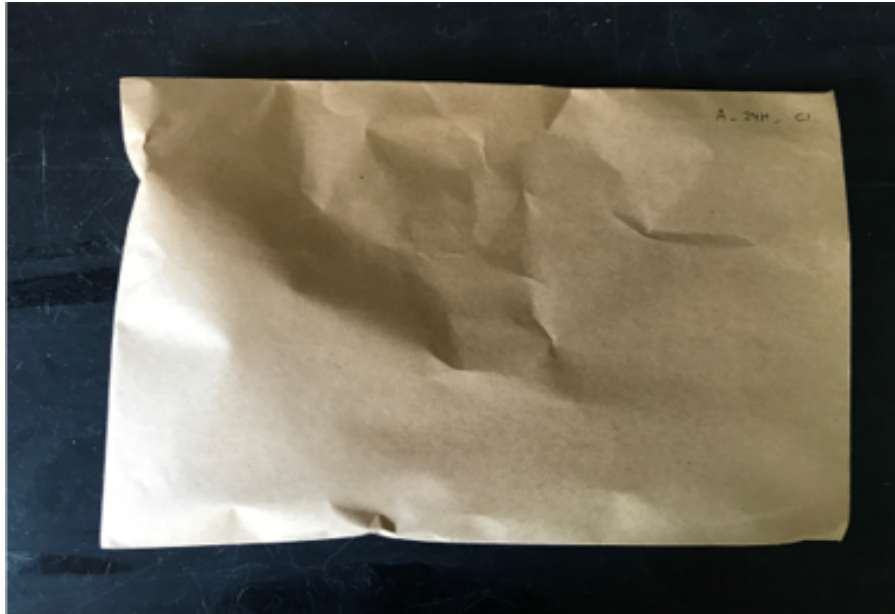


Figura 5 Arma usada por um dos voluntários, armazenada, na qual será efetuada a colheita 24 horas após a simulação do disparo.

Zaragatoas de controlo

A “zaragatoa de controlo da arma” amostrava as áreas da arma que previamente tinham sido definidas como áreas de interesse para o estudo, e servia para evidenciar/provar que efetivamente a arma tinha sido corretamente limpa e descontaminada de DNA pré-existente ao ensaio experimental (simulação de disparo).

Ainda para excluir a possibilidade de contaminação das armas devido ao uso repetido e constante, ao longo de anos, do proprietário das mesmas, foi realizada uma outra “zaragatoa de controlo do proprietário da arma”, após obtenção de seu consentimento informado.

Extração

Extração das Amostras de Referência

A extração das amostras de referência colhidas aos indivíduos voluntários foi efetuada utilizando o *kit Prep-n-Go™ Buffer (ThermoFisher - Applied Biosystems®)*, de acordo com o protocolo em vigor no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do INMLCF, I.P..

A extração, assim como todos os passos abaixo descritos, foi realizada em câmaras descontaminadas através de luz ultravioleta (UV).

Primeiramente, cortou-se um segmento da zaragatoa *Fitzco CEP™ Swab (Triple Head)* colhida aos voluntários para um tubo de 1.5mL, ao qual se adicionou 200µL de *Água Nuclease-Free* e 200µL de *Tampão Prep-n-go® (ThermoFisher - Applied Biosystems®)*. Foi adicionado um controlo negativo de extração. De seguida, as amostras foram colocadas num termobloco a 90°C durante 20 minutos. Após esse período, os tubos, previamente identificados, foram armazenados a -20°C.

Extração das Amostras Problema

As amostras problema foram extraídas usando o *PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (ThermoFisher - Applied Biosystems®)*. Este *kit* usa partículas magnéticas, possibilitando uma maior obtenção de DNA a partir, quer de amostras degradadas, quer de amostras com exíguas quantidades de DNA, como é o caso do *touch-DNA*.

Cada ápice e laterais das zaragatoas foram cuidadosamente cortados para os tubos fornecidos pelo *kit*. A estes tubos, constituídos por duas partes – um tubo de 2mL e uma coluna *LySep™ (ThermoFisher - Applied*

Biosystems®) – foram adicionados 500µL de *PrepFiler*™ *Lysis Buffer* e 5µL de *DTT* (dithiothreitol). Em cada extração foi realizado um controlo negativo para controlar possíveis contaminações do processo. Os tubos foram colocados num termobloco (*Eppendorf*®) durante 40 minutos, com agitação de 750 rpm. Decorrido este período, os tubos são centrifugados a 10.000 rpm durante dois minutos, recuperando o tubo com o lisado, e descartando a coluna.

As amostras são, então, colocadas no equipamento de extração *AutoMate Express DNA Extraction System* (*Applied Biosystems*®) no programa pré-definido para o *kit* usado, demorando aproximadamente 30 minutos, todo o processo. Concluído o programa, as amostras são armazenadas a -20°C.

Quantificação

A quantificação foi realizada por PCR em tempo real (RT-PCR) usando o *Quantifiler*® *Trio DNA Quantification Kit* (*ThermoFisher - Applied Biosystems*®), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Inicialmente foram preparados cinco *standards* usando o *DNA Standard* e o *Quantifiler*® *THP Dilution Buffer*, fornecidos com o *kit*. Os *standards* permitem-nos determinar a quantidade de DNA presente nas amostras – produzindo uma reta padrão de fluorescência – que é comparada com a fluorescência das mesmas.

Em cada coordenada de uma placa *MicroAmp*™ *Optical 96-Well Reaction Plate* (*ThermoFisher - Applied Biosystems*®) foram adicionados 10µL de *PCR Reaction Mix* e 8µL de *Primer Mix*, fornecidos com o *kit*, às quais se juntaram 2µL de amostra, e 2µL dos *standards* realizados, em duplicado.

Em todas as quantificações realizadas, procedeu-se à quantificação de dois controlos positivos, de 0,1ng/µL (9947A) e 2ng/µL (*DNA Control 007*),

juntamente com um controlo negativo.

A placa é selada com *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (ThermoFisher - Applied Biosystems®) e centrifugada a 10.000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente colocada no *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®), que juntamente com o *software HID Real-Time PCR Analysis Software* (Applied Biosystems®) permite determinar a quantidade de DNA presente nas amostras extraídas.

Amplificação

Para a amplificação das amostras foi utilizado o *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* (ThermoFisher - Applied Biosystems®). Este kit permite amplificar 22 STR (*D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, DYS391, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338*) em conjunto com a amelogenina.

Foi seguido o protocolo de amplificação em vigor no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do INMLCF, I.P..

Foram adicionados $n \times 3,75\mu\text{L}$ de *Master Mix* e $n \times 1,25\mu\text{L}$ de *Primer Set* a um tubo de 2mL, sendo n o número de amostras a amplificar. $5\mu\text{L}$ desta *Reaction Mix* foram divididos pelos *MicroAmp® Reaction tubes* (ThermoFisher - Applied Biosystems®), nos quais foram adicionados $5\mu\text{L}$ de amostra. Para perfazer os $12,5\mu\text{L}$ de volume final de reação foi usado tampão TE (Tris-HCl, EDTA).

Por cada amplificação foi realizado um controlo negativo (*Reaction Mix* + $7,5\mu\text{L}$ de tampão TE) e um controlo positivo (*Reaction Mix* + $5\mu\text{L}$ de DNA Control 007 ($0,1\text{ng}/\mu\text{L}$) + $2,5\mu\text{L}$ de tampão TE).

Os *MicroAmp® Reaction tubes* (ThermoFisher - Applied Biosystems®) foram selados com *MicroAmp® Caps* (ThermoFisher - Applied Biosystems®) e colocados num termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems®), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante do kit (Tabela 1), utilizando o maior número de ciclos possível, recomendado pelo mesmo.

Tabela 1 Condições do programa de PCR realizado.

Incubação	29 ciclos		Extensão Final	Final
	Desnaturação	Extensão		
95°C	94°C	59°C	60°C	4°C
1 min	10 seg	90 seg	10 min	∞

Análise de Fragmentos

Os produtos resultantes da PCR necessitam de ser separados e posteriormente analisados, permitindo a distinção entre alelos, a fim de obter um perfil genético.

Em conformidade com o protocolo estabelecido pelo fabricante, foi realizada uma eletroforese capilar no sequenciador automático *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems®). Misturou-se, num tubo de 2mL (por cada amostra a ser analisada) 12,5µL de *Hi-Di™* Formamida e 0,5µL de *GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0*.

Foram distribuídos 13µL por poço da placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (ThermoFisher - Applied Biosystems®), onde se juntou 1µL de amostra. Foi adicionado 1µL de *Globalfiler™ Allelic Ladder* por cada duas

injeções (1 injeção = 8 amostras). A placa foi colocada num termociclador para as amostras serem desnaturadas a 95°C durante 3 minutos, sendo posteriormente colocada no sequenciador automático *Genetic Analyzer 3500* (*Applied Biosystems*®).

Os fragmentos obtidos da eletroforese capilar foram analisados com recurso ao *GeneMapper™ ID-X Software* (*Applied Biosystems*®).

Os limiares da deteção dos picos validado no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do INMLCF, I.P. para o kit em utilização – *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* (*ThermoFisher - Applied Biosystems*®) – foram alterados, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 Limiar de amplitude dos picos. À esquerda encontram-se os limiares estabelecidos pelo SGBF-N INMLCF, I.P.. À direita, aqueles utilizados neste estudo.

Delegação Norte do Serviço de Genética e Biologia Forenses, INMLCF, I.P. (RFU)				Usado (RFU)			
B	89	R	90	B	40	R	40
G	43	P	40	G	40	P	40
Y	22	O	50	Y	40	O	50

Terminado o processo laboratorial, os resultados obtidos foram analisados com recurso ao software *SPSS* (*IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.*). Para comprovar possíveis desigualdades entre os diferentes tempos de recolha (persistência) foi realizada uma Análise de Variância, considerando que os resultados obtidos para cada indivíduo foram analisados para as 0, 24 e 72 horas.

Para analisar as presumíveis diferenças na quantidade de DNA obtido entre caucasianos e negróides foi realizado um Teste t para amostras independentes.

Resultados

Situando-se a quantidade ótima de DNA para a identificação genética de um indivíduo, entre os 0,5ng/μL e 2 ng/μL de DNA, para o *kit* em utilização, podemos verificar na Tabela 3 que apenas duas das amostras quantificadas atingem os valores referidos pelo fabricante do *kit*.

Tabela 3 Concentração de DNA (ng/μL). Valores obtidos por RT-PCR.

		<i>T. S. Autosomal</i>
0 h	C1	0,0187
	C2	0,0715
	C3	0,0422
	C4	0,0381
	C5	0,0673
	N1	0,1412
	N2	0,0119
	N3	0,0077
	N4	0,0198
	N5	0,0073
24 h	C1	0,1384
	C2	0,0476
	C3	0,1075
	C4	0,2568
	C5	0,2582
	N1	1,3922
	N2	0,0881
	N3	0,0734
	N4	0,1831
	N5	0,1312
72 h	C1	0,3073
	C2	0,1326
	C3	0,3152
	C4	0,1441
	C5	0,5505
	N1	0,2115
	N2	0,1602
	N3	0,0794
	N4	0,2009
	N5	0,1814

Devido às características das amostras de *touch*-DNA foi utilizado o valor do *Target Small Autosomal* de 80 *pb* para a análise da quantidade de DNA, uma vez que o *Target Large Autosomal*, por ser maior (214 *pb*), estaria mais suscetível a possíveis degradações.

Tendo em conta que nesta investigação foi usado um reduzido número de indivíduos, resultando numa amostragem pequena, o valor obtido da quantificação da zaragatoa recolhida ao indivíduo N1 às 24h (1,3922ng/ μ L) não foi tido em conta para a análise estatística, por este se afastar dos restantes valores obtidos, evitando assim uma distribuição assimétrica positiva.

No Gráfico 1 são apresentadas as variações das médias da concentração de DNA obtida consoante o tempo decorrido entre o manuseamento da arma e a colheita.

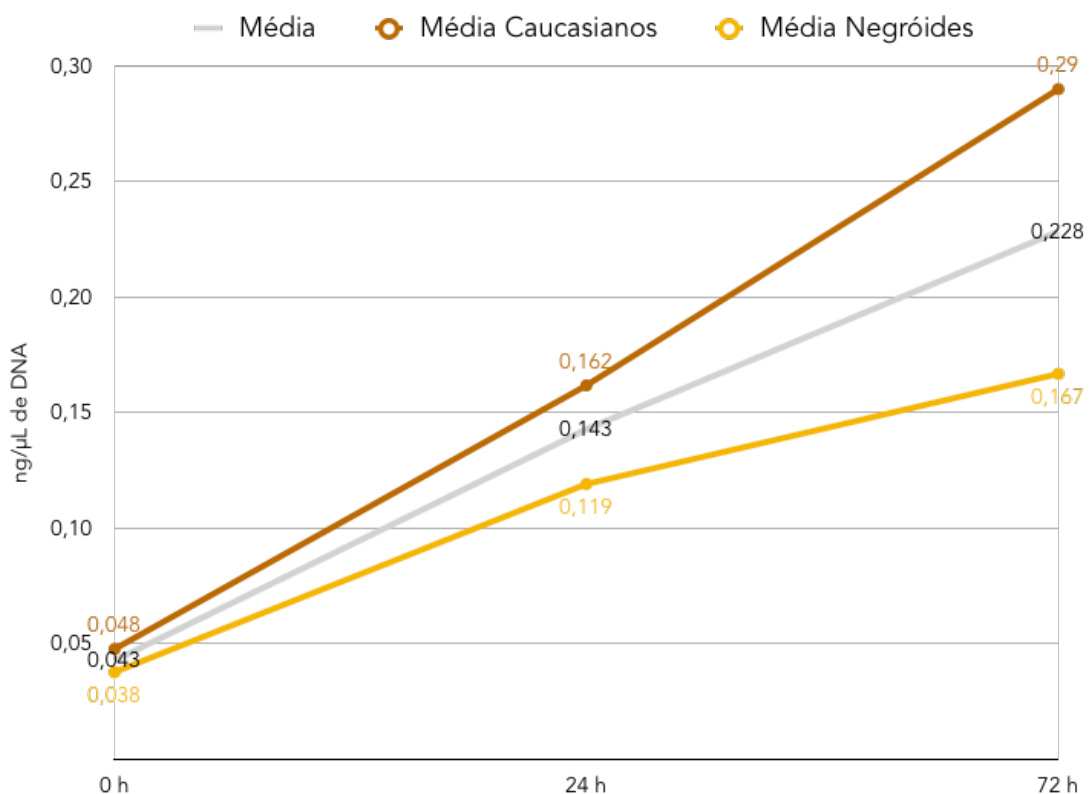


Gráfico 1 Médias da concentração de DNA obtidas.

A Análise de Variância realizada demonstrou que existem diferenças significativas entre os diferentes intervalos de recolha ($p < 0,001$), independentemente da afinidade populacional do indivíduo.

O Teste t para amostras independentes realizado demonstrou que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,184$) entre negróides e caucasianos, no que se refere à quantidade de DNA depositada, apesar de existir uma tendência para a diferença, como se pode verificar no Gráfico 1.

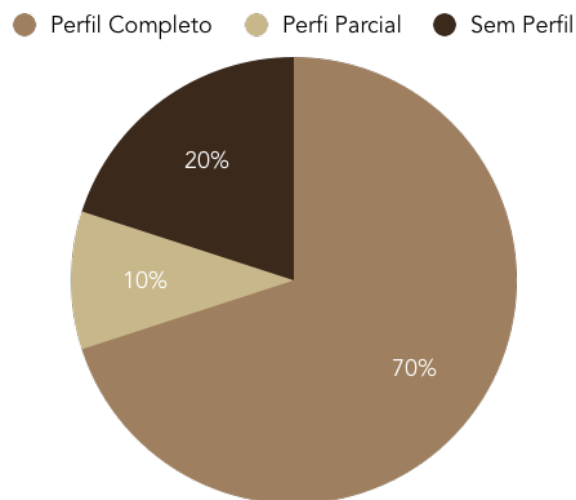


Gráfico 3 Qualidade dos perfis obtidos (0h) (%).

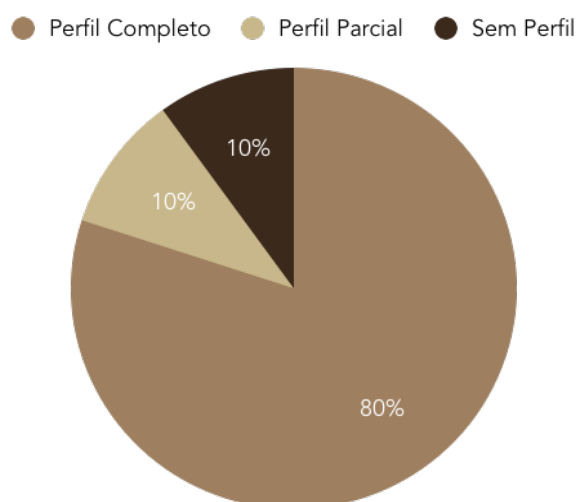


Gráfico 2 Qualidade dos perfis obtidos (24h) (%).

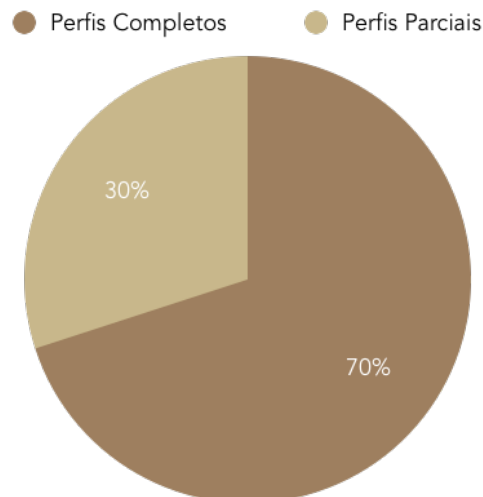


Gráfico 4 Qualidade dos perfis obtidos (72h) (%).

No que se refere à qualidade do DNA, examinando os resultados obtidos (Gráficos 2, 3 e 4), das 30 amostras amplificadas com o *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit*, 22 (73,3%) permitiram a obtenção de um perfil completo.

Reconhece-se como um perfil completo quando existe uma correspondência precisa entre todos os alelos do perfil obtido e o perfil referência do voluntário em questão.

Das restantes 8 amostras, 5 resultaram em perfis incompletos, ou seja, um ou mais alelos de um ou mais marcadores não foram amplificados. Em três das amostras amplificadas não foi obtido um perfil genético valorizável (não ocorreu amplificação de um ou mais alelos em pelo menos 4 marcadores).

No Gráfico 5 podemos observar em quantos marcadores das amostras problema ocorreu *match* com o perfil genético do indivíduo, nos diferentes tempos entre o contacto e a colheita.

Tratando-se de amostras *Low Copy Number (LCN)*, é necessário ter em conta a possibilidade de ocorrência de desequilíbrios heterozigóticos, *allele drop-out* e *allele drop-in*, desequilíbrios entre *loci*, e *stutters*. É necessário, ainda, considerar as próprias características do *touch-DNA*, nomeadamente a possibilidade de ocorrência de transferência secundária.

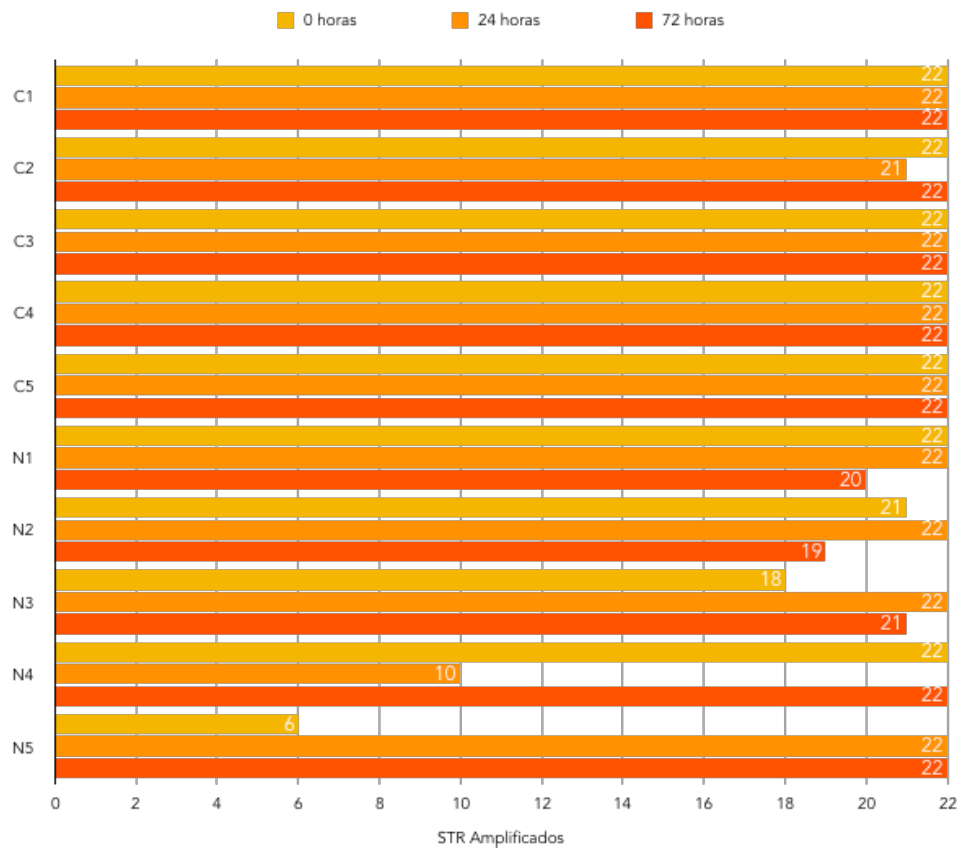


Gráfico 5 Marcadores amplificados das amostras problema correspondentes ao perfil genético do indivíduo.

Esta transferência pode conduzir ao aparecimento de misturas (alelos que não pertencem ao indivíduo em questão) aquando da análise dos perfis genéticos, tal como aconteceu em 93% (n = 28) das amostras analisadas.

Na Tabela 4 podemos verificar o número de marcadores em que foram detetadas misturas, assim como a percentagem da mesma.

Nos alelos obtidos não correspondentes ao perfil do voluntário, foi assumido que estes poderiam pertencer ao proprietário da arma. Para apurar essa hipótese, foi comparada a sua amostra de referência com as misturas obtidas. Apresentam-se os resultados da comparação na Tabela 4.

Tabela 4 Comparação das misturas com o perfil do proprietário.

	C1	C2	C3	C4	C5	N1	N2	N3	N4	N5	
Marcadores (STR) com mistura	9 (41%)	3 (14%)	0	8 (36%)	14 (63%)	0	16 (73%)	18 (82%)	8 (36%)	22 (100%)	0 h
Loci correspondentes ao proprietário	4 (18%)	0	0	3 (14%)	8 (36%)	0	5 (23%)	8 (36%)	2 (9%)	12 (55%)	
Marcadores (STR) com mistura	3 (14%)	16 (73%)	7 (32%)	3 (14%)	1 (5%)	4 (18%)	4 (18%)	18 (82%)	21 (95%)	16 (73%)	24 h
Loci correspondentes ao proprietário	0	6 (27%)	0	2 (9%)	0	0	2 (9%)	6 (27%)	5 (23%)	11 (50%)	
Marcadores (STR) com mistura	14 (64%)	15 (69%)	1 (5%)	15 (68%)	1 (5%)	12 (55%)	16 (73%)	20 (91%)	16 (73%)	6 (27%)	72 h
Loci correspondentes ao proprietário	5 (23%)	9 (41%)	0	7 (32%)	1 (5%)	4 (18%)	7 (32%)	6 (27%)	7 (32%)	1 (5%)	

Discussão

O percurso laboratorial da análise de DNA é, em toda a sua extensão, constituído por vários passos, todos eles suscetíveis a possíveis contaminações. Juntamente, a própria amostra a ser analisada pode estar degradada, danificada ou ter quantidades ínfimas de DNA, como é o caso do *touch*-DNA, podendo conduzir à obtenção de resultados inesperados.

Dos 30 perfis obtidos a partir das recolhas efetuadas nas empunhaduras das armas, 60% (n = 18) são inequivocamente correspondentes ao último indivíduo que manipulou a arma (voluntário), tal como foi observado no estudo conduzido por van Oorschot *et al.* [8].

Na presente investigação, os limiares de amplitude para a deteção dos picos foram diminuídos, em relação aos utilizados pelo Serviço de Genética e Biologia Forenses do INMLCF, I.P. – Delegação do Norte. Encontrando-se os limiares usados no presente estudo maioritariamente abaixo das 50 unidades relativas de fluorescência (Tabela 2), tornou-se possível observar alelos abaixo do limiar analítico de 50 RFU [3]. Todavia, efeitos estocásticos, como *allele drop-in*, foram também observados, mas após uma cuidada análise foram identificados.

Eventuais misturas, devido à transferência secundária de DNA, são dificuldades a ser consideradas neste tipo de amostras.

Interpretar um perfil proveniente de um só indivíduo é obviamente mais fácil do que analisar um perfil de mistura com dois, ou mais contribuidores. Além disso, ao aumentar o número de indivíduos que contribuem para um perfil, diminui o poder discriminativo do mesmo.

Neste trabalho, em concordância com os resultados obtidos no estudo conduzido por Cale *et al.* [1], verificou-se a presença de DNA exógeno em 93% (n = 28) das amostras analisadas (Tabela 4). Dessas 28 amostras, a mistura dificultou a interpretação dos perfis genéticos em 9 (32%), nas quais pelo

menos um marcador apresentou um alelo exógeno de tamanho superior ao do voluntário.

Acresce ainda que, nesta investigação, foram utilizadas armas de um proprietário com perfil genético identificado. Existe, assim, uma probabilidade da presença de alelos exógenos nos perfis genéticos obtidos a partir das amostras problema serem deste, e não apenas resultado de uma eventual transferência secundária. No entanto, em nenhuma das amostras o perfil do proprietário foi obtido, ou seja, em nenhum caso foram obtidos alelos deste em pelo menos 18 marcadores do *kit* utilizado (*GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (ThermoFisher - Applied Biosystems®)*). No estudo conduzido por Pfeifer *et al.* [28], foi obtido um perfil do proprietário do objeto, conjuntamente com o perfil genético do indivíduo que manuseou o mesmo, sob a forma de mistura, numa das amostras. Tal não se verificou na presente investigação.

Deve ser tido em conta que, durante o período em que foram realizados os ensaios experimentais, o proprietário das armas Glock® não esteve em contacto com as mesmas, e estas foram limpas antes de qualquer contacto para o estudo, assim como, entre contactos. Sendo assim, é compreensível que o perfil do proprietário não tenha sido detetado em nenhuma das 30 amostras analisadas.

Uma das finalidades do presente estudo é investigar a possibilidade de existirem diferenças entre negróides e caucasianos no que diz respeito à deposição de DNA aquando do contacto com uma superfície.

Relativamente à quantidade (ng/μL) de DNA depositado entre estes dois grupos, o Teste t para amostras independentes realizado demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,184$). Analisando os

dados obtidos das quantificações realizadas (Tabela 3), para, por exemplo, os resultados das 24 horas, podemos observar que o valor mínimo obtido nos caucasianos foi de 0,0476 ng/ μ L e o máximo 0,2582 ng/ μ L. Já no grupo relativo aos negróides, os valores mínimos e máximos foram, correspondentemente, 0,0734ng/ μ L e 0,1831ng/ μ L.

Como podemos observar, as quantidades de DNA obtidas entre caucasianos e negróides sobrepõem-se. Calculando o desvio padrão dos valores obtidos, conclui-se que, embora diferentes, os valores obtidos nos dois grupos em estudo situam-se no mesmo espectro de valores obtidos.

Assim sendo, aliado ao facto de estarmos perante uma amostragem reduzida, é de esperar que qualquer teste estatístico realizado com estes dados não tem como resultado possíveis diferenças significativas.

No entanto, como se pode verificar no Gráfico 1 existe uma tendência para a diferença entre a quantidade de DNA depositada por um negróide e um caucasiano. Em todos os intervalos de tempo analisados a média de DNA obtido para análise foi superior nos caucasianos.

Quanto à qualidade do DNA obtido, das 22 amostras em que foram obtidos perfis genéticos completos, 14 (64%) foram amostras provenientes de caucasianos, pertencendo as restantes 8 (36%) a amostras de negróides. Das 5 amostras em que foi possível obter um perfil parcial, 4 (80%) pertencem a indivíduos negróides, enquanto que apenas 1 (20%) dos perfis parciais corresponde a um indivíduo caucasiano. As 3 amostras em que não foi possível a obtenção de um perfil genético pertencem a indivíduos negróides.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que existem diferenças na qualidade do DNA obtido entre negróides e caucasianos.

Esta desigualdade é explicada, possivelmente, devido à díspar quantidade de queratina entre negróides e caucasianos, como foi descrito por

Yin *et al.* [7], sendo que esta influencia a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) [31].

No que diz respeito à quantidade de DNA obtido a partir do *touch*-DNA, esta varia devido a diversos fatores, como a constituição do objeto, o *shedder type* do indivíduo, ou as condições ambientais no momento do contacto.

No presente estudo não foram encontrados valores constantes de quantidade de DNA depositado em diferentes momentos pelo mesmo indivíduo, ou seja, não foi possível definir nenhum indivíduo voluntário como dador ideal ou não ideal de células (*shedder type*), contrariando a recente investigação conduzida por Goray *et al.* [16], e estando de acordo com o estudo realizado por Phipps *et al.* [14].

Quanto à persistência do *touch*-DNA, a Análise de Variância realizada permite-nos afirmar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) na quantidade de DNA possível de ser analisada consoante diferentes períodos de tempo entre a deposição e recolha do *touch*-DNA.

Examinando o Gráfico 1, podemos observar que a média geral (negróides e caucasianos) de DNA extraído surpreendentemente aumenta consoante o tempo decorrido entre a simulação do disparo e a recolha, quando o oposto seria expectável. Raymond *et al.* [10] defende no seu estudo que o *touch*-DNA seria indetetável 2 semanas após a sua deposição. Todavia, não existem estudos, que sejam do nosso conhecimento, que tenham estudado períodos temporais inferiores.

Uma vez que o tempo de manuseamento foi imutável em todos os ensaios experimentais, este não é a razão pela qual a quantidade de DNA extraído tenha aumentado consoante o tempo decorrido entre o contacto e a recolha.

Considerando, também, que a temperatura poderá ser um fator influenciador da quantidade de DNA depositada por um indivíduo, as temperaturas médias registadas nos dias em que foram feitas as recolhas foram analisadas. Demonstraram-se irrelevantes para o aumento da quantidade de DNA observado, já que não existe qualquer correlação entre um aumento ou decréscimo de temperatura linear, correspondente aos resultados obtidos.

Posto isto, deduz-se que possíveis diferenças no procedimento da recolha, causadas eventualmente por erro de natureza humana, poderão estar na origem deste inesperado aumento da concentração de DNA obtido consoante aumenta o tempo decorrido entre a manipulação e a colheita.

Por conseguinte, achamos ser do maior interesse o desenvolvimento deste tema, de modo a esclarecer se há de facto um aumento da quantidade de DNA em função do tempo decorrido entre o fim da manipulação e a recolha da amostra para análise.

Conclusões

As conclusões deste estudo foram as seguintes:

1. Constatou-se que é possível recolher DNA suficiente para identificar o perfil genético de quem manipulou a arma até 72 horas após o seu manuseamento.
2. Verificou-se a presença de DNA exógeno em 93% (n = 28) das amostras analisadas. A mistura de perfis genéticos pode ser explicada por uma possível transferência secundária.
3. Demonstrou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,184$) entre os voluntários negróides e os caucasianos, no que se refere à quantidade de DNA depositada na arma.
4. Obteve-se um perfil genético completo em 22 (73,3%) das 30 amostras amplificadas com o *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems®)*.
5. O *touch*-DNA analisado a partir de indivíduos caucasianos apresentou perfis genéticos de qualidade superior aos obtidos para os indivíduos negróides.

Face aos dados obtidos pensamos ser pertinente realizar novos estudos, nas mesmas condições, com um número superior de participantes e com intervalos de tempo superiores aos agora realizados. Deste modo, pretende-se ter mais dados para uma análise estatística precisa, relativa à persistência de DNA em função do tempo decorrido entre contacto e colheita.

Referências Bibliográficas

1. Cale, C.M., et al., *Could Secondary DNA Transfer Falsely Place Someone at the Scene of a Crime?* J Forensic Sci, 2016. **61**(1): p. 196-203.
2. Jeffreys, A.J., V. Wilson, and S.L. Thein, *Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.* Nature, 1985. **314**(6006): p. 67-73.
3. Butler, J.M., *Fundamentals of Forensic DNA Typing.* 2010, San Diego, California, USA: Elsevier Inc.
4. Gill, P., et al., *An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA.* Forensic Sci Int, 2000. **112**(1): p. 17-40.
5. van Oorschot, R.A. and M.K. Jones, *DNA fingerprints from fingerprints.* Nature, 1997. **387**(6635): p. 767.
6. Wickenheiser, R.A., *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): p. 442-50.
7. Yin, L., et al., *Epidermal gene expression and ethnic pigmentation variations among individuals of Asian, European and African ancestry.* Exp Dermatol, 2014. **23**(10): p. 731-5.
8. van Oorschot, R.A., G. Glavich, and R.J. Mitchell, *Persistence of DNA deposited by the original user on objects after subsequent use by a second person.* Forensic Sci Int Genet, 2014. **8**(1): p. 219-25.
9. Buckingham, A.K., M.L. Harvey, and R.A. van Oorschot, *The origin of unknown source DNA from touched objects.* Forensic Sci Int Genet, 2016. **25**: p. 26-33.
10. Raymond, J.J., et al., *Trace evidence characteristics of DNA: A preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes.* Forensic Sci Int Genet, 2009. **4**(1): p. 26-33.

11. van Oorschot, R.A., K.N. Ballantyne, and R.J. Mitchell, *Forensic trace DNA: a review*. Investigative Genetics, 2010. **1**(1): p. 1-17.
12. Daly, D.J., C. Murphy, and S.D. McDermott, *The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(1): p. 41-6.
13. Quinones, I. and B. Daniel, *Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(1): p. 26-30.
14. Phipps, M. and S. Petricevic, *The tendency of individuals to transfer DNA to handled items*. Forensic Sci Int, 2007. **168**(2-3): p. 162-8.
15. Lowe, A., et al., *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): p. 25-34.
16. Goray, M., et al., *Shedder status—An analysis of self and non-self DNA in multiple handprints deposited by the same individuals over time*. Forensic Science International: Genetics, 2016. **23**: p. 190-196.
17. Cale, C.M., *Forensic DNA evidence is not infallible*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 611.
18. Helmus, J., T. Bajanowski, and M. Poetsch, *DNA transfer—a never ending story. A study on scenarios involving a second person as carrier*. Int J Legal Med, 2016. **130**(1): p. 121-5.
19. Budowle, B., A.J. Eisenberg, and A. van Daal, *Validity of low copy number typing and applications to forensic science*. Croat Med J, 2009. **50**(3): p. 207-17.
20. Aditya, S., C.N. Bhattacharyya, and K. Chaudhuri, *Generating STR profile from "Touch DNA"*. J Forensic Leg Med, 2011. **18**(7): p. 295-8.
21. Thomasma, S.M. and D.R. Foran, *The influence of swabbing*

solutions on DNA recovery from touch samples. J Forensic Sci, 2013. **58**(2): p. 465-9.

22. Cotton, E.A., et al., *Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework.* Forensic Sci Int, 2000. **112**(2-3): p. 151-61.

23. Dieltjes, P., et al., *A sensitive method to extract DNA from biological traces present on ammunition for the purpose of genetic profiling.* International Journal of Legal Medicine, 2011. **125**(4): p. 597-602.

24. Ensenberger, M.G., et al., *Developmental validation of the PowerPlex 16 HS System: an improved 16-locus fluorescent STR multiplex.* Forensic Sci Int Genet, 2010. **4**(4): p. 257-64.

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

26. LaFountain, M.J., et al., *TWGDAM validation of the AmpFISTR Profiler Plus and AmpFISTR COfiler STR multiplex systems using capillary electrophoresis.* J Forensic Sci, 2001. **46**(5): p. 1191-8.

27. Krenke, B.E., et al., *Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system.* J Forensic Sci, 2002. **47**(4): p. 773-85.

28. Pfeifer, C.M. and P. Wiegand, *Persistence of touch DNA on burglary-related tools.* Int J Legal Med, 2017.

29. Szkuta, B., K.N. Ballantyne, and R.A. van Oorschot, *Transfer and persistence of DNA on the hands and the influence of activities performed.* Forensic Sci Int Genet, 2017. **28**: p. 10-20.

30. Girardeau-Hubert, S., H. Pigeon, and D. Asselineau, *In vivo and in vitro approaches in understanding the differences between Caucasian and African skin types: specific involvement of the papillary dermis.* Int J Dermatol, 2012. **51 Suppl 1**: p. 1-4.

31. Bohr, V., J. Mansbridge, and P. Hanawalt, *Comparative effects of*

growth inhibitors on DNA replication, DNA repair, and protein synthesis in human epidermal keratinocytes. Cancer Res, 1986. **46**(6): p. 2929-35.

32. Amata, B., et al., *Fingerprint on trigger: A real case.* Forensic Sci Int, 2015. **253**: p. e25-7.

33. Montpetit, S. and P. O'Donnell, *An optimized procedure for obtaining DNA from fired and unfired ammunition.* Forensic Sci Int Genet, 2015. **17**: p. 70-4.

