NORMA SUELI BONACCORSO

APLICAÇÃO DO EXAME DE DNA NA ELUCIDAÇÃO DE CRIMES

**Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Medicina Forense
Orientadora: Profa. Dra. Irene
Batista Muakad**

**Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo
São Paulo
2005**

NORMA SUELI BONACCORSO

APLICAÇÃO DO EXAME DE DNA NA ELUCIDAÇÃO DE CRIMES

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Direito da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Medicina Forense
Área de concentração: Direito
Penal, Medicina Forense e
Criminologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Irene
Batista Muakad**

**São Paulo
2005**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Centro de Informação Tecnológica do
Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

B697a Bonaccorso, Norma Sueli
Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes. / Norma Sueli
Bonaccorso. -- São Paulo, 2005 - 156p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Direito.
Departamento de Direito Penal. Área de concentração: Direito Penal, Medicina
Forense e Criminologia.

Orientadora: Profa. Dra. Irene Batista Muakad

1. Exame de DNA 2. Identificação humana 3. Crime 4. Análise forense
5. Biologia molecular 6. Medicina legal 7. Direito penal 8. Tese
I. Universidade de São Paulo. Faculdade de Direito. Departamento de Direito Penal
II. Título

05-59

CDU 575.113:343.232(043)

NORMA SUELI BONACCORSO

APLICAÇÃO DO EXAME DE DNA NA ELUCIDAÇÃO DE CRIMES

**Dissertação apresentada à Faculdade de Direito da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Forense
Área de concentração: Direito Penal, Medicina Forense e Criminologia**

Orientadora:

Profa. Dra. Irene Batista Muakad
Professora de Medicina Forense da
Faculdade de Direito da USP

Prof. Dr.

Prof. Dr.

*À minha querida irmã Rose,
por seu apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos póstumos ao Prof. Dr. José Lopes Zarzuela, colega e inesquecível mestre na Academia de Polícia de São Paulo e na Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo, pela forte influência exercida em minha formação.

Agradecimento ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade dada para a retomada e o aprofundamento de nossos estudos sobre Biologia Molecular aplicada.

Especial agradecimento à Profa. Dra. Irene Batista Muakad, pela amizade, ensinamentos, atenção e, principalmente, pelo estímulo durante a orientação.

RESUMO

Bonaccorso, N. S. **Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes**. São Paulo, 2005. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Direito. Universidade de São Paulo.

O amplo emprego do exame de DNA em ações de investigação de paternidade levou à divulgação maciça de sua eficácia pelos meios de comunicação que acabou por lhe dar uma aura de infalibilidade, colocando em descrédito os métodos analíticos mais antigos. Enfocado pela mídia como técnica suprema, foram omitidas do grande público as limitações existentes quando aplicada à Criminalística, seu alto custo e a complexidade dos processos técnicos exigidos para que sejam auferidos resultados confiáveis. No meio jurídico brasileiro, o tema é ainda discutido de forma superficial, marginalizando os operadores do direito dos conhecimentos técnico-científicos necessários para a interpretação dos resultados probabilísticos oferecidos pelos exames de DNA. Este trabalho procura, de certa forma, diminuir esta lacuna técnico-científica e esclarecer os reais alcances e limitações da aplicação desta técnica nas investigações forenses como auxiliar na elucidação de crimes e na identificação de pessoas. Inicia-se pelo estudo da evolução das técnicas empregadas na Medicina Forense para a identificação humana, discutindo-se a propalada sobrepujança da análise de DNA em relação aos tradicionais exames periciais. É feita uma abordagem sobre o desenvolvimento da Biologia Molecular, principiando-se pelo estudo da estrutura do DNA e pela forma de transmissão da informação genética, para, em seguida, tratar da detecção de polimorfismos presentes nesta molécula propiciadores, em última instância, da obtenção de padrões genéticos indivíduo-específicos que vêm sendo empregados na identificação de suspeitos em casos de crimes sexuais; na identificação de cadáveres de vítimas de crimes ou de grandes catástrofes; e no estabelecimento de vínculo entre suspeitos e locais de crime, entre um local de crime e outro, e entre instrumento lesivo e vítima. Dá-se também grande ênfase à coleta de materiais e as precauções para garantir a cadeia de custódia das amostras que serão estudadas, ressaltando-se ainda aspectos éticos e jurídicos que envolvem a questão da coleta de materiais biológicos de suspeitos à luz do direito brasileiro. São também abordados os procedimentos laboratoriais utilizados para a extração, quantificação, amplificação e detecção do DNA dos materiais analisados, bem como os métodos estatísticos empregados para a correta interpretação dos resultados auferidos e as recomendações existentes para elaboração do laudo pericial e para o necessário controle de qualidade das análises de DNA. São discutidos aspectos atinentes ao uso das informações sobre o DNA, quer em suas repercussões sociais quer como prova na justiça penal, pela abordagem de características de seu contraditório e de seu real valor para a formação da culpabilidade. É ainda apresentado o trabalho pericial realizado no Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo e também exposto um estudo estatístico sobre a eficácia técnica das análises realizadas neste laboratório. Conclui-se que a análise de DNA, mesmo sendo uma poderosa ferramenta, está longe de ser uma condição *sine qua non* em estudos forenses. A prova de DNA deve ser sempre considerada dentro de um conjunto de variadas evidências e o papel do geneticista forense não é o de fazer presunções de culpabilidade ou de inocência, mas o de fornecer informações exatas para melhor aplicação da justiça.

Palavras-chave: identificação humana; exame forense de DNA; valor da prova do DNA; Medicina Forense; Biologia Molecular; crimes.

ABSTRACT

Bonaccorso, N. S. **DNA exam application in crime elucidation**. São Paulo, 2005. 156p.
Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Direito. Universidade de São Paulo.

The wide application of the DNA exam in paternity investigation led to the massive divulgation of its efficiency through the communication channels, earning it a reputation of infallible result, and jeopardizing the credit of older analytical methods. While focused by the media as the most supreme technique, several limitations were omitted regarding its use in criminal matters, such as its high cost and the complexity of technical processes demanded for trustworthy results. The theme is still discussed in a superficial way among the Brazilian juridical scenario, which leaves the law related individuals with a lack of technical and scientific knowledge required to the interpretation of results offered by DNA exams. The goal of this report is to, in a way, diminish this technical and scientific gap and clarify the real accomplishments and limitations of this technique, while applied to forensic investigations as an auxiliary alternative to crime solving and people identifying. We begin with the study on the evolution of the techniques applied in Legal Medicine to human identification, discussing the surpass of DNA analysis in relation to other traditional exams. The development of Molecular Biology is featured with basis on the DNA structure and the way the genetic information is transmitted, followed by the polymorphisms' detection in this molecule and obtainment of specific genetic patterns which have been used for identifying suspects of sexual crimes; identification of crime and catastrophe victims, and in the establishment of a link between suspects and crime scenes, one crime scene and another, and a wound object and a victim. Great emphasis is given to the collecting of material and precaution used to ensure the custody of samples to be analysed, enhancing the ethic and legal aspects involving the collection of biological material of suspects brought to light as per the Brazilian Law. Laboratory procedures utilized to the extraction, amplifying and detection of DNA analysed material are outlined, and statistics' methods applied to the correct interpretation of results and existing recommendations to elaborate the expert report, and to the necessary quality control of DNA analysis. Several aspects referent to the use of information about DNA are discussed, as whether in relation to its social repercussions or as a penal proof, through the characteristics of its contradictory and real value to elaborate culpability. An expert essay formulated at the 'São Paulo Criminal Institute DNA Laboratory' is presented along with a statistics study on the technical efficacy of samples' analysis made in that lab. The conclusion is that the DNA analysis, despite being a powerful tool, is far from being a *sine qua non* condition in forensic studies. The DNA proof must always be considered within an ensemble of various evidences, and the role of the legal genetic expert is not to make presumptions of culpability of innocence, but to provide accurate information to help the applicable law.

Key words: human identification; DNA forensic exam; DNA's proof value; Legal Medicine; Molecular Biology; crimes.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AABB - Associação Americana de Bancos de Sangue
AAFS - *American Academy of Forensic Science*
AICEF - *Academia Iberoamericana de Criminalística y Estudios Forenses*
AmpFLP - polimorfismo do comprimento amplificado do fragmento de DNA
ASO - oligonucleotídeos alelo-específicos
CNE – Conselho Nacional de Ética
CODIS - *Combined DNA Index System*
CQ - controle de qualidade
EDNAP – *European DNA Profiling*
EDTA - ácido etilenodiamino tetracético
EL – equilíbrio de ligação
ENFSI - *European Network of Forensic Science Institute*
FBI - *Federal Bureau Investigation*
FSS – *Forensic Science Service*
GEP-ISFG – *Grupo Español y Portugués de la ISFG*
GITAD – *Grupo Iberoamericano de Trabajo en Análisis de DNA*
GQ - garantia de qualidade
CNS – Conselho Nacional de Saúde
HW - *Hardy-Weinberg*
IC – Instituto de Criminalística de São Paulo
IMESC - Instituto de Medicina Social e Criminologia de São Paulo
Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Interpol – Polícia Internacional
IP - índice de paternidade
IPC - índice de paternidade cumulativo
ISFG - *International Society of Forensic Genetics*
ISFH - *International Society for Forensic Haemogenetics*
LCN-DNA - DNA com baixo número de cópias
LR - *likelihood ratio* ou razão de verossimilhança
MPL - sonda multilocal
mRNA – RNA mensageiro

mtDNA - DNA mitocondrial

NIST - *National Institute of Science and Technology*

NRC – *National Research Council*

PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase

PE - probabilidade de exclusão

PP - probabilidade de paternidade

RFLP - *restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

RT-PCR - PCR em tempo real

SBML - Sociedade Brasileira de Medicina Legal

SENASP/MJ - Secretaria Nacional de Segurança Pública - Ministério da Justiça

SGM - segunda geração de multiplex

SLP – sonda para locus único

SNP - *single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de nucleotídeo único

SSO - sondas específicas para seqüências oligonucleotídicas

SSP – Secretaria de Segurança Pública de São Paulo

STR - *short tandem repeats* ou repetições curtas consecutivas

SWGDAM – *Scientific Working Group DNA Analysis Methods*

VNTR - *variable number of tandem repeats* ou número variável de repetições consecutivas

Y-SNP – SNP presente no cromossomo Y

Y-STR – STR presente no cromossomo Y

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO 11

Capítulo I – EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

1. Histórico e considerações gerais	16
2. Medicina Forense e Genética	17
2.1. Principais sistemas sangüíneos eritrocitários	18
2.2. Sistema sangüíneo leucocitário	20
2.3. O uso do DNA na identificação humana	21
3. Vantagens do exame de DNA sobre os testes tradicionais	22
4. Análises de DNA coadjuvantes	24

Capítulo II – O DNA

1. Estrutura e função	26
2. Transmissão da informação genética	32
3. Regiões hipervariáveis	32
4. Tipos de polimorfismos	34
5. Métodos de detecção	35

Capítulo III – PROCEDIMENTOS TÉCNICOS PARA ANÁLISE DE DNA

1. Aspectos gerais	43
2. Coleta de materiais	44
2.1. Cadeia de custódia	53
2.2. Resolução SSP 194/99	55
2.2.1. A coleta de materiais e a Constituição Federal	59

2.2.2. Princípios éticos relacionados à coleta de materiais	61
3. Extração do DNA	62
4. Quantificação do DNA extraído	67
5. Amplificação do DNA	69
6. Formas de detecção do DNA amplificado	75
7. Significância e interpretação dos resultados	80
7.1. Frequência de genótipos e perfis na população	80
7.2. Frequências como probabilidade e razão de verossimilhança	85
7.3. Investigação de paternidade e identificação de cadáveres	89
8. Elaboração de laudo pericial ou relatório de análises	91
9. Controle de qualidade	101

Capítulo IV – O LABORATÓRIO DE DNA DO INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DE SÃO PAULO

1. Introdução	117
2. Análises realizadas	118
3. Projetos e pesquisas em andamento	126

Capítulo V – O EXAME DE DNA APLICADO AO PROCESSO PENAL E O SEU IMPACTO SOCIAL

1. A prova do DNA no sistema legal	129
2. A tipagem do DNA e a sociedade	140
CONCLUSÕES	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
GLOSSÁRIO	157
ANEXOS	161
ÍNDICE REMISSIVO	187

INTRODUÇÃO

A análise de DNA (ácido desoxirribonucléico) evoluiu no sentido de se tornar indispensável como parte da rotina para estudos de casos forenses, por empregar técnicas extremamente sensíveis. Com ela, suspeitos podem ser ligados a locais de crime ou um local de crime ser ligado a outro, através do estudo de pequenos vestígios biológicos oriundos, por exemplo, da saliva impregnada em tocos de cigarro, células da pele em volantes de automóveis ou pêlos e cabelos em roupas. Grandes bancos de DNA podem rapidamente indicar a combinação de perfis encontrados no cenário do crime, ou mesmo, pela combinação parcial, se aproximar de parentes do perpetrador. Casos de crimes sexuais considerados insolúveis¹ estão começando a ser resolvidos décadas após sua investigação pela análise de DNA degradado contido em *swabs*² ou lâminas de microscopia que foram guardados. Vítimas de desastre em massa como acidentes aéreos, atos de terrorismo e catástrofes naturais, onde a identificação física é impossível, podem ser identificadas sem qualquer dúvida em dias (JOBLING; GILL, 2004).

A proeminência adquirida por esta técnica pauta-se no desenvolvimento da Biologia Molecular e na estabilidade química e térmica do DNA que, mesmo após longo período de tempo - meses, e, às vezes, anos -, permite a obtenção de padrões genéticos indivíduo-específicos que podem ser comparados com aqueles da vítima ou suspeito em casos de infração penal.

As condições e disposição das diversas amostras biológicas no local dos fatos possibilitam reconstituir, com bastante exatidão e segurança, a dinâmica do evento criminal derivada da atividade pericial forense, no que se refere, às seguintes áreas:

¹ Autoridades de Nova York planejam revisar sistematicamente as evidências biológicas de centenas de crimes sexuais não solucionados com base em seus perfis de DNA, com a intenção de indiciar agressores não identificados antes de se esgotar o prazo de 10 anos imposto pelo estatuto de limitações, através do *John Doe Indictment Project* [projeto de indiciamento do João ninguém] (RASHBAUM, W. K., 2003).

² Chumaço de algodão, ou outro material absorvente, preso a uma extremidade adequadamente esterilizada de uma haste, e que se emprega ou para aplicação de medicamento, ou para coleta, por atrição, de material destinado a estudos. Por ainda não ser unânime nos dicionários de língua portuguesa consultados a adaptação deste termo para *suabe*, preferimos adotar sua grafia original na língua inglesa, forma consagrada entre os técnicos do meio forense [s. m. s. *swab*; pl. *swabs*].

- a. identificação de suspeitos em casos de crimes sexuais como estupro, atentado violento ao pudor e congêneres; investigação de paternidade nos casos de gravidez resultante de estupro;
- b. identificação de partes e órgãos de cadáveres mutilados, de cadáveres carbonizados e em decomposição ou já esqueletizados, inclusive para esclarecimento de outros crimes³;
- c. estabelecimento de relação entre suspeitos e locais de crimes, de um local de crime e outro e entre instrumento lesivo e vítima, por produção de perfis de DNA a partir de material biológico (sangue, esperma, pêlos, pele e outros) encontrado na cena do crime ou presente em objeto relacionado ao crime.

Deve-se ainda ressaltar, face aos exames tradicionais mormente limitados à análise sangüínea, a diversidade de materiais biológicos que podem ser utilizados na determinação do perfil genético além das amostras sangüíneas: esperma, saliva, urina, tecidos moles, pêlos e outros anexos dérmicos, dentes, ossos, secreções e outros fluidos relacionados a ocorrências criminais.

Assim disposto, entende-se que a genotipagem forense se presta, no núcleo principal de sua finalidade, a estabelecer os correspondentes vínculos genéticos entre amostras-questionadas, vestígios de origem biológica desconhecida, e amostras-referência, de origem biológica conhecida, concluindo-se pela determinação da origem individual de cada vestígio e, a partir desse ponto e mesmo coligado a outros meios de prova, eventualmente reconstruir parcial ou totalmente a dinâmica do ato infracional.

Ressalte-se ainda, a exemplo de outros países, a criação de banco de dados com perfis genéticos dos vestígios analisados e de criminosos condenados que vem contribuído na elucidação de delitos.

³ Neste sentido inclui-se a necessidade da prova de filiação nos casos de infanticídio (MUKAD, 2002).

Por estas razões, o emprego do exame de DNA como ferramenta auxiliar na elucidação de crimes e na identificação de pessoas é tema de grande repercussão na sociedade. Entretanto, por ser sobejamente empregado nas ações de investigação de paternidade, a divulgação maciça da eficácia deste exame pelos meios de comunicação acabou por lhe dar uma aura de infalibilidade, colocando em descrédito os métodos analíticos mais antigos. Enfocada pela mídia como técnica suprema, foram omitidas do grande público as limitações existentes quando aplicada à Criminalística e à Medicina Forense, bem como os custos e a complexidade dos processos técnicos exigidos para que sejam auferidos resultados confiáveis.

No intuito de diminuir a exacerbada exaltação desta técnica, faz-se mister o esclarecimento de sua real potencialidade como contribuinte para o estabelecimento da relação de causalidade nos crimes de resultado dolosos ou culposos. Além disto, em nosso meio acadêmico o tema necessita ser mais bem discutido de forma a possibilitar aos operadores do direito os conhecimentos técnico-científicos necessários para a correta interpretação dos resultados oferecidos pelos exames de DNA.

O tratamento da *aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes* poderia também ensejar estudos pormenorizados sobre os aspectos éticos e jurídicos pertinentes ao assunto. Sem desprezar esses e outros relevantes desdobramentos que o tema sugere, e que eventualmente poderão ser considerados no desenvolvimento do trabalho, o propósito central deste estudo é a abordagem de questões relacionadas a:

1. contribuição da Biologia Molecular no aperfeiçoamento dos testes de identificação humana;
2. regiões polimórficas do DNA mais adequadas às análises forenses;
3. cuidados na coleta e custódia de amostras forenses;
4. características do laudo pericial de exames de DNA;
5. controle de qualidade e garantia de qualidade das análises forenses de DNA;

6. caracterização da rotina laboratorial e dos procedimentos técnicos adotados pelo Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo e estimativa do êxito alcançado em suas análises;
7. custo fiscal e vantagens do emprego da análise de DNA no meio forense;
8. possíveis distorções na valoração do exame de DNA na investigação e na instrução criminal brasileiras, frente à complexidade da técnica;
9. medidas e ações que podem contribuir para a excelência dos exames de DNA;
10. preparação dos operadores de direito para o uso das informações contidas nas provas de DNA, bem como para o esclarecimento dos alcances e limitações desta técnica;
11. efetividade do papel do analista forense para a distribuição de justiça;
12. possibilidade de erros na elaboração de exames forenses de DNA e
13. aplicabilidade da análise de DNA no sistema legal.

Partindo destas preocupações, a exposição será iniciada com capítulo em que se pretende fazer uma revisão da aplicação dos conhecimentos da Genética na Medicina Forense e ressaltar o DNA como objeto de análise forense.

O capítulo seguinte será dedicado ao estudo da molécula de DNA, nela destacando regiões polimórficas características que permitem, na identificação humana, a individualização tal qual uma “impressão digital” genética.

Na seqüência, já no estudo dos procedimentos técnicos para análise de DNA, dar-se-á ênfase ao estudo metodológico da coleta de materiais biológicos que serão submetidos a exame, dos procedimentos empregados para a extração, quantificação e amplificação do DNA destas amostras, bem como dos protocolos utilizados para a análise comparativa dos perfis genéticos obtidos. Serão destacados ainda neste capítulo os cálculos estatísticos pertinentes à análise dos perfis genéticos, as peculiaridades do laudo pericial concernentes a este tipo de análise e a importância do controle de qualidade laboratorial.

O quarto capítulo cuidará da apresentação do trabalho pericial realizado no Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo e também da exposição de levantamento estatístico realizado sobre o sucesso das análises nele realizadas, no período compreendido entre janeiro de 2003 e agosto de 2004.

No último capítulo serão abordados os aspectos relevantes sobre a utilização das informações sobre o DNA na esfera judicial e suas repercussões na sociedade.

As conclusões constarão no encerramento da apresentação. Como o tema sugere, desde o início da pesquisa, estas não serão definitivas, pois a evolução tecnológica e científica nos impele a constante atualização.

Desta forma, o objetivo da pesquisa é o de contribuir, ainda que parcialmente, para que os aplicadores do Direito, em especial, do Direito Penal, tenham um referencial para responsabilização objetiva dos autores de crimes.

CAPÍTULO I

EVOLUÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

1. Histórico e considerações gerais

A evolução da genética forense foi conduzida pela análise das variações genéticas, começando há mais de um século com as descobertas de Karl Landsteiner sobre grupos de polimorfismos do sistema ABO no sangue humano e pela rápida compreensão que estas variações poderiam ser aplicáveis na resolução de crimes. Para que se possa melhor compreender os importantes passos deste desenvolvimento, é necessário retomar algumas notações dos primórdios da Genética.

Em 1865, Gregor Mendel comunicou à Sociedade de Brünn para o Estudo da Ciência, na antiga Tchecoslováquia, os resultados obtidos sobre seus experimentos com ervilhas. Tais estudos, iniciados em 1856 e terminados em 1864, foram intitulados “Experiências sobre Híbridos de Plantas” e estabeleciam regras previsíveis para o processo da hereditariedade.

Mendel concluiu que, durante o processo de reprodução, ocorria uma passagem de elementos físicos controladores de características hereditárias distintas dos genitores para a prole. Tais elementos foram, posteriormente, denominados genes.

Mendel demonstrou experimentalmente que a propagação dos caracteres genéticos está sujeita às leis gerais de segregação e recombinação independentes por meio de proporções estatísticas de mono e poliibridismo e que mais tarde, no início do século XX, foram limitadas pelas descobertas, principalmente atribuídas a Thomas Morgan, da ligação e da permuta intercromossômica, fenômenos conhecidos, respectivamente, por *linkage* e *crossing-over*, durante os processos de mitose e meiose.

As descobertas de Mendel não foram imediatamente reconhecidas, em parte por serem de difícil compreensão e em parte porque outro tema instigante ocupava a mente

de leigos e cientistas da época: a teoria da evolução biológica de Charles Darwin. Os trabalhos de Mendel foram então arquivados e esquecidos nas bibliotecas européias. Suas pesquisas só foram verdadeiramente reconhecidas em 1900, passando, a partir de então, ser considerado o “pai da Genética” (BROWN, 1999).

A definição de Genética como a ciência da hereditariedade e da variação foi proposta por Batelson em 1905. Porém, já em 1885, Weissman havia reconhecido a base física da Genética ao distinguir somatoplasma e germoplasma, classificando assim os diferentes tecidos que compõem o organismo daqueles relacionados com as células germinativas, óvulos e espermatozóides, que garantem a continuidade genética do indivíduo (CALABREZ, 1999).

Partindo destes pressupostos, em 1909, Johansen, ao distinguir fenótipo de genótipo, lançou os postulados básicos da Genética que acabaram por debelar a teoria de Jean Lamarck, baseada na herança dos caracteres adquiridos. Como fenótipo, Johansen incluiu o conjunto de características estruturais e fisiológicas que podem ser observadas em um indivíduo. Como genótipo, a configuração genética portadora da informação com capacidade de produzir variações no fenótipo em interações com os fatores ambientais.

Atualmente definida como um ramo da Biologia que estuda as leis da transmissão dos caracteres hereditários nos indivíduos, e as propriedades das partículas que asseguram essa transmissão, a Genética pode também ser sinteticamente entendida como o estudo do processo pelo qual as características individuais são passadas dos genitores para a prole, de modo que todos os seres vivos assemelham-se aos seus ancestrais (ALBANO, 2004).

2. Medicina Forense e Genética

A Medicina Forense e a Criminalística, conhecidas em alguns países como ciências forenses, são especialidades que têm como objetivo ajudar juízes e jurados a resolver questões legais não apenas na área criminal, como é o caso da Criminalística, mas também aquelas pertencentes à área cível. O campo de estudo destas disciplinas tem grande amplitude, abrangendo conhecimentos da biologia, química, física e matemática,

incluindo variadas disciplinas como botânica, balística, papiloscopia, documentoscopia e outras.

Entretanto, nos últimos vinte anos uma ferramenta particular da biologia tem revolucionado as investigações forenses – a análise de DNA. Como todos os seres vivos contêm DNA e todo DNA exibe variabilidade entre espécies diferentes e dentro de uma mesma espécie, qualquer material associado com um caso legal pode levar a informações sobre sua origem (JOBLING; GILL, 2004).

O processo de recombinação gênica proporciona um alto grau de variabilidade entre os organismos vivos. Cada indivíduo da espécie humana possui uma configuração genotípica única, com exceção de gêmeos monozigóticos que compartilham do mesmo genótipo.

Inúmeras características hereditárias humanas permitem aferir, até certo grau, esta individualidade genética, fato este de importância forense. Com efeito, a história da Medicina Forense possui estreita ligação com a descoberta dos antígenos eritrocitários determinantes dos vários sistemas de sanguíneos humanos, largamente utilizados na identificação genética dos indivíduos.

2.1. Principais sistemas sanguíneos eritrocitários

Em 1900, Landsteiner demonstrou que os seres humanos podiam ser agrupados conforme a capacidade de seus soros aglutinarem, ou não, as hemácias de seus semelhantes. Observou ainda que a aglutinação decorria da presença de anticorpos no soro, os quais reagem com antígenos correspondentes das hemácias. Verificou também que o soro de um indivíduo, normalmente, não continha os anticorpos correspondentes aos antígenos de suas próprias hemácias. Com este trabalho, que lhe valeu o prêmio Nobel trinta anos depois de sua publicação, Landsteiner não só iniciou os estudos para o emprego científico do sangue como agente terapêutico, mas também fomentou a Imunohematologia, cujas contribuições são inestimáveis à Medicina e à Genética Humana (BEIGUELMAN, 1972).

A possibilidade de identificar os antígenos das hemácias através dos testes de aglutinação permitiu que os sangues humanos pudessem ser classificados em grupos. Por outro lado, a análise da distribuição familiar dos diferentes grupos sanguíneos possibilitou interpretar a existência de numerosos antígenos nas hemácias, como decorrentes da ação de genes.

O sistema de antígenos eritrocitários conhecido como ABO possibilitou estudos iniciais de parentesco. Basicamente constituído por dois antígenos, esse sistema compõe os quatro grupos sanguíneos encontrados: A, B, AB e O. Em 1910, Von Dungern e Hirszfild demonstraram a utilidade do sistema ABO na determinação da paternidade com base na herança mendeliana (RACE; SANGER, 1968). Entretanto, apesar de sua utilização na determinação de parentesco, o sistema ABO não é suficientemente informativo, pois apresenta apenas uma probabilidade de inclusão de paternidade de 13% (SILVER, 1982).

Em 1927, Landsteiner e Levine descreveram o sistema MN, constituído por dois antígenos, M e N, e que determinam três genótipos MM, MN e NN. Entretanto, deuse, em 1939, outra grande contribuição para o estudo dos sistemas sanguíneos: a descoberta de Levine e Stetson da incompatibilidade materno-fetal causada por anticorpo imune, decorrente de antígeno eritrocitário fetal, reconhecido como fator Rhesus ou Rh por Landsteiner e Levine em 1940. A complexidade genética deste novo sistema foi desvendada por Fisher em 1943 (RACE; SANGER, 1968).

Após a segunda Guerra Mundial, com a introdução de testes antiglobulina - prova de *Coombs* - uma série de sistemas de grupos sanguíneos geneticamente independentes foi descoberta. Dentre eles, destacam-se os grupos sanguíneos Kell, Duffy e Kidd, também utilizados nos estudos de parentesco, apesar de serem pouco informativos na determinação (inclusão) de paternidade quando empregados individualmente. Entretanto, ganharam reconhecimento pelo valor de exclusão, pois, ao serem associados aos sistemas ABO, MN e Rh, tornam possível excluir aproximadamente 70% dos indivíduos acusados de paternidade (SILVER, 1982).

2.2. Sistema sangüíneo leucocitário

A demonstração da ocorrência de um sistema de histocompatibilidade, conhecido por complexo HLA (*histocompatibility leucocyte antigen*), em 1954, trouxe grandes préstimos à Medicina Forense e marcou uma segunda fase na evolução da Imunogenética.

O sistema HLA é um conjunto de genes co-dominantes, localizados no cromossomo 6 da espécie humana e que se expressam como moléculas de glicoproteínas na superfície das células, quando são conhecidas como antígenos leucocitários humanos (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999). Tais antígenos são descritos nas seguintes classes: HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (JOBIM et al., 1996).

A análise desses antígenos é realizada com anticorpos anti-HLA provenientes do soro humano e propicia a determinação da individualidade genética com acentuado poder de discriminação. Quando analisado individualmente, dependendo do número de anticorpos utilizados para a tipagem, a probabilidade de inclusão na identificação humana é de 90 a 95% (SILVER, 1982).

No século passado, até o início dos anos 80, a avaliação de vínculo familiar era pautada na análise dos antígenos do sistema HLA ou por conjuntos de proteínas polimórficas (haptoglobinas, fator C do complemento e enzimas polimórficas como a fosfatase ácida, a esterase D e a fosfoglucomutase - PGM) e sistemas antígenos eritrocitários que, quando associados, propiciavam grande probabilidade de inclusão de parentesco. Entretanto, mesmo assim, para alguns casos, eram limitados, tornando-os inconclusivos.

Os avanços da Biologia Molecular favoreceram o aperfeiçoamento e o desenvolvimento dos testes de identificação. Com o surgimento de técnicas moleculares para avaliação das características genéticas dos indivíduos através do DNA, os testes tradicionais foram sendo sistematicamente substituídos, dando-se assim o início da terceira e talvez a mais significativa fase do desenvolvimento da Medicina Forense.

2.3. O uso do DNA na identificação humana

A revolução do DNA, do qual trataremos detalhadamente no próximo capítulo, começou em 1984, com a descoberta, por Alec Jeffreys, em Leicester - Reino Unido, de *loci* hipervariáveis conhecidos por minissatélites (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985a)⁴ e que produziam uma espécie de “impressões digitais” de DNA (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985b).

A aplicabilidade potencial da tipagem de DNA em amostras forenses foi demonstrada por laboratórios do Reino Unido, Estados Unidos e Canadá, em meados da década de 1980. Esse trabalho demonstrou que o DNA estava presente nas amostras forenses em quantidade suficiente para ser testado (NRC, 1992). A tabela abaixo inserida ilustra a quantidade de DNA presentes nestas amostras.

TABELA 1 – Conteúdo de DNA nas amostras biológicas (NRC, 1992).

Tipo de amostra	Quantidade de DNA*
Sangue	20.000 – 40.000 ng/mL
mancha com 1 cm ² de área	cerca de 200 ng
mancha com 1 mm ² de área	cerca de 2 ng
Sêmen	150.000 – 300.000 ng/mL
esfregaço vaginal pós-coital	0 – 3.000 ng
Cabelo	
arrancado	1 – 750 ng/fio
desprendido	1 – 12 ng/fio
Saliva	1.000 – 10.000 ng/mL
Urina	1 – 20 ng/mL

*A quantidade de DNA é fornecida em nanogramas (ng); 1 ng = um bilionésimo de grama (10⁻⁹g).

A tipagem molecular de material genético foi utilizada oficialmente pela primeira vez, em 1985, para a resolução de um problema de imigração (JEFFREYS; BROOKFIELD; SEMEONOFF, 1985). Um ano após, Jeffreys também empregou esta técnica para identificar o verdadeiro estuprador e assassino de duas vítimas. A partir deste caso, que ficou conhecido como Enderby (Queen v. Pitchfork), a Criminalística e a Medicina Forense têm empregado a técnica de tipagem molecular de DNA como potente

⁴ Descreve a descoberta de hipervariáveis de DNA e um método de detecção que é sensível o suficiente para permitir análise de pequenas quantidades de DNA que podem ser encontradas em estudos de casos forenses.

arma no esclarecimento de diversos delitos e na identificação humana (MOURA-NETO, 1998).

3. Vantagens do exame de DNA sobre os testes tradicionais

No aspecto forense, a caracterização do material biológico tem por objetivo limitar ou reduzir o número de indivíduos que poderiam ser a fonte do material. A população sob suspeita algumas vezes é limitada ou muito próxima, permitindo assim a resolução, mesmo com marcadores genéticos de baixo poder discriminatório. Contudo, nos casos em que a população não é limitada pelas circunstâncias do caso, os métodos de maior poder discriminatório tornam-se recursos importantes. A sorologia convencional (sistemas ABO, Rh, MN, PGM, HLA, entre outros) pode rotineiramente gerar números de apenas um em dois ou um em alguns milhares. Com o estudo do DNA, o poder discriminatório pode atingir o limite necessário para inferir a identificação (KIRBY, 1990).

Várias vantagens do DNA sobre a sorologia tradicional foram descritas por Weedn; Swarnen (1998). A primeira e principal delas reside na possibilidade de sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico. Uma ampla variedade de líquidos corporais pode ser encontrada nos exames de vestígios. Todavia, um exame sorológico completo pode ser realizado apenas em sangue e não em outros tecidos ou líquidos corporais. Porém, com estudos de DNA, pequena quantidade qualquer material biológico, incluindo sangue, cabelos, saliva sêmen, tecido, urina ou qualquer outro fluido biológico, pode ser analisada para associar um suspeito ao crime.

A segunda e mais amplamente propalada vantagem do exame de DNA é seu potencial discriminatório. Em alguns casos, os estudos de DNA podem revelar a identificação positiva, comparativamente aos exames envolvendo o grupo sanguíneo ABO, que tem a capacidade de discriminar aproximadamente um em três indivíduos na população geral, e, mesmo com marcadores sorológicos adicionais, os valores típicos são de um em alguns milhares, enquanto que com o DNA, os valores podem chegar a um em alguns bilhões ou mais.

A sensibilidade do exame de DNA constitui a terceira grande vantagem deste método. A tipagem do polimorfismo do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), que estudaremos mais adiante, pode ser efetuada com o DNA de algumas poucas células, de longe superando a sensibilidade dos exames tradicionais.

A quarta vantagem do DNA é sua resistência aos fatores ambientais. O DNA é uma molécula robusta, relativamente resistente a ácidos, álcalis e detergentes, diferentemente dos determinantes protéicos, lipídicos e carboidratos. As proteínas podem ser desnaturadas de forma relativamente mais fácil e sua estrutura terciária conformacional, que é importante na tipagem sanguínea, é facilmente desnaturável. A informação da tipagem do DNA, por sua vez, é encontrada na seqüência nucleotídica, que independe da conformação da molécula. Conseqüentemente, os exames com DNA, diferentemente dos marcadores sorológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e que estiveram expostas a maiores agressões ambientais.

Finalmente, a quinta vantagem do DNA reside na possibilidade de se separar o DNA da célula espermática de qualquer outro DNA celular. Um dos problemas históricos nos estudos de vestígios de violência sexual é a presença, quase que exclusivamente, de uma mistura de sêmen e outro líquido corporal, o que representa um problema sério para os exames sorológicos tradicionais de tipagem, pois em aproximadamente dois terços dos casos, não há possibilidade de se identificar o sêmen do doador pelo fato de a mistura dos fluidos biológicos resultar em uma mistura de tipos sorológicos (DAVIES, 1982). Todavia, o DNA do espermatozoide pode ser separado do DNA não-espermático por lise diferencial de membranas, o que permite a individualização da fonte do sêmen, sem que se confunda com os dados do não-sêmen contidos no vestígio. Nestes estudos, bem como nos relativos a outros tipos de crimes, é de fundamental importância a utilização do sistema amelogenina que propicia a determinação do sexo da pessoa que deu origem à amostra que está sendo analisada (AKANE et al, 1991).

As vantagens acima enumeradas fizeram robustecer o emprego da tipagem do DNA nas análises forenses. A partir dela, no decorrer de quase vinte anos de seu emprego, novas áreas de estudo foram abertas para complementar o rol das ferramentas empregadas na elucidação de crimes, como veremos a seguir.

4. Análises de DNA coadjuvantes

Quando um perfil genético oriundo de uma cena de crime não encontra combinação com as amostras-referência ou com as contidas em um banco de dados, qualquer informação que possa ser deduzida deste DNA sobre seu doador será útil. Um item básico é a informação sobre o sexo do doador. Contudo, duas novas áreas – população de origem e características fenotípicas – têm sido investigadas e utilizadas para ajudar as investigações criminais.

Grandes variações genéticas são encontradas nas populações humanas. No entanto, indivíduos de diferentes populações são, na média, ligeiramente mais diferentes entre si do que indivíduos da mesma população, permitindo, assim, que conjuntos de marcadores genéticos sejam usados para predizer a população de origem e isto pode ser aplicado para analisar amostras oriundas de locais de crime (BAMSHAD et al., 2004).

Uma forte predição da população de origem pode indicar alguns aspectos fenotípicos, dentre os quais a cor da pele. Contudo, testes genéticos diretos podem ser mais úteis. Muitos fenótipos humanos, por exemplo, estatura, características faciais e pigmentação, têm um forte componente genético. Entretanto, apenas investigações sobre a pigmentação têm sido levadas a sério, apesar da possibilidade de mutação que podem levar ao albinismo. Nesta área, o gene que tem sido mais estudado é o MC1R (*melanocortin 1 receptor*), ligado à produção de melanócitos. Testes com este gene têm sido úteis como ferramentas de investigação em população como a do Reino Unido, onde pessoas ruivas são encontradas em apreciáveis frequências. Outros genes relacionados com a pigmentação vêm sendo testados com menos sucesso, como é o caso dos relacionados com a cor dos olhos. Contudo, a complexidade da herança quantitativa associada a estes genes e o conjunto de variações introduzidas por diferenças ambientais e nutricionais que podem influenciar na expressão gênica fazem com que estes testes não sejam determinativos (JOBLING; GILL, 2004).

Uma outra série de estudos genéticos sobre espécies não humanas é alvo de interesse da investigação forense. Análise de DNA tem sido usada quando material animal (usualmente pêlos) é encontrado em cenas de crime e em investigações sobre comércio ilegal de espécies. Materiais vegetais podem também estar associados com o cenário dos

fatos e proporcionar informações vitais para a investigação criminal, como também em disputas cíveis que versem sobre a identificação da origem de valiosas espécies cultivadas comercialmente ou ilegalmente, como é o caso da *Cannabis sativa*. Microrganismos podem ser fontes de evidência em contaminação de gêneros alimentícios em casos de negligência médica envolvendo infecções, bem como em situações de deliberada contaminação, como foi o caso de inalação de antraz que levou pelo menos cinco pessoas à morte nos Estados Unidos em 2001. Nestes casos, o objetivo do analista forense é o de demonstrar a origem do material não humano e para isto a análise de DNA tem lugar de destaque (JOBILING; GILL, 2004).

CAPÍTULO II

O DNA

1. Estrutura e função

Os ácidos nucleicos foram descobertos, em 1869, por Friedrich Miescher, um médico suíço de 22 anos de idade. Através de técnicas, notavelmente avançadas para a época, Miescher isolou, dos núcleos de células de pus e de espermatozoides de salmão, uma macromolécula, nunca antes identificada, à qual deu o nome de nucleína, posteriormente denominada ácido nucleico. Anos após a descoberta de Miescher, o bioquímico Kossel evidenciou a existência de dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico (ADN ou DNA) e o ácido ribonucleico (ARN ou RNA) (GRIFFITHS et al., 2000).

No início do século XX, biólogos reconheceram que os genes estão nos cromossomos, até então conhecidos como estruturas filiformes do núcleo da célula eucariótica e que se tornam visíveis no começo da divisão celular.

Mais tarde, quando a análise bioquímica se tornou possível, notou-se que os cromossomos são basicamente constituídos de DNA e proteínas. Como se imaginava que o DNA era uma molécula de relativa simplicidade molecular, primeiro se acreditou que os genes eram compostos de proteínas por terem esta maior diversidade química. Entretanto, apesar de sua simplicidade, a estrutura e as propriedades químicas do DNA fizeram-no a matéria-prima ideal para os genes.

Os genes de cada célula são feitos de DNA e a compreensão da relação entre DNA e genes⁵ veio de experimentos feitos com larga variedade de organismos. A primeira forte evidência de que os genes são constituídos de DNA veio em 1944, quando se demonstrou que, ao se adicionar DNA purificado em uma bactéria, ele modificava suas propriedades e estas mudanças eram passadas para as gerações bacterianas subsequentes. Hoje, o fato de o DNA ser considerado o material genético é tão fundamental ao

⁵ Desde a descoberta do DNA por Friedrich Miescher, em 1869, muito tempo se passou até que suas funções primordiais de conter e transmitir a informação genética fossem sugeridas, em 1944, por Avery, MacLeod e McCarty e, definitivamente comprovadas, em 1953, por Hershey (SCHRANK, 1996).

pensamento biológico que é difícil conceber a enorme lacuna intelectual que esta descoberta preencheu (ALBERTS et al., 1998).

No começo dos anos 50 do século passado, o DNA foi examinado pela primeira vez por difração de raios X, uma técnica para determinação da estrutura atômica tridimensional de uma molécula. Os primeiros resultados indicavam que o DNA era composto por duas fitas compondo uma hélice.

A observação que o DNA era uma dupla fita foi de importância crucial para a proposição, em 1953, de um modelo correto para a estrutura de DNA. Somente quando o modelo da estrutura do DNA de Watson-Crick foi proposto⁶, seu potencial para replicação e informação codificada tornou-se aparente.

A molécula de DNA consiste em duas longas cadeias longas de polinucleotídeos compostos por quatro tipos de nucleotídeos. Cada uma destas cadeias é conhecida como uma fita de DNA. As duas cadeias estão unidas por pontes de hidrogênio entre as bases de cada nucleotídeo.

Os nucleotídeos são compostos por um açúcar de cinco carbonos, uma pentose, denominado desoxirribose (2'dexosi-D-ribose); uma base nitrogenada (heterocíclica) ligada ao carbono 1' da pentose; e um até três grupos fosfato (PO_4^-), ligados ao carbono 5' da pentose. As bases nitrogenadas podem ser purinas, adenina (A) e guanina (G) ou pirimidinas, citosina (C) e timina (T). As bases se ligam ao carbono 1' da pentose através de uma ligação glicosídica β . Estas letras (A, C, G e T) são também utilizadas os quatro diferentes nucleotídeos, isto é, as bases ligadas aos grupos açúcar e fosfato.

O modo pelo qual os nucleotídeos estão ligados dá à fita de DNA uma polaridade química. Se imaginarmos que cada nucleotídeo tem um botão (o fosfato) e um cavado (veja Figura 1), em cada fita completa, formada pelo conjunto botão e cavado, ter-

⁶ A competição pela descoberta da estrutura do DNA, repleta de emoções e intrigas, envolveu três grupos de cientistas: a) Watson e Crick, *les enfants terribles*, do Laboratório Cavendish, em Cambridge; b) Wilkins e Rosalind, do King's College, em Londres; e c) Linus Pauling, considerado à época como o maior químico do mundo, da CalTech, na Califórnia. Wilkins e Rosalind descobriram o modelo espacial e formularam a estrutura helicoidal do DNA, em 1953, mas apenas Watson e Crick foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, nove anos depois por esta descoberta (ALBANO, 2004; OLIVEIRA, 2004).

se-á, em todas as subunidades, uma linha com a mesma orientação. Além disto, os dois finais de cada fita poderão ser facilmente distinguidos, um como botão e o outro como cavado. A polaridade na fita de DNA é indicada pelas referências 3' para uma extremidade e 5' para a outra. Esta convenção é baseada em detalhes da ligação química entre os nucleotídeos.

Figura 1 - DNA e sua construção em blocos. O DNA é feito de quatro tipos de nucleotídeos que são ligados covalentemente. A molécula de DNA é composta por duas fitas de polinucleotídeos unidas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases. (adaptado de ALBERTS et al., 1998).

As duas fitas de polinucleotídeos no DNA de dupla-hélice estão ligadas por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas das diferentes fitas. Todas as bases estão,

portanto, dentro da hélice, e a cadeia de açúcar e fosfato, do lado externo. Contudo, estas bases não se pareiam aleatoriamente: A sempre se pareia com T e G com C, qual seja, uma base pirimidina sempre se pareia com uma base purina, conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2 - Complementaridade das bases na dupla-hélice de DNA. A forma e a estrutura química das bases permitem formar pontes de hidrogênio somente entre A e T e entre C e G. Duas pontes de hidrogênio são formadas entre A e T, e três entre G e C. As bases podem se parear somente se as duas fitas de polinucleotídeos forem antiparalelas (adaptado de ALBERTS et al., 1998).

Esta complementaridade de pareamento permite que o par de bases tenha um arranjo favorável no interior da dupla-hélice. Neste arranjo, cada par de bases possui uma largura similar e isto mantém a cadeia de açúcar e fosfato em igual distância ao longo da molécula de DNA. Além disto, as duas cadeias de açúcar e fosfato se espiralam, de modo a formar a dupla-hélice, conforme ilustra a Figura 3.

Figura 3 – A dupla-hélice de DNA. (A) – Modelo da dupla-hélice. O espiralamento das duas fitas cria duas cavidades na dupla-hélice. Conforme indica a figura, a mais larga é chamada de cavidade maior e a outra de cavidade menor. (B) – Curto fragmento da dupla-hélice mostrando quatro pares de bases. Os nucleotídeos estão unidos por ligações covalentes entre o grupo 3' – hidroxila (-OH) de um açúcar e o grupo 5' – fosfato (P). Assim, cada fita de polinucleotídeos tem polaridade química, isto é, suas duas extremidades são quimicamente diferentes. A extremidade 3' contém o grupo -OH ligado à posição 3' da pentose; a extremidade 5' contém um grupo fosfato livre ligado à posição 5' da pentose. (adaptado de ALBERTS et al., 1998).

Outras forças atuantes são também responsáveis pela estabilidade da dupla-hélice. Elas devem ser fortes suficientemente para manter a integridade da molécula, entretanto devem também permitir certa flexibilidade na conformação da molécula, essencial para suas atividades. Forças atuantes mais fracas, como o efeito hidrofóbico e forças de *Van der Waals*, estabilizam o pareamento. Cargas negativas das cadeias de açúcar e fosfato interagem com cátions em solução, o que neutraliza a repulsão entre as cadeias e contribui para a estabilidade da dupla-hélice (SCHRANK, 1996).

Os elementos de cada par de bases podem somente se ajustar na dupla-hélice se cada fita da hélice for antiparalela, isto é, somente se a polaridade de uma fita estiver orientada em oposição à outra fita. A consequência disto é que cada fita da molécula de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente complementar à sequência da outra fita. Isto é de importância crucial para a replicação do DNA.

Nos animais, o DNA é encontrado abundantemente no núcleo das células compondo os cromossomos, mas também é encontrado nas mitocôndrias. As mitocôndrias são corpúsculos esféricos ou em forma de bastonetes, relacionados com a respiração celular, que aparecem imersos no citoplasma. São encontradas em todas as células de organismos eucariotos aeróbios. A quantidade de mitocôndrias por célula varia em função de suas necessidades energéticas, sendo que uma única célula pode chegar a possuir mais de 5.000 cópias desta organela (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999). As mitocôndrias são formadas pela divisão de outras preexistentes. O processo acontece graças à existência de DNA em seu interior. Este DNA é circular⁷ com regiões codificantes e uma região hipervariável denominada controladora ou alça-D.

A quantidade de material genético não é uniforme nos diferentes órgãos e tecidos, existindo uma variação da quantidade de DNA neles. A tabela abaixo inserida ilustra esta variação.

TABELA 2 – Quantidade de DNA encontrada em diferentes órgãos e tecidos, segundo estudos de Kobilinski (1992).

Fonte	Quantidade aproximada de DNA
Líquido amniótico	65 ng/mL (1×10^4 cel/mL na 16ª semana de gestação)
Sangue (mamíferos)	30 a 60 µg/mL ($1 \mu\text{g} = 4 \times 10^3$ a 11×10^3 células, equivalendo uma célula íntegra a 6,6 pg de DNA)
Raiz de cabelo	250 ng/raiz de cabelo arrancado
Fígado	15 µg/mg
Músculo	3 µg/mg
Pele	15 µg/mg
Esperma	3,3 pg/cel
Célula diplóide humana	5 a 6 pg
Sêmen	480 µg/mL

⁷ A teoria endossimbionte, proposta por Lynn Margulis, em 1981, defende a idéia de que os eucariotos teriam surgido de eventos de endossimbiose entre uma célula hospedeira e células procarióticas, que deram origem às mitocôndrias e aos cloroplastos. Esta teoria, que durante anos foi rejeitada, atualmente é largamente aceita, pois várias evidências a apóiam, como: as organelas possuem genoma próprio, as proteínas nelas presentes serem mais semelhantes aos seus análogos procarióticos do que aos eucarióticos, serem semi-independentes, com capacidade de replicação, possuírem membrana dupla (membrana interna de origem procariótica, membrana externa de origem eucariótica) e o DNA das mitocôndrias ser circular, como o das bactérias (COLLUCCI, 2002).

2. Transmissão da informação genética

A transmissão da informação genética pauta-se nos trabalhos de Gregor Mendel que resultaram em leis fundamentais para a Genética atual (MCKUSICK, 1992). O enunciado da primeira lei de Mendel pode ser assim apresentado: "Cada caráter é determinado por 'fatores' (genes) que se separam na formação dos gametas, indo um 'fator' do par para cada gameta".

A segunda lei de Mendel é a da segregação independente, onde os dois membros de um par de genes, os alelos, jamais são encontrados no mesmo gameta, pois se segregam e se distribuem para gametas diferentes, independentemente um do outro. Assim, por este princípio, quando dois genes pertencentes a duas regiões diferentes do genoma são analisados, por exemplo para a identificação humana, a herança de cada uma das regiões são independentes, ou seja, cada alelo é herdado de uma região sem ter relacionamento algum com outro alelo herdado de uma segunda região, situada em qualquer lugar, no mesmo ou em diferentes cromossomos (GRIFFITHS et al., 2000).

Se dois ou mais eventos são independentes, a chance de que eles ocorram ao mesmo tempo é o produto de suas probabilidades separadas. Esta regra de herança mendeliana denomina-se "regra do produto ou regra da multiplicação", universalmente utilizada para avaliar estatisticamente se existe vínculo genético familiar (NRC, 1992).

Trataremos, com maiores detalhes, do emprego da regra da multiplicação ao abordar, mais adiante, os cálculos estatísticos utilizados na determinação da existência de vínculos genéticos.

3. Regiões hipervariáveis

Os genomas dos eucariotos apresentam, na sua organização gênica, alguns aspectos comuns: eventuais interrupções na sequência de genes individuais; existência de múltiplas e, às vezes, idênticas cópias de algumas sequências particulares e existência de grandes porções do genoma sem nenhuma função codificante ou regulatória aparente.

Tanto entre eucariotos como entre procariotos, o tamanho do genoma varia de espécie para espécie. Por isso, a quantidade total de DNA presente no genoma (haplóide) é uma grandeza característica de cada espécie vivente. Essa grandeza, expressa em pares de bases (pb), é chamada de valor C. Para procariotos, os valores de C variam entre 5×10^5 e 10^7 pb, enquanto, para eucariotos, esses valores variam dentro de limites muito mais amplos: desde 10^7 até 10^{11} pb (FERREIRA, 1996).

Nota-se na natureza que, em geral, para o aumento da complexidade, um aumento no tamanho do genoma. Esta relação, entretanto, fica obscura em muitos casos, especialmente na medida em que se avança na escala evolutiva. É o caso de organismos muito relacionados, como, por exemplo, anfíbios, pertencentes a uma mesma classe, que podem ter variações de até 100 vezes no tamanho dos seus genomas, enquanto organismos tão distantes evolutivamente como insetos e mamíferos ou crustáceos e répteis podem ter genomas com tamanhos similares. Esta impossibilidade de correlacionar o tamanho do genoma diretamente com a complexidade das características morfológicas do organismo foi chamado de paradoxo do valor C.

O paradoxo do valor C é uma consequência direta de um fato observado em todos os genomas eucarióticos até agora analisados: há um aparente excesso de DNA em relação à quantidade estimada como necessária para conter todos os seus genes. Disto infere-se que a maior parte do genoma de um eucarioto não é funcional, ou tem outras funções que não a de codificar proteínas ou de participar na regulação direta desse processo (FERREIRA, 1996).

Estudos sobre a cinética de renaturação de seqüências complementares de DNA possibilitaram a identificação de diferentes classes de seqüências presentes nos genomas dos eucarióticos: DNA não repetitivo; DNA moderadamente repetitivo e DNA altamente repetitivo (BROWN, 1999).

A grande maioria dos genes estruturais faz parte do DNA não repetitivo, incluindo-se nesta classe os genes que codificam proteínas. Já as seqüências repetitivas não são codificantes e suas funções, se existentes, não estão esclarecidas. No DNA repetitivo são encontradas seqüências com repetição em tandem que podem determinar regiões hipervariáveis classificáveis por polimorfismos (FERREIRA, 1996).

4. Tipos de polimorfismo

Os polimorfismos das regiões hipervariáveis do DNA podem ser agrupados em dois tipos: polimorfismos de comprimento e polimorfismos de sequência

Os polimorfismos de sequência são compostos de diferentes nucleotídeos em uma determinada localização do genoma. Estas variações em sequência podem ser manifestadas como regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases, mas a maioria dos polimorfismos de sequência são meras mutações pontuais (WEEDN; SWARNEN, 1998), como veremos ao estudar o sequenciamento do DNA mitocondrial e os SNPs – (*single nucleotid polymorphism*) polimorfismo de nucleotídeo único.

Já os polimorfismos de comprimento são sequências de nucleotídeos que se repetem, sendo denominadas VNTRs (*variable number of tandem repeats*) ou número variável de repetições consecutivas.

As regiões com repetições da sequência básica maiores que 8 pares de bases (pb) foram denominadas de minissatélites ou regiões com repetições em tandem longas (LTRs). Aquelas com repetições da sequência básica de aproximadamente 2 a 8 pb são denominadas de regiões microssatélites ou STRs (*short tandem repeats*) (BROWN, 1999; JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999).

Os minissatélites são formados por sequências de vários nucleotídeos, por exemplo, (ATGCGAGCTACTGAGCC)_n, repetidas em números diferentes em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única. Um locus de minissatélite pode ter muitos alelos em função do número de vezes (n) em que esta estrutura é repetida ao longo do DNA, deixando a população polimórfica em relação ao locus (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985a).

Os *loci* de microssatélites (STRs) ou repetições curtas consecutivas se assemelham aos minissatélites, porém com estrutura repetida menor, como, por exemplo, na sequência (GATA)_n (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999; NRC, 1992). O número de

repetições básicas nos minissatélites e microssatélites pode variar em diferentes indivíduos criando um polimorfismo de comprimento (WEEDN; SWARNEN, 1998).

O polimorfismo dos mini e microssatélites é traduzido pela possibilidade de se ter diversos alelos na população. Como consequência desta possibilidade, os achados de similaridades entre duas pessoas podem ter significância para o estabelecimento de uma relação de parentesco entre elas.

As frequências dos alelos são também importantes para a individualização, uma vez que um alelo do qual a maior parte da população é portadora não se presta à diferenciação de indivíduos. Para cada locus polimórfico existem diversos alelos, porém cada indivíduo poderá ter no máximo dois deles, herdados de cada um dos pais. É importante ainda ressaltar que nem todos os *loci* de mini e microssatélites podem ser utilizados nos estudos forenses, sendo os melhores aqueles que se apresentam com maior polimorfismo e mais alto grau de heterozigosidade (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999).

5. Métodos de detecção

O primeiro método de detecção de regiões polimórficas do DNA denomina-se RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição. Nas análises clássicas de RFLP, fragmentos de DNA contendo VNTRs (minissatélites) são cortados do DNA cromossômico por enzimas de restrição. Um determinado comprimento de fragmento é conhecido como alelo. Assim, são analisados os fragmentos de corte (restrição) do DNA que diferem (são polimórficos) em tamanho (comprimento) entre os indivíduos (WEEDN; SWARNEN, 1998).

O desenvolvimento de sondas de DNA para os *loci* VNTR foi a chave para a aplicação das análises de RFLP na Medicina Forense. A sonda original de Jeffreys; Wilson; Thein (1985a, 1985b), que originou o termo “padrão de impressões digitais de DNA” (*fingerprint of DNA*), é uma sonda multilocal (MLP). Uma sonda multilocal liga-se a várias seqüências de DNA e produz inúmeras bandas. A auto-radiografia resultante destas bandas assemelha-se a um código de barras comercial de difícil interpretação. Posteriormente, foram desenvolvidas sondas para *loci* únicos (SLP) que se ligam a um

único locus do DNA. Os sistemas de SLP passaram então a ser adotados para identificação humana, devido à alta sensibilidade do método e à maior facilidade de interpretação dos resultados. (THOMPSON; KRANE, 2003).

As sondas SLP são elaboradas de modo a se ligarem a uma localização-alvo em cada conjunto cromossômico. Estas sondas são tipicamente específicas para humanos ou primatas. Os fragmentos de DNA ligados à sonda variam em tamanho e, portanto, são visualizados como bandas que variam em posição em uma auto-radiografia. Geralmente são geradas duas bandas para cada sonda de locus único, correspondendo aos alelos maternos e paternos, a menos que estes sejam compartilhados (WEEDN; SWARNEN, 1998).

Após a extração e quantificação do DNA retirados das amostras biológicas em estudo, as análises de RFLP compreendem seis passos: (1) digestão, (2) eletroforese, (3) *southern blotting*, (4) desnaturação e hibridização, (5) auto-radiografia e (6) análise dos dados obtidos (NRC, 1992, 1996).

Em relação a estas sondas, atualmente, somente as SLP são empregadas e, na grande maioria das vezes, apenas em testes de determinação de paternidade e por pouquíssimos laboratórios. Esta técnica possui grande poder discriminatório na individualização de pessoas, discriminando um indivíduo entre muitos milhões ou mesmo entre alguns bilhões, apenas com a análise de quatro diferentes *loci* (THOMPSON; KRANE, 2003). Entretanto, é laboriosa, complexa e morosa, podendo uma análise demandar de quatro a seis semanas, além de exigir DNA íntegro e em grande quantidade para sua aplicação. Por esta última razão, o uso de sondas, ainda que SLP, não é recomendado para análises voltadas à elucidação de crimes, devido à escassez e, mormente, ao estado de degradação das amostras.

A partir de 1990, novos métodos de análise de DNA foram introduzidos e, praticamente, relegaram os testes por RFLP ao esquecimento por serem capazes de produzir resultados em curto espaço de tempo (um ou dois dias) e por serem mais sensíveis, isto é, ter capacidade de tipificar o DNA de pequenas amostras degradadas. Estes novos testes usam um procedimento baseado na PCR, o qual pode produzir bilhões de cópias de fragmentos de DNA de um ou mais *loci*. Os fragmentos do DNA amplificado

pela PCR são chamados *amplicons* e podem ser tipificados usando-se diferentes métodos que incluem os sistemas *dotblot*, AmpFLPs (polimorfismos do comprimento amplificado do fragmento de DNA), STRs (repetições tandem curtas) e seqüenciamento direto do DNA mitocondrial (mtDNA).

A PCR foi descrita pela primeira vez em 1985, por Kary Mullis que, em 1993, recebeu o prêmio Nobel em química por seu feito. Desde o início, a PCR foi reconhecida como a melhor resposta em potencial para quantidade traço de líquido biológico freqüentemente encontrado na área forense (veja Tabela 1). Amiúde, estas amostras são diminutas para serem utilizadas com os métodos de RFLP (JEFFREYS et al, 1988).

As tecnologias da PCR são principalmente insensíveis à degradação, uma vez que os *loci* de DNA-alvo são pequenos e apenas algumas poucas cópias da seqüência-alvo precisam estar intactas na amostra de DNA antes da amplificação. As análises por RFLP, ao contrário, são extremamente sensíveis à degradação uma vez que a fragmentação do DNA atinge exatamente o cerne do método analítico (WEEDN; SWARNEN, 1998). A PCR além de propiciar uma tipagem rápida do DNA, elimina a necessidade de utilização de *southern blot* e radioisótopos, permitindo assim a automação.

A tecnologia da PCR é muito poderosa, mas tem suas desvantagens. Como um todo, os sistemas genéticos analisados por PCR são menos discriminatórios (informativos) que os sistemas genéticos RFLP. Contudo, o poder discriminatório é aceitável tendendo a aumentar com sistemas adicionais (COMEY, 1988).

Segundo Erlich (1989), a suscetibilidade à inibição por vários fatores como a porção heme do sangue é uma outra desvantagem da PCR.

A amplificação preferencial de um alelo sobre o outro pode ocorrer e resultar em exclusão alélica. Os alelos de maior peso molecular não são detectados se o DNA amostrado estiver extremamente degradado, tal qual ocorre em RFLP (WEEDN; SWARNEN, 1998).

Na PCR, iniciadores específicos podem ser mais eficientes com um alelo do que com outro, gerando um aumento na produção do alelo favorecido. A extrema sensibilidade do sistema PCR resulta em um potencial de contaminação cruzada e, por esta razão, devem ser tomadas as precauções adequadas (COMEY, 1988; REBOUÇAS, 2004).

Como dito anteriormente, a análise dos produtos de amplificação da PCR inclui diversos métodos, os quais passarão a ser analisados.

Dotblot constitui o protótipo das técnicas de detecção do polimorfismo de sequência. Em 1991, a Perkin-Elmer, uma empresa de biotecnologia hoje denominada Applied Biosystems, desenvolveu um teste em forma de *kit* para amplificação e tipagem de polimorfismo de sequência, conhecido como *DQ-alpha gene*, com seis marcadores genéticos. Em 1993, a mesma empresa lançou no mercado um novo *kit* denominado *Polimarker/DQ-alpha test* com onze marcadores genéticos. Apesar da praticidade e da alta sensibilidade destes *kits*, isto é, necessitar de poucas células humanas para a obtenção de resultados, o poder discriminatório é inferior ao das análises de RFLP.

A tipagem *dotblot* envolve uma série de sondas de DNA para a detecção das sequências-alvo. As sondas são específicas para as sequências oligonucleotídicas (SSO), também denominadas oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO). Nos formatos *dotblot* tradicionais, uma porção do DNA amplificado é ligado a uma membrana e “sondado” com uma sonda SSO e as sondas não ligadas são eliminadas por lavagem. Um resultado positivo é visualizado por uma reação de cor com a enzima ligada à sonda. Os *kits* comerciais utilizam um *dotblot* reverso no qual a sonda é ligada à membrana e então é adicionada a amostra de DNA amplificado. Os resultados são visualmente determinados como positivos ou negativos para a presença de uma dada sequência; assim, o padrão de mancha (*spots*) azuis em uma tira indica um genótipo específico. HLA-DQA1 e Amplitipo-PM (polimarcador) são sistemas de *dotblot* reverso utilizados na ciência forense e, usados em combinação, têm um poder discriminatório aproximado de 1 em 2000 (WEEDN; SWARNEN, 1998).

As análises de AmpFLP envolvem a separação eletroforética por tamanho dos fragmentos polimórficos do DNA, produzidos por amplificação, ao invés de excisão como ocorre nas análises RFLP. Os *loci* VNTR usados para análises AmpFLP são

necessariamente menores que os *loci* RFLP uma vez que a reação de PCR não amplifica, com muita segurança, fitas grandes do DNA. Os géis usados para eletroforese em AmpFLP são de poliacrilamida e podem ser corados pela prata. Com a eliminação de *southern blot* e de auto-radiografia, as análises em AmpFLP podem ser executadas em poucos dias, ao invés de várias semanas necessárias para as análises por RFLP (COMEY, 1988).

No final dos anos 90, após a validação pelo FBI - *Federal Bureau Investigation* de 13 *loci* de STRs para testes forenses, foram desenvolvidos testes comerciais para análises das STRs. Estes testes, combinando a alta sensibilidade propiciada pela PCR e um poder discriminatório aproximado de um em trilhões, rapidamente suplantaram as análises RFLP e os testes HLA-DQA1/Ampltipo-PM nos laboratórios de análises de vestígios de crimes e de identificação de cadáveres (THOMPSON; KRANE, 2003).

As análises STR não automatizadas empregam géis de poliacrilamida que são, mormente, corados pela prata para evidenciar os fragmentos de DNA. Já as análises automatizadas usam produto amplificado de DNA marcado com corantes fluorescentes e a leitura e interpretação de seus géis de eletroforeses se dá automaticamente em aparelho próprio.

Em aparelhagem mais sofisticada, os fragmentos STR de DNA são detectados na medida da migração no gel através de um detector. Diferentes fluoróforos, agentes químicos fluorescentes, são utilizados em uma dada coluna. Além disto, vários fragmentos STR são suscetíveis a amplificações simultâneas como conjuntos multiplex, permitindo a detecção simultânea de vários sistemas genéticos. Inúmeros sistemas STR estão disponíveis e com números suficientes de sistemas genéticos os quais são testados simultaneamente e dos quais se obtém poderes discriminatórios semelhantes aos alcançados nos testes de RFLP (WEEDN; SWARNEN, 1998).

Muitos laboratórios têm desenvolvido testes para examinar áreas polimórficas do cromossomo Y, contribuindo, assim, para aumentar o painel de *loci* STR autossômicos utilizados para a identificação humana. Estes testes podem ser utilizados em estudos genealógicos e em crimes sexuais que envolvam mistura de fluidos biológicos masculino e feminino. Nestes casos, se existe mais material proveniente da vítima do que

do violador, torna-se difícil a tipagem do DNA masculino pelos testes convencionais de STR. Os testes Y-STR focam-se apenas no DNA de homens, tornando mais fácil a detecção e a tipagem do componente masculino. As desvantagens destes testes são o baixo poder discriminatório, quando comparados aos testes convencionais de STR, e a não distinção de homens de mesma linha paternal. Uma classe de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único do cromossomo Y (Y-SNPs) tem sido alvo de interesse nas investigações forenses pois muitos deles mostram especificidade regional propiciando informações úteis sobre a origem geográfica de um sujeito ou de um vestígio sob investigação (ALESSANDRINI et al., 2005).

Para análise de polimorfismos do mtDNA e dos SNPs, emprega-se a metodologia de sequenciamento do DNA. Nos estudos de DNA mitocondrial utiliza-se um sistema de sequenciamento direto de duas áreas específicas do genoma mitocondrial. Os analistas forenses descrevem um perfil de mtDNA pelas diferenças entre a sua sequência e a de uma referência padrão chamada sequência de Anderson. (THOMPSON; KRANE, 2003) ou de Cambridge (BUDOWLE; BROWN, 2001).

O mtDNA é uma peça circular de DNA com 16.569 pb de comprimento. Uma vez que não existem regiões significantes de DNA repetitivo no mtDNA, somente as sequências polimórficas serão detectadas. Diferentemente do DNA nuclear, presente em pares de cromossomos, somente uma única sequência de mtDNA está presente na célula (homoplasmia). Conseqüentemente, também de forma diferente do DNA nuclear, não há recombinação (LUTZ et al., 1996; VIGILANT et al., 1989).

A região de mtDNA analisada na identificação humana é uma região não-codificadora conhecida como alça de deslocamento (alça-D) ou região de controle. Este locus se estende por 1.100 pb e contém duas regiões hipervariáveis. O grau de polimorfismo na região da alça-D é tão grande que o sequenciamento direto pode ser o método mais eficiente, embora o desenvolvimento um método comercial *dotblot* (WEEDN; SWARNEN, 1998).

Os testes de DNA mitocondrial são altamente sensíveis e podem produzir resultados em amostras não convenientemente analisáveis por outras metodologias, tais como fios de cabelos com bulbo degradado, ossos e dentes antigos. O mtDNA está

presente em centenas ou milhares de cópias por célula e, por isto, se conserva mais que o DNA nuclear de amostras antigas e degradadas. Amostras muito antigas, como os ossos do Czar Nicholas II da Rússia⁸, podem ser analisadas através da tipagem do mtDNA.

Os testes de DNA mitocondrial têm menor poder discriminatório que os testes STR, discriminando apenas um em centenas. Acrescente-se ainda que, por ser o mtDNA oriundo de herança matrilinear, os testes geralmente não podem distinguir indivíduos de mesma linhagem maternal. Pequenas variações são algumas vezes encontradas em perfis de mtDNA de diferentes células da mesma pessoa devido a mutações. Este fenômeno, conhecido como heteroplasmia, complica o processo para determinar se dois perfis encontrados em diferentes amostras são realmente coincidentes ou não. Os testes de mtDNA têm custo elevado e requerem equipamentos laboratoriais específicos para análise. Por isto, ainda poucos laboratórios forenses realizam estes testes e ainda os empregam apenas quando não obtêm sucesso com os testes tradicionais. Contudo, melhoramentos técnicos deverão certamente ampliar e facilitar o uso dos testes de mtDNA em casos forenses, conforme indicam estudos que vêm sendo realizados com *microchips* (DIVNE et al., 2005).

Os SNPs em DNA autossômico também apresentam baixo poder discriminatório, quando comparado ao dos STRs. Entretanto, o estudo dos SNPs para análise de materiais extremamente degradados pode ser de grande utilidade, como ficou demonstrado nos trabalhos de identificação das vítimas dos ataques terroristas ao *World Trade Center*, em 11 de setembro de 2001. (MARCHI, 2004) e em estudos antropológicos (PETKOVSKI et al., 2005).

⁸ O primeiro caso histórico de investigação criminal baseado de DNA foi realizado em 1994 quando ossos, supostamente pertencentes à família real russa (Romanov), executada na Revolução Bolshevik, em 1918, foram analisados usando uma combinação de seqüenciamento de DNA mitocondrial, tipagem de sexo e clonagem de STR por PCR. As amostras ósseas tinham mais de 70 anos e ainda produziram perfis de STR autossômico consistentes com a presença de um grupo familiar e as seqüências de mtDNA coincidiam com as de parentes matrilineares: Príncipe Philip, Duque de Edinburgh, coincidiam com as da suposta Czarina e suas filhas; as seqüências oriundas do Duque de Fife e da Princesa Xênia Cheremeteff-Sfiri coincidiam com o suposto Czar Nicholas II, exceto por discrepância em uma das bases. A clonagem em PCR do mtDNA do suposto Czar mostrou duas moléculas diferentes e foi concluído ser um exemplo de heteroplasmia, tido à época como raro. Isto levou a especulações sobre a validade dos resultados. Contudo, em uma análise independente, realizada pelo laboratório de DNA das Forças Armadas em Rockville, Maryland, em 1996, em restos do irmão do Czar, Georgij Romanov, descobriu-se que ele possuía uma heteroplasmia na mesma posição no mtDNA, dissipando efetivamente qualquer dúvida sobre a identificação da família. Após considerações sobre as evidências pautadas no DNA e em análises antropológicas, autoridades russas reconheceram os restos mortais como sendo dos Romanovs (JOBLING; GILL, 2004).

Microchips de hibridização de DNA vêm sendo empregados para estudo de SNPs e mtDNA em casos forenses (DIVNE et al., 2005; PETKOVSKI et al., 2005) e os avanços alcançados no desenvolvimento desta técnica podem fazê-la despontar em um futuro próximo como metodologia de eleição, haja vista sua simplicidade e eficiência.

Métodos de amplificação total do genoma, denominados genericamente por *amplificação de múltiplo deslocamento*, têm um valor potencial nos estudos forenses quando a quantidade de DNA que se quer examinar é extremamente pequena. Contudo, a amplificação desbalanceada de alelos tem sido observada para amostras com menos de 50 picogramas de DNA e trabalhos adicionais serão necessários para determinar se existe qualquer vantagem sobre os métodos convencionais utilizados para tipagem de DNA com baixo número de cópias.

Novos estudos também estão sendo desenvolvidos no sentido de auxiliar os analistas forenses em face do grande desafio que pode à vezes se tornar a identificação de fluidos corpóreos e a determinação da *causa mortis*. Tais estudos têm se dirigido para a identificação de manchas de sangue, sêmen e saliva através da análise específica de RNAs mensageiros (mRNAs) que possuem surpreendente estabilidade. Estudos com marcadores genéticos relacionados com o metabolismo de drogas (CYP2D6) e com as causas da arritmia cardíaca (*long QT syndrome*) vêm sendo desenvolvidos e no futuro poderão auxiliar os patologistas no diagnóstico molecular da *causa mortis* (JOBLING; GILL, 2004).

CAPÍTULO III

PROCEDIMENTOS TÉCNICOS PARA ANÁLISE DE DNA

1. Aspectos gerais

Quando um teste de DNA é feito, vários passos básicos são realizados independentemente da metodologia aplicada e do tipo de amostra que está sendo analisada. Os procedimentos básicos incluem: 1) o isolamento do DNA da amostra que contém DNA de origem desconhecida e, geralmente mais tarde, o isolamento da amostra, por exemplo, sangue de um indivíduo conhecido; 2) o processamento do DNA para que os resultados do teste possam ser obtidos; 3) a determinação dos resultados do teste ou tipagem de regiões específicas do DNA; e 4) a comparação e interpretação dos resultados dos testes, da amostra de origem biológica desconhecida (amostra questionada) e da amostra de origem conhecida (amostra-referência), para determinar se o indivíduo conhecido está excluído (não é) como a fonte do DNA ou está incluído como a possível fonte do DNA encontrado na amostra questionada.

Devido à baixa qualidade e à exigüidade das amostras biológicas que costumeiramente aportam em um laboratório de DNA forense voltado à elucidação de delitos e à identificação de pessoas, a metodologia preferencialmente aplicada é a baseada na análise de STRs através da PCR. Assim sendo, neste trabalho, centraremos mais nossa atenção nesta metodologia, cujos procedimentos envolvem várias etapas como abaixo enumeradas e as quais estudaremos a seguir:

- a.* coleta dos materiais;
- b.* extração do DNA;
- c.* quantificação do DNA extraído;
- d.* amplificação do DNA pela PCR;
- e.* análise comparativa dos perfis genéticos obtidos;

- f. cálculos estatísticos, se cabíveis;
- g. elaboração de laudo ou relatório das análises realizadas.

2. Coleta de materiais

O objetivo do geneticista forense é o de identificar com maior certeza possível a origem de uma amostra biológica. A alta quantidade de variantes (polimorfismos) atualmente acessíveis no DNA é extremamente informativa e, conseqüentemente, o grau de certeza auferido na identificação humana pode ser alto. Contudo, isto nem sempre se mostra uma tarefa simples e direta, principalmente em decorrência de dificuldades a serem superadas durante a marcha analítica em função de características dos vestígios coletados.

A coleta de um vestígio em local de crime depende da habilidade do coletor em vislumbrar sua utilização na investigação. Existem centenas de variedades de vestígios que podem ser colhidos e submetidos a análises nos laboratórios forenses. No entanto, os vestígios que podem ser submetidos à análise de DNA são apenas aqueles de natureza biológica como sangue e sêmen, *in natura* ou em manchas ou crostas; tecidos, células, ossos, dentes e órgãos; pêlos e cabelos; urina, saliva e outros fluidos corpóreos.

Estes vestígios biológicos podem ser usados para ligar uma pessoa a outro indivíduo, a um objeto ou a um lugar. Podem também ser utilizados para desvincular um indivíduo de um crime. De acordo com Lee (1999), os vestígios biológicos geralmente são transferidos de duas maneiras: por deposição direta ou por transferência secundária.

Por deposição direta, sangue, sêmen, tecido corpóreo, osso, dente, pêlo, cabelo urina e saliva podem ser transferidos para o corpo de um indivíduo ou para roupas, ou para um objeto ou diretamente para o local do crime. Depois que os líquidos biológicos são depositados, eles se transformam em manchas e aderem a uma superfície ou a um substrato. Vestígios biológicos não fluidos, tais como tecidos, ossos, dentes, pêlos ou cabelos, podem também ser transferidos pelo contato direto ou depositados.

O depósito direto ou transferência pode resultar de qualquer uma das seguintes situações: material biológico do suspeito depositado no corpo ou na roupa da vítima, em um objeto ou em um local; material biológico da vítima depositado no corpo ou na roupa do suspeito, em um objeto ou em um local; ou material de uma testemunha, depositado no suspeito ou na vítima ou em objeto ou local.

Por transferência secundária, sangue, sêmen, tecido corpóreo, pêlo, cabelo, urina e saliva podem ser transferidos para a vítima, suspeito, testemunha, objeto ou local, através de um meio intermediário. Na transferência secundária existe a fonte original (doadora do vestígio biológico) e a superfície alvo. Um transferidor intermediário pode ser uma pessoa, um objeto ou mesmo um local. Vestígios oriundos de transferência indireta não fornecem necessariamente prova positiva de vínculo direto de um indivíduo com um crime específico.

A obtenção de sucesso na análise do DNA retirado de um vestígio oriundo de um local de crime em muito depende do tipo das amostras colhidas e de como elas foram preservadas. Assim, a técnica utilizada para coletar e documentar o vestígio, a quantidade e o tipo de vestígio a ser colhido, o modo que o vestígio deve ser manuseado e embalado, e como o vestígio deve ser preservado são alguns pontos críticos para o exame de DNA.

Se o vestígio não for apropriadamente documentado, coletado, embalado e preservado, ele poderá não cumprir os requisitos científicos e legais para ser admitido como prova perante a justiça. Se o vestígio que deu origem ao exame de DNA não for apropriadamente documentado antes da coleta, sua origem pode ser questionada. Se não for bem coletado, sua atividade biológica pode ser perdida. Se for inapropriadamente embalado, pode ocorrer contaminação exógena ou cruzada e, se não for apropriadamente preservado, pode ocorrer decomposição e degradação. Qualquer destes efeitos poderá afetar seriamente a tipagem do DNA.

As orientações gerais que devem ser seguidas para a documentação, coleta, embalagem e preservação de vestígios biológicos a serem submetidos à análise estão nas recomendações comumente encontradas em manuais editados por órgãos ou entidades

internacionais⁹ que fomentam ou procedem a análises forense de DNA.

Amostras adequadas para análises de DNA:

a. sangue: pode se encontrar em qualquer lugar do delito, em forma de poças, gotas, salpicaduras, manchas ou crostas. É o indício biológico mais habitual no local do crime e nos vestígios;

b. sêmen: com espermatozóides é, como o sangue, uma boa fonte de DNA e é um vestígio habitual nos crimes sexo-relacionados. Diferentemente do sangue, é possível que o sêmen não deixe uma mancha detectável a olho nu. Existem várias técnicas para detectar estas manchas, entre elas se encontram o emprego de luz ultravioleta e análises químicas;

c. saliva: nela o DNA se encontra nas células da pele da boca e nos leucócitos. As manchas de saliva nem sempre são visíveis, mas podem ser encontradas em guimbas, mordanças, máscaras, recipientes de bebida ou comida, goma de mascar, escovas de dente e selos nos quais foi utilizada saliva para engomá-los;

d. pêlos e cabelos: somente pêlos e cabelos, independentemente da origem, têm valor para a análise de DNA nuclear, uma vez que este se encontra nas células que rodeiam o bulbo. Pêlos e cabelos carentes de bulbo podem servir para análise de DNA mitocondrial;

e. células da pele: podem ser encontradas em raspaduras de unhas, quando, por exemplo, alguém arranha com violência suficiente para que haja sangue ou mesmo carne sob as unhas. Às vezes se encontra material celular em luvas ou gorros. Algumas partes de roupas, como cava de uma camisa, podem conter uma mistura de suor e células corporais que podem servir para análise de DNA;

f. urina: nela podem ser encontradas células de revestimento da uretra

⁹ FBI – *Federal Bureau of Investigation – Handbook of Forensic Service – DNA Examinations*, 2003; GITAD – *Grupo Iberoamericano de Trabajo en Análisis de DNA – Recogida de Pruebas Y Muestreo de ADN*, 2002; GEP-ISFG – *Grupo Español y Portugues de la ISFG*, 2000.

e leucócitos;

g. *secreções nasais*: podem ser encontradas em lenços usados;

h. *marca de mordidas*: deve ser fotografada ao lado de uma escala, devendo ser passado um *swab* umedecido pela zona alvo para se extrair a saliva;

i. *restos humanos*: os cadáveres dos quais se retiram amostras para análise genética podem ser de vítimas de delitos ou acidentes ou de pessoas não identificadas. Podem ser colhidas amostras de sangue das cavidades cardíacas, mechas de cabelos retirados desde a raiz, fragmento de músculo ou se o cadáver se apresenta em putrefação generalizada, devem ser retiradas amostras ósseas e dentárias, se existentes. Preferencialmente devem ser coletadas amostras de ossos longos como fêmur e tíbia e secundariamente outros ossos na seguinte ordem: costela, úmero, rádio, crânio, vértebra e ossos da mão e pé. Dos dentes devem ser colhidos alguns elementos de cada tipo na seguinte ordem preferencial: molar, pré-molar, canino e incisivo não restaurados e, secundariamente, molar, pré-molar, canino e incisivo restaurados.

A conservação adequada das amostras, desde a coleta até a chegada ao laboratório, é fundamental para todos os vestígios, mas em especial para os vestígios biológicos que são muito vulneráveis à deterioração do DNA em poucas horas. É fundamental que os vestígios úmidos sejam secos à temperatura ambiente, protegidos da luz solar e do calor e serem, após a secagem, prontamente embalados separadamente em papel ou caixa de papelão. As amostras de sangue líquido devem ser conservadas e transportadas sob refrigeração a 4°C. Tecidos moles e órgãos devem ser congelados. Todos os materiais utilizados para embalagem, seja papel, tubos ou caixas devem ser devidamente identificados para garantir a origem das amostras.

Como procedimentos gerais para a coleta de amostras em locais de crime, devem ser adotados os seguintes:

a. fotografiação de cada vestígio antes de sua coleta;

b. consideração da presença de outros tipos de vestígios físicos de

interesse forense como, por exemplo, impressões digitais, antes de recolher e embalar os elementos utilizáveis na análise de DNA;

c. utilização de *kits* especiais para diferentes tipos de amostras que possibilitem condições ótimas para armazenamento e transporte;

d. recolhimento de vestígios líquidos com seringas estéreis; no caso de sangue, deve ser utilizado EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) como anticoagulante. Estes vestígios também podem ser recolhidos com papel absorvente, algodão, gaze ou *swab* estéril, deixando-os secar à temperatura ambiente antes do armazenamento para evitar a proliferação de bactérias e fungos, típica em ambiente úmido. Se, dadas as circunstâncias, as amostras não puderem ser secas, poderão, então, ser imediatamente congeladas para inibir a ação dos microrganismos;

e. as manchas encontradas em objetos transportáveis não devem ser extraídas *in loco*, mas todo o objeto deve ser entregue para exame. Os objetos contendo manchas de sangue úmido devem ser secos antes de embalados para que sejam entregues ao laboratório para análises;

f. as manchas encontradas em objetos não transportáveis devem ser colhidas com *swab* levemente umedecido ou, se possível, raspar a mancha com instrumento limpo, depositando o raspado em papel. Pequenas gotas podem também ser retiradas com fitas adesivas. Manchas contidas em tapetes, carpetes e grandes estofados podem ser retiradas recortando-se o suporte. Deve também ser coletada uma porção do suporte não manchada de forma a servir de amostra de controle. A mancha e a amostra controle, quando for o caso, devem ser secas à temperatura ambiente e embaladas separadamente;

g. pêlos e cabelos devem ser recolhidos com pinças e colocados em envelopes estéreis;

h. tecidos, órgãos, ossos e dentes não devem ser secos, mas apenas congelados antes do envio ao laboratório, sem adição de qualquer conservante.

A seguir, passamos a abordar algumas recomendações específicas que se fazem necessárias para a correta coleta, devido a características peculiares do tipo de vestígio biológico, de sua quantidade ou do suporte que o contém:

a. *sangue seco*: manchas secas em objetos pequenos ou transportáveis – em geral, neste tipo de amostra, o objeto deve ser enviado ao laboratório em um envoltório de papel; manchas secas contidas em objetos grandes ou não transportáveis – a coleta deste tipo de mancha vai depender do tipo de suporte sobre o qual se encontra a mancha. Se o suporte não for absorvente, por exemplo, parede, vidro, madeira, as amostras podem ser coletadas por raspagem efetuada com um bisturi estéril sobre um papel que deve ser cuidadosamente dobrado e colocado em um envelope de papel ou, então, pode ser utilizado um *swab*, levemente embebido em água destilada, que deve ser friccionado sobre a mancha que, se possível, deverá ser recolhida em apenas um *swab*. Este *swab* deverá ser seco à temperatura ambiente, protegido da luz solar e do calor e embalado em papel antes de ser enviado ao laboratório. Se o suporte que contém a mancha for absorvente como, por exemplo, estofados e tapetes, recomenda-se recortar a mancha com bisturi ou tesoura e colocá-la em envelope de papel devidamente identificado;

b. *sangue líquido*: se estiver em grande quantidade, deve ser recolhido em um tubo estéril que contenha anticoagulante EDTA. Estes vestígios devem ser mantidos e transportados sob refrigeração a 4°C, corretamente identificados e enviados, com a maior presteza possível, ao laboratório. Se a quantidade for pequena, o sangue deve ser coletado com um *swab* estéril que deve ser seco, embalado e identificado do modo descrito no item anterior;

c. *sêmen*: caso esteja sobre uma pessoa, deve ser levado em conta que a maioria dos indícios que se encontram nestes casos têm uma contaminação cutânea em maior ou menor grau. Restos de sangue, saliva ou sêmen de uma pessoa, encontrados sobre outra, vão, obviamente, conter restos do portador. Desta forma, qualquer vestígio biológico depositado nas cavidades anal, oral ou vaginal vai estar intensamente contaminado por células do portador. Toda vítima de uma suposta violação sexual deve ser imediatamente examinada por um médico especialista que deve tomar, com muita precaução, primeiramente amostras dos genitais externos e posteriormente da cavidade vaginal, sempre com *swabs* estéreis, tomando o cuidado para não introduzir espermatozóides que

estejam nos genitais externos ao interior da vagina por arrastamento. Os cuidados são os mesmos para casos de suposta violação anal. Para colher amostras da cavidade bucal, devem ser friccionados minuciosamente *swabs* no interior da boca e, posteriormente, devem ser limpos os dentes e os espaços entre eles. Também devem ser guardadas, em embalagens independentes, todas as roupas da vítima, especialmente as peças íntimas. Nos crimes sexo-relacionados, os pêlos merecem um estudo especial, já que, sobretudo nas violações vaginais, é comum mesclarem-se pêlos pubianos do agressor e da vítima. Para a coleta destes pêlos, penteia-se a zona pubiana com um pente fino e limpo, recolhendo-se todos os fios que vão caindo em um papel limpo. Caso sêmen líquido seja encontrado no local do delito, este deve ser recolhido com um chumaço de algodão ou *swab* que deverá ser previamente seco, em temperatura ambiente, antes de ser embalado em envelope de papel, evitando-se sempre a utilização de sacos plásticos. Se o sêmen estiver contido em preservativo, toda peça deve ser colhida e colocada em um tubo limpo e seco que deverá ser congelado. Para grandes quantidades de sêmen já seco, deverá ser, se possível, recortado o suporte que contenha a mancha. É conveniente, nestes casos, que seja também seja recortada uma amostra do suporte não manchada para controle. Cada uma destas amostras deverá ser independentemente embalada e identificada. Caso o sêmen esteja seco, mas se encontre em pequenas quantidades, deverá se proceder à coleta com os mesmos cuidados dispensados para vestígios de sangue seco;

d. saliva ou urina: se o vestígio estiver úmido sobre a pessoa ou no local do crime, deverá se proceder tal como na coleta de sêmen líquido. Se vestígios de um destes fluidos estiverem em forma de manchas em objetos transportáveis, deverá se proceder como no caso de sangue e sêmen, transportando-se o objeto. Se as manchas já estiverem secas, o procedimento recomendado para a coleta é o mesmo empregado para sangue e sêmen secos;

e. unhas: primeiramente deve ser observado se nas unhas da vítima estão presentes fibras, pêlos, sangue, ou carne, para posteriormente cortar a borda superior de cada uma delas. É de suma importância que a coleta dos fragmentos se dê separadamente para cada uma das unhas de ambas as mãos. Cada fragmento ungueal deverá ser isoladamente embalado em papel e devidamente identificado. Uma forma alternativa para coleta do material subungueal propõe a utilização de *swab*, levemente umedecido em água destilada, para a retirada de possíveis vestígios contidos sob cada uma

das unhas;

f. *pêlos e cabelos*: devem ser recolhidos com pinças estéreis ou descartáveis, procurando-se não romper o fio e nem tocar na raiz. Cada fio deve ser colocado sobre um papel ou podem ser postos em fita adesiva, desde que o bulbo não seja tocado;

g. *vestígios úmidos*: os vestígios mais comuns encontrados nas roupas são manchas úmidas de sangue ou de sêmen. Nestes casos, as peças devem ser secas em temperatura ambiente em lugar protegido da luz solar e do calor, sobre uma superfície limpa. Uma vez secas, as peças devem ser isoladamente envoltas por papel, identificadas e acondicionadas em envelopes, sacos de papel ou caixas de papelão, antes de serem remetidas ao laboratório para análises.

Os materiais biológicos sobre os quais não paira qualquer dúvida sobre a origem (referência) poderão ser coletados de vítimas, suspeitos, testemunhas contaminantes e familiares. A coleta de material-referência da vítima é de crucial importância para os exames de DNA, uma vez que é imprescindível, no momento de interpretação, conhecer sua contribuição para os resultados. Quando existir suspeitos é necessário colher amostras indubitadas dos mesmos para que se compare seu perfil genético com aquele que aparece nos vestígios. Quando na amostra analisada há a presença de DNA de mais de uma pessoa e se suspeita que existiu, por manipulação inadequada, contaminação do vestígio com material biológico do manipulador (testemunha contaminante), deverá ser coletada amostra-referência deste, para que se conheça seu perfil genético. Pode-se recorrer aos familiares da vítima quando não se tenha seu material-referência ou mesmo, com certas ressalvas jurídicas, aos familiares de um suspeito, quando não se tem acesso ao seu material-referência. Nos casos de identificação de cadáveres de pessoas desconhecidas ou de vítimas de grandes catástrofes, é imprescindível a coleta de materiais dos supostos familiares.

A amostra-referência por excelência utilizada para a tipagem de DNA é o sangue. Em pessoas vivas poderão ser extraídas, por punção venosa, amostras em tubos do tipo “vacunteiner” contendo EDTA como anticoagulante. Estas amostras deverão ser devidamente identificadas, mantidas sob refrigeração (4°C) e transportadas o mais

rapidamente possível ao laboratório para análises. Amostras sangüíneas de pessoas vivas também poderão ser obtidas por punção digital. Com uma lanceta cirúrgica perfura-se a polpa de um dos dedos da mão e as gotas de sangue podem ser depositadas em um papel absorvente ou em um cartão do tipo FTA^{®10}, devendo estas amostras ser secas à temperatura ambiente e protegidas da luz solar e do calor. Já as amostras sangüíneas coletadas *post-mortem*, por punção cardíaca, devem ser colocadas em recipientes apropriados que deverão ser devidamente identificados, refrigerados a 4°C e encaminhados ao laboratório o mais prontamente possível.

Amostras de saliva poderão ser obtidas pelo emprego de *swabs* que deverão ser friccionados na parte interna da boca. Devem ser colhidas, com um *swab*, amostras da bochecha direita e com outro, da esquerda. Ambos os *swabs* deverão ser secos à temperatura ambiente, e devidamente identificados. É fundamental que eles não sejam embalados se não estiverem totalmente secos, já que na saliva existem bactérias que proliferam com a umidade, produzindo decomposição do DNA. Uma vez secos, deverão ser separadamente embalados em papel.

Pêlos ou cabelos poderão ser também colhidos como amostras-referência, devendo, para isto, ser arrancados desde a raiz e depositados sobre um papel.

Em cadáveres, o tipo de amostra-referência a ser coletada vai depender do estado de conservação cadavérico. Em cadáver recente, ou seja, naquele que não estão claramente presentes os fenômenos putrefativos, preferencialmente se selecionam fragmentos de tecido muscular que devem ser remetidos ao laboratório de DNA congelados em recipientes plásticos sem conservantes. De cadáveres em decomposição ou já esqueletizados, devem ser enviadas amostras de tecidos duros (ossos e dentes). A ordem preferencial para a coleta das peças ósseas e dentárias anteriormente relatada deve ser seguida, lembrando-se sempre que o melhor material dental é aquele que não possua restaurações.

Uma questão de primordial importância na coleta de materiais biológicos é a contaminação, uma vez que as técnicas de análise de DNA atuais são extremamente

¹⁰ Nome comercial de um cartão que permite o acondicionamento e a preservação de material sangüíneo em temperatura ambiente por mais de dez anos, segundo seu fabricante, Whatman BioScience.

sensíveis. Por isto, deve-se exigir para a coleta uma perfeita detecção, identificação e isolamento dos vestígios para evitar a contaminação de índole biológica ou química. A contaminação por contato físico pode ser evitada pela utilização de máscaras e luvas pelo coletor que deverá manipular as amostras com pinças. Os manipuladores devem trocar as luvas sempre que estas tenham sido contaminadas. A contaminação química pode se dar pela presença de produtos como tintas, corantes, óleos e terra, entre outros. A presença destes produtos que dificultam ou mesmo inviabilizam os processos de análises pode, muitas vezes, ser inevitável, uma vez que é comum encontrá-los no substrato onde os vestígios biológicos são encontrados. A contaminação biológica é própria de vestígios humanos e resulta de uma mistura com DNA não pertencente ao vestígio. Ela pode ser evitada pela limpeza sistemática dos instrumentos utilizados para a coleta (tesoura, pinça, bisturi e outros) com algodão embebido em álcool, imediatamente após a utilização, deixando que o álcool se evapore antes de se proceder à coleta de um outro vestígio. O coletor deve também evitar tossir, espirrar ou mesmo falar sobre o material da amostra, devendo fazer uso de máscara.

Como vimos, a qualidade, exatidão e confiabilidade dos resultados obtidos na análise de DNA em vestígios coletados ou relacionados a ocorrências criminais depende de procedimentos próprios que devem ser rigorosamente adotados nas etapas do isolamento do local do delito e do levantamento das amostras biológicas a serem encaminhadas para a unidade orgânica responsável pela genotipagem forense.

Logo, o tipo, a integridade e a preservação dessas amostras constituem-se em fatores essenciais à consecução de perfis genéticos bem caracterizados e definidos, pré-requisito para produção de laudos periciais de excelente nível técnico-científico. Assim, a técnica usada na coleta e documentação do vestígio, sua natureza e quantidade, bem como seu acondicionamento e encaminhamento, são alguns dos pontos críticos para um programa de execução dos exames de material genético.

2.1. Cadeia de custódia

Devido ao usual exercício do contraditório por parte da defesa com argumentos contra a admissão no processo ou sobre a validade dos resultados dos testes de

DNA, é imperativo que os centros forenses mantenham a cadeia de custódia de amostras, através de registros que possam acompanhá-las desde a coleta até sua disposição final, de forma a comprovar que tomou todas as precauções para prevenir a falsificação, quebra, perda ou contaminação das amostras.

Cadeia de custódia é um conceito oriundo da jurisprudência estrangeira que se aplica à manipulação de amostras e vestígios e à integridade destes. A cadeia de custódia também se refere à documentação que serve para o rastreamento da amostra, através da demonstração de todos os passos por ela percorridos. Este conceito surgiu tendo em vista que vestígios ou indícios podem ser usados em juízo para a condenação de pessoas pela prática de crimes e, por isto, devem ser assegurados, de forma escrupulosa, os cuidados para se evitar alegações tardias que possam alterar ou comprometer a argumentação da acusação ou da defesa.

Para a manutenção desta cadeia, uma pessoa identificável deve sempre ter a custódia física de todo o vestígio ou da parte dele que segue para a perícia. Quando for o caso, isto é, se existir abundância, a parte restante deste vestígio deve ser depositada em um órgão próprio para armazenamento em lugar seguro e isento, podendo assim servir para eventual realização de contraprova^{11, 12}.

Didaticamente a cadeia de custódia pode ser dividida em duas fases: a da custódia externa, que se preocupa com a amostra desde o local da coleta até chegada ao

¹¹ Faz-se mister aqui esclarecer a diferenciação dos termos *contraprova*, *contraperícia* e *nova perícia*, muitas vezes empregados no meio forense sem qualquer discriminação. O primeiro termo diz respeito à realização de exame em parte íntegra remanescente de material que fora depositado em local seguro e isento, cuja outra parte dele, anteriormente examinada, deu origem a uma prova que está sendo contestada. O termo *contraperícia* refere-se à elaboração de uma nova perícia em material remanescente da perícia anteriormente realizada. O termo *nova perícia* diz respeito à realização de outra perícia em material já periciado anteriormente ou não, entretanto, atinente à mesma ocorrência. A contraprova é mormente praticada na Justiça Desportiva em exames de *doping*. Na Justiça Criminal brasileira, tendo em vista a ausência de órgãos próprios para a custódia de material para eventual contraprova ou mesmo pela escassez do vestígio coletado, realiza-se, em casos de contestação, nova perícia ou contraperícia.

¹² No sentido de incrementar a cadeia de custódia dos materiais destinados não apenas a exames de DNA, com o apoio e parceria de instituições privadas, a Superintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo está implementando a instalação de um centro de custódia. Trata-se de um organismo centralizador de segurança, destinado à guarda de materiais, substâncias, instrumentos e objetos a serem periciados, já periciados ou com perícia em andamento que, por muitas vezes, devido a interesses econômicos ou mesmo escusos, podem sofrer extravios (BONACCORSO; PERIOLI, 2001) e, no tocante à sua experimentação, o Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo vem servindo como protótipo deste centro.

laboratório e a da custódia interna, que se preocupa desde o recebimento da amostra pelo laboratório, dados de transferência e armazenamento, até a sua destinação final.

Cada operação sucessiva entre a coleta do vestígio e sua utilização em juízo, deve ser completa e cronologicamente documentada a fim de suportar contestações legais quanto à sua autenticidade. A documentação deve incluir as circunstâncias sob as quais o vestígio foi coletado, a identidade dos manipuladores, a duração da custódia, a segurança da armazenagem do vestígio, e como o vestígio foi transferido aos curadores subseqüentes em cada elo da cadeia (WIKIPEDIA, 2004).

Os registros da cadeia de custódia devem também indicar dados sobre o tratamento a que foi submetido o vestígio imediatamente após a coleta, identificação dos lacres utilizados para sua embalagem, detalhes sobre sua preparação para os testes a que foi submetido e sobre o processo de sua disposição final, quer seja estocagem ou devolução¹³ de parte do material remanescente, quando for o caso.

Enfim, todos estes dados devem integrar a documentação e, toda vez que a amostra for manuseada, deverão ser concomitantemente feitas anotações de cada ato do manuseio com a assinatura completa de quem o realizou. A completa descrição da custódia dá à amostra certificação de sua origem¹⁴ e destinação e, conseqüentemente, empresta ao laudo pericial, resultante de sua análise, credibilidade e robustez suficientes para propiciar sua admissão no elenco probatório.

2.2. Resolução SSP 194/99

Devido à importância vital da correta manipulação das amostras biológicas para o sucesso das análises e frente à necessidade de adoção dos cuidados para assegurar a

¹³ Por força dos artigos 6º, II e 170 do Código de Processo Penal.

¹⁴ Recentemente foi contestada na Justiça Desportiva a certificação da origem de amostras analisadas, cujos resultados indicavam *doping* por uso de anabolizantes esteróides. Apesar da existência de documentação demonstrando a manutenção da cadeia de custódia durante toda marcha analítica para a realização da prova e da contraprova, a atleta alegava que a urina analisada não era a mesma que ela havia cedido para a realização dos exames. Para a demonstração da autenticidade das amostras examinadas e da inexistência de falhas na cadeia de custódia, os analistas procederam à análise de DNA mitocondrial de células descamativas presentes na urina e o confrontaram com material sanguíneo cedido pela atleta, comprovando ter sido ela a doadora da urina utilizada no controle *antidoping* (MARQUES et al., 2005).

manutenção da cadeia de custódia, o Instituto de Criminalística de São Paulo, baseado em recomendações nacionais (SBML, 1999) e internacionais (BRINKMAN, 1999; BUDOWLE, 1996; FSS, 1994; ISFH, 1992; LEE et al., 1998, 1991), forneceu elementos técnicos necessários para a edição da Resolução 194, pela Secretaria de Segurança Pública, estabelecendo normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana, a qual está reproduzida no ANEXO 1 deste trabalho.

Esta Resolução, editada em 1999, foi pioneira na América do Sul e, por contemplar de forma sistemática e didática todas as recomendações para a correta coleta e custódia de materiais biológicos destinados à análise de DNA, deverá ser adotada como parâmetro no Projeto de Implantação de Laboratórios Regionais de DNA da Secretaria Nacional de Segurança Pública do Ministério da Justiça, iniciado em 2003.

Entretanto, pela repetição de problemas surgidos, quer no tocante à coleta de materiais, seu acondicionamento, envio e custódia das amostras, quer na realização da análise de DNA propriamente dita, foi necessária a edição das seguintes alterações na Resolução SSP 194/99. São elas:

- 1) *Referentes ao termo de coleta*, previsto no art. 6º, que deverá também conter:
 - a. informação sobre a etnia (raça) do doador para fins de cálculos estatísticos e formação de banco de dados próprio;
 - b. informação clara sobre o grau de parentesco do doador com o cadáver, nos casos de identificação humana;
 - c. informação do número do lacre que fecha a embalagem contendo o material coletado.
- 2) *Referentes ao anexo – das Disposições Preliminares*: todo material biológico encaminhado para a análise deverá estar, de acordo com suas características, apropriadamente preservado e acondicionado em embalagem lacrada, devendo o número de seu lacre

necessariamente constar do documento que o acompanha;

3) *Referentes ao anexo – da Coleta, Acondicionamento, Preservação e Encaminhamento de Material Biológico para Análise Biológica de Identificação:*

- a. nos casos de crimes sexuais, a amostra biológica de eleição a ser enviada para análise é aquela colhida em *swab*, devendo também necessariamente ser encaminhado, além dos *swabs* coletados, amostra-referência da vítima (sangue), vez que mormente há mistura de materiais masculino e feminino nas amostras;
- b. amostras *post-mortem*: os órgãos e tecidos ideais são, em ordem de preferência ditada pelo estado de conservação do cadáver: sangue por punção cardíaca ou parte de um dos rins, para cadáver recente; músculo cardíaco ou baço (3cm³ no mínimo), para cadáver em estágio inicial de decomposição; e cabeça de um dos fêmures ou outro fragmento de osso chato e dentes molares íntegros para cadáver em avançado estado de decomposição. Tais materiais deverão ser apenas congelados (-20°C) e livres de qualquer conservante;
- c. não se deve usar álcool ou formol como conservante de fetos, vísceras, músculos, ossos ou de qualquer outro tecido, devendo os materiais biológicos ser apenas congelados ou refrigerados de forma asséptica;
- d. as amostras de sangue de pessoa viva devem ser colhidas com EDTA (anticoagulante) em tubo do tipo “Vacutainer” (tampa roxa) e mantidas sob refrigeração a 4°C ou em cartão do tipo FTA[®] que permite armazenagem em temperatura ambiente.

Cabe aqui ainda comentar outros aspectos peculiares da Resolução SSP 194/99. As análises de DNA realizadas no Instituto de Criminalística de São Paulo dizem respeito exclusivamente a materiais relacionados, direta ou indiretamente, a ilícitos penais e por ser a análise de DNA estritamente comparativa, o art. 2º da Resolução exige o acompanhamento de padrões biológicos para confronto. Contudo, no § 1º do art. 4º existe a previsão para o recebimento de amostras sem padrão de comparação para futura identificação, em casos de justificado interesse judiciário. Tal dispositivo veio para atender às exigências de, por exemplo, crimes em série de estupro, com o mesmo *modus operandi*, nos quais a investigação policial não aponta ainda para qualquer suspeito. Desta forma, nestes casos, as amostras retiradas das vítimas e que contenham sêmen serão preservadas para futuro confronto com amostras de sangue de possível suspeito ou suspeitos.

Um termo de coleta de material biológico de pessoa viva, previsto no art. 6º da Resolução, deve ser lavrado perante testemunhas. Nele deve estar contida a declaração do doador de não haver recebido transfusão sangüínea nos últimos 90 dias ou ter se submetido a transplante de medula óssea, pois, caso contrário, haveria, nas amostras de sangue colhidas, material genético alheio ao do doador, o que comprometeria, em última instância, a análise.

Devem ser colhidas duas amostras de sangue periférico, em respeito ao art. 170 do Código de Processo Penal que prevê a necessidade de reserva de material para eventual nova perícia, bem como em respeito às boas práticas laboratoriais que exigem a repetição dos exames das amostras, quando os resultados encontrados apontarem para uma exclusão.

É prevista ainda neste termo a declaração de que o doador está fornecendo o material de livre e espontânea vontade e, por último, deve constar do termo de doação a declaração do órgão coletor de que o material biológico colhido será utilizado única e exclusivamente para exames relacionados com a ocorrência criminal que se está apurando e não em outras passadas ou futuras. Por estas previsões possuírem implicações jurídicas e éticas, passaremos, então, a comentá-las.

2.2.1. A coleta de materiais e a Constituição Federal

A Declaração Universal dos Direitos dos Homens estabelece em seu artigo 1º. inciso XI, que “todo o homem acusado de um ato delituoso tem o direito de ser presumido inocente até que a sua culpabilidade tenha sido provada de acordo com a lei, em julgamento público no qual lhe tenham sido asseguradas todas as garantias necessárias à sua defesa”. Neste sentido, a Constituição Federal de 1988, através de seu artigo 5º. inciso LV, assegura ao acusado direito ao contraditório e à ampla defesa.

Pela mesma Carta, são também assegurados outros direitos e garantias ao acusado. Dentre eles podemos citar os contidos nos incisos X, XLIX, LIV, LVII e LXIII do artigo 5º.: direito à intimidade, garantia aos presos de respeito à integridade física e moral; garantia do devido processo legal; garantia de serem inadmissíveis contra ele provas obtidas por meios ilícitos; garantia do princípio de presunção de inocência e o direito de permanecer calado.

Estas garantias aliadas ao princípio *nemo tenetur se detegere* (ninguém está obrigado a fazer prova contra si mesmo), princípio processual ligado ao devido processo legal, que se realiza pelo exercício do direito ao silêncio, se aplicam como garantias de não estar o acusado obrigado a fazer prova contra si. Em relação ao direito ao silêncio, pode-se entender ainda que se o silêncio do réu não pode ser mais interpretado em prejuízo da defesa, o mesmo devendo acontecer em relação à sua recusa em doar material para o exame de DNA. Diante da presunção de inocência, não se pode constranger o acusado ao fornecimento de provas, nem de sua negativa inferir veracidade o fato (GOMES FILHO, 1997).

A coleta forçada ou involuntária do material para feitura de exame de DNA caracteriza uma das formas de obtenção ilícita da prova, o que é inadmissível no sistema legal brasileiro, além de ferir outras garantias constitucionais acima citadas.

Há, porém, um consenso popular em defesa da possibilidade de realização compulsória do exame, pela argumentação de que o interesse da defesa social (proteção da sociedade) justificaria o desrespeito aos direitos e garantias do acusado.

No Estado Democrático de Direito o sistema jurídico deverá sempre ser permeado pelo princípio da razoabilidade. Este princípio coloca em conflito o respeito aos direitos do acusado, consagrados processual e constitucionalmente, e os interesses da sociedade.

Em prol do acusado, vale ressaltar que a Constituição Federal de 1988 impõe, como um dos fundamentos principais para o Direito Penal, o respeito à dignidade humana, limitando o poder de punir do Estado, determinando, assim, uma nova orientação na aplicação das normas penais (CAMARGO, 2002).

Encarados sob esta nova orientação, os interesses da sociedade, mesmo que contemplados pela coleta compulsória, não podem significar uma aspiração de condenação do acusado, uma vez que, sob este enfoque, não é a relação de causalidade, isto é, a comprovação da existência de um fato, que induz à condenação. A responsabilidade criminal e a pena devem ser analisadas sob o prisma da necessidade e proporcionalidade (CAMARGO, 2002).

Entretanto, não se pode compactuar com certas vantagens que muitos acusados podem auferir pela recusa em fornecer material biológico no decorrer da persecução penal e nem com o desrespeito aos dispositivos legais em prol dos interesses da sociedade. Propomos, então, mudança legislativa, a exemplo de legislações estrangeiras, que pacifique a questão, tornando obrigatório o fornecimento de material biológico quando exista suspeição da prática de crimes graves que causem danos relevantes a bens jurídicos protegidos, bem como ainda preveja a possibilidade de formação de dados genéticos dos condenados por estes crimes.

De fato, na sociedade atual, denominada de risco, complexa ou da comunicação, o interesse do Estado, junto ao respeito às garantias fundamentais, é o de solucionar conflitos. Desta forma, o Direito Penal, integrado ao Processo Penal e à Constituição Federal, há de ser funcional e flexível, o que justifica o entendimento do exposto.

Juridicamente a assinatura do termo de coleta pelo acusado garante formalmente que a prova formada a partir de seu material biológico foi lícitamente obtida,

podendo, assim, compor o rol dos elementos colocados à disposição do juízo para a formação da livre convicção sobre autoria do crime perpetrado.

2.2.2. Princípios éticos relacionados à coleta de materiais

As pesquisas e análises envolvendo seres humanos devem também atender a exigências éticas fundamentais, baseadas nos princípios da autonomia, da beneficência e não maleficência e da justiça e equidade. (RESOLUÇÃO CNS 196/96).

O princípio da autonomia relaciona-se com o consentimento livre e esclarecido dos indivíduos-alvo, de forma a tratá-los em sua dignidade, respeitá-los em sua autonomia e defendê-los em sua vulnerabilidade. Sob este prisma, a assinatura do termo de coleta de material biológico, previsto na Resolução SSP 194/99, deve ser precedida de esclarecimentos de que ele não está obrigado a ceder material biológico, assegurando-lhe a inteira liberdade de escolha, sem quaisquer represálias. E, caso haja o assentimento do acusado, deve ainda existir o esclarecimento de que a prova obtida a partir de seu material biológico poderá contribuir para a sua condenação.

Os princípios da beneficência e da não maleficência, que implicam a ponderação entre riscos e benefícios, podem ficar comprometidos se houver o negligenciamento do princípio da autonomia, levando à maximização do risco do próprio acusado contribuir involuntariamente para a sua condenação judicial.

Os princípios da justiça e da equidade são atinentes à relevância social e devem promover vantagens para os envolvidos, aqui no caso, a instituição representante dos interesses da justiça e o acusado, bem como minimizar o ônus para o sujeito vulnerável. Estes princípios podem também ficar comprometidos, se não existir igualdade nos interesses dos envolvidos. Caso sejam ocultados do acusado os devidos esclarecimentos sobre seu direito à recusa, existirão gritantes vantagens para a instituição.

3. Extração do DNA

A identificação humana através do estudo dos polimorfismos do DNA empregando a PCR necessita que o DNA extraído das amostras em estudo esteja livre de contaminantes e interferentes que possam prejudicar a reação. Isto, muitas vezes, poderá implicar, além de procedimentos de extração propriamente ditos, os procedimentos de purificação do DNA extraído.

O primeiro passo para o isolamento do DNA é extraí-lo das células nucleadas de uma amostra obtida no curso da investigação criminal (amostra questionada), bem como isolá-lo de uma amostra referência de um tecido ou sangue de uma pessoa em questão.

O tipo de vestígio biológico, sua quantidade e seu estado de conservação vão ter influência na escolha da metodologia a ser adotada para o isolamento do DNA. Entretanto, independentemente da escolha feita, os métodos de extração e purificação do DNA consistem em três etapas. Na primeira delas ocorre a lise ou ruptura das membranas celulares e solubilização do DNA. Na segunda etapa emprega-se um método enzimático ou químico para remover as proteínas contaminantes e outras macromoléculas. Na terceira e última etapa, ocorre a precipitação geralmente alcoólica do DNA (HIRATA; HIRATA, 1998).

Alguns métodos envolvem uma morosa digestão com proteinase K, utilização de solventes orgânicos altamente tóxicos como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. Ainda que estes métodos propiciem a extração do DNA de uma grande variedade de amostras, eles requerem muitos passos analíticos que podem incluir a transferência dos extratos de DNA para recipientes adicionais ou procedimentos de lavagem do material utilizando vários filtros ou colunas comerciais. Estes passos adicionais podem dar azo a transferências cruzadas de amostras ou a introdução de contaminantes.

Outras técnicas mais simplificadas ditas inorgânicas, como a que emprega *chelex*¹⁵ para extração ou a baseada na precipitação salina (*salting out*), evitam o uso de solventes orgânicos de alta toxicidade e digestão pela proteinase K (BUDOWLE, 1996).

O princípio da extração orgânica (MANIATIS; SAMBROOK; FRITSH, 1996) consiste na remoção dos resíduos de proteínas do DNA através da combinação de dois solventes orgânicos diferentes: fenol e clorofórmio. O método básico compreende a ruptura do tecido com um homogeneizador, a lise celular com um detergente iônico, a extração fenólica e a precipitação etanólica do DNA.

Outro método orgânico compreende a solubilização dos tecidos ou células com detergente iônico e utilização de proteinase K para digerir as proteínas celulares. O isolamento do DNA segue basicamente o princípio anterior (HIRATA; HIRATA, 1998).

O princípio da extração de DNA por precipitação salina, também conhecida por *salting out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988) consiste na remoção do sal da proteína celular, através da desidratação e precipitação com solução saturada de cloreto de sódio.

A metodologia que emprega *chelex* para extração de DNA (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991; BUDOWLE, 1996) baseia-se no princípio que a presença desta resina no processo de ebulição do DNA evita sua degradação por complexação ou quelitização de íons metálicos que podem agir como catalíticos na quebra do DNA em altas temperaturas e em soluções de baixo conteúdo iônico. Os procedimentos adaptados para as amostras forenses envolvem a fervura de células em uma suspensão de *chelex* a 5%.

Como anteriormente salientamos, a escolha da metodologia a ser aplicada para a extração deverá ser pautada no tipo, na quantidade e qualidade das amostras em análise. Em função disto, no decorrer dos vinte anos de aplicação do DNA na elucidação de crimes e identificação de pessoas, inúmeros protocolos de extração foram desenvolvidos

¹⁵ Resina quelante com alta afinidade por íons ou metais polivalentes, composta por polímeros de divinilbenzeno estireno com íons iminodiacetato com ação quelante (formação de qualquer composto em que se forma um anel graças a um enlace coordenado entre dois ou mais sítios de uma molécula e um íon metálico) (CALABREZ, 1999).

e aprimorados para contemplar necessidades específicas, em face da diversidade de vestígios biológicos e suas formas de apresentação. Neste sentido, por exemplo, foi editado um manual sobre protocolos de tipagem de DNA (BUDOWLE et al., 2000) contendo as metodologias de extração de DNA adotadas pelo FBI.

A agência norte-americana preconiza o uso da extração orgânica, com emprego de fenol-clorofórmio, em protocolos que incluam precipitação alcoólica para extração de sangue líquido, manchas de fluidos corpóreos, esperma e células vaginais. Indica a extração orgânica com utilização de filtro concentrador de DNA para manchas de sangue, manchas de saliva, *swabs* vaginais e manchas de sêmen. A extração orgânica tradicional é indicada para extração de DNA contido em abas de envelopes, selos, bitucas de cigarros, tecidos moles, cabelos, ossos, incluindo várias alternativas protocolares, e dentes.

O emprego de *chelex* é recomendado para extração de DNA de sangue total, sangue em manchas, sêmen contido em manchas, saliva contida em *swabs*, papel de filtro, abas de envelopes, selos e bitucas de cigarros. Pode ainda o *chelex* ser aplicado em cabelos, especificamente para análise de DNA mitocondrial.

Por último, a agência recomenda o método inorgânico (*salting out*) para extração de DNA de sangue total. Este manual contém também método de preparação para retirada de DNA imobilizado em cartão FTA[®], mormente empregado para armazenagem e conservação de sangue em temperatura ambiente.

O DNA extraído de vestígios, oriundos de locais de crime, necrotérios ou os obtidos em atos exumatórios, se apresenta, amiúde, em baixa concentração, deteriorado ou contaminado e, como vimos, por isso, passível de análise, na maioria das vezes, apenas por métodos baseados na PCR pelo estudo de STRs ou pelo DNA mitocondrial.

Devido à baixa qualidade e quantidade do DNA extraído, tem sido comum o emprego de filtros concentradores de DNA para otimização das análises, bem como o uso de produtos para sua purificação, uma vez que a presença de contaminantes ou interferentes pode inibir a reação de PCR. Para ajudar na superação destes problemas,

houve o desenvolvimento de *kits* e produtos por empresas comerciais que são de grande auxílio aos analistas forenses.

Dentre os vários produtos disponíveis no mercado e que contribuem para a melhoria na obtenção de DNA, podemos destacar o tubo MICROCON™ YM-100 da Millipore. Trata-se de uma membrana filtrante que promove a concentração e a purificação do DNA. A Promega Corporation também oferece vários produtos para a extração e purificação do DNA. Entre eles ressaltamos os sistemas ReadyAmp™, DNA-IQ™ e Differex™.

O sistema ReadyAmp™ é utilizado para o isolamento e purificação do DNA genômico contido em manchas de sangue altamente degradadas empregando *chelex*. O sistema DNA-IQ™ utiliza partículas paramagnéticas para isolar o DNA de inibidores da PCR. Este sistema pode ser empregado na extração de vários tipos de vestígios, porém sua grande contribuição em nosso entender é a de propiciar sensível melhora na obtenção de DNA de ossos, verdadeiro calcanhar-de-aquiles dos analistas forenses. O sistema recém-lançado denominado Differex™ se propõe a substituir a tradicional extração diferencial pelo método orgânico, empregada para análise de vestígios de crimes sexuais, quer por sua praticidade quer por sua atoxicidade. Entretanto, ainda não temos parâmetro para avaliação da eficiência deste sistema.

A técnica que o sistema Differex™ quer superar é um procedimento empregado praticamente sem modificações há quase vinte anos. Desenvolvida por Gill, Jeffreys e Werret (1985), a extração diferencial pelo método orgânico é laboriosa, porém de grande eficiência, valendo a pena tecer alguns comentários sobre ela.

Nos crimes sexuais, espermatozóides podem estar misturados com células epiteliais da vítima. Os analistas geralmente tentam separar o material masculino do feminino em dois extratos ou frações, usando um procedimento chamado lise diferencial¹⁶

¹⁶ Laboratórios forenses que dispõem de equipamentos para estudos de mtDNA podem obter informações acerca da origem étnica de um estuprador desconhecido. Isto é possível através do seqüenciamento das regiões da alça de deslocamento (alça-D) do mtDNA extraído dos espermatozóides após lise diferencial incompleta, ou seja, sem a total separação dos espermatozóides das células femininas. Estudo recente demonstrou que a lise incompleta impede a perda dos flagelos dos espermatozóides evitando com isso a concomitante perda da informação mitocondrial dos espermatozóides, fenômeno comum na lise completa (ANSLINGER et al., 2005).

que emprega detergentes fracos para liberar DNA das células epiteliais, seguidos da utilização de detergentes fortes para liberar o DNA dos espermatozóides. Isoladas as frações, ambas são submetidas à extração por fenol-clorofórmio (THOMPSON; KRANE, 2003).

Os principais protocolos utilizados para extração pelo Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo (ANEXO 2) empregam quatro metodologias: 1) extração de DNA pelo iodeto de sódio, rotineiramente empregada para sangue *in natura* e bem conservado; 2) extração de DNA com fenol-clorofórmio, utilizada para ossos e dentes ou para manchas de sangue ou sangue *in natura* em péssimo estado de conservação; 3) extração de DNA de osso usando DNA-IQ™, empregada para ossos em péssimo estado de conservação e 4) extração diferencial de DNA pelo método orgânico, utilizada para manchas, lâminas e *swabs* contendo esperma.

No campo do isolamento do DNA, devemos ainda registrar o emprego de sistemas automatizados. A introdução de dispositivos robóticos se deu há mais de duas décadas para processamento de amostras líquidas de espécimes clínicos e nos dez últimos anos esta tecnologia foi transferida aos laboratórios forenses. A automatização foi empregada originalmente nos laboratórios criminais para ajudar no processamento de milhares de amostras de sangue líquido e de *swabs* orais usados como referência nos casos estudados, bem como para alimentar os bancos de dados de perfis genéticos de condenados, tal qual o CODIS - *Combined DNA Index System*, norte-americano. O sistema robotizado propicia a extração, amplificação e tipagem automáticas do DNA.

O uso da robótica para análise de vestígios criminais encontra vários obstáculos. O primeiro deles é a etapa de extração de DNA, uma vez que estas amostras normalmente sofrem insultos ambientais, além de serem encontradas em qualquer tipo de suporte imaginável que pode, muitas vezes, acrescentar inibidores ao extrato. Além disto, os casos mais comuns submetidos aos laboratórios de DNA são aqueles relacionados com crimes sexuais em que a separação do esperma das amostras pode ser um desafio. Outro obstáculo a ser vencido pela robotização é a quantificação destas amostras, pois diferentemente da amostra-referência, elas devem ser necessariamente quantificadas (CROUSE; CONOVER, 2004).

Considerando estas dificuldades, o uso da robótica para análise de vestígios encontrados em locais de crime começou há poucos anos e vem sendo incrementado à medida que os cientistas forenses fazem ensaios de validação de protocolos para extração e quantificação de DNA para este tipo de plataforma.

O incremento na incorporação da robótica deve-se também ao fato dela propiciar a redução da necessidade de trabalho intenso com fenol-clorofórmio, reagentes de alta toxicidade, nas extrações de DNA (MONTPETIT; FITCH; O'DONNELL, 2005).

4. Quantificação do DNA extraído

A quantificação de DNA é um passo procedimental aplicado aos extratos de DNA antes da reação de PCR e subsequente genotipagem. Ela serve a dois propósitos: assegurar uma diluição adequada para os extratos concentrados de DNA de modo a adequá-los a concentrações compatíveis para a reação de PCR e eliminar extratos que contenham apenas traços de DNA que falhariam na etapa de amplificação, salvando-se, assim, tempo e recursos. Obviamente, dos ensaios de quantificação também se obtêm informações relevantes para a escolha do tipo de marcador a ser utilizado na amplificação frente à concentração de DNA aferida.

A acurácia da quantificação de DNA produz também impacto na qualidade da tipagem de STRs, particularmente quando uma mistura de material é analisada (KLINE et al., 2005).

As metodologias empregadas para estimar a concentração do DNA extraído são baseadas em espectrofotometria de absorção no ultravioleta ou em espectrometria de fluorescência. A quantificação por espectrofotometria é acurada se na amostra em teste não existir contaminação por proteínas, fenol, EDTA e outros ácidos nucleicos. Caso haja contaminação, recomenda-se a quantificação por fluorescência. Aparelhos de espectrofotometria recentemente lançados possuem limite de detecção próximo a 2 ng/mL e, ao contrário dos equipamentos tradicionais, possuem maior potencial de absorbância, prescindem de diluição para a maioria das amostras, alguns deles não empregam cubetas e

capilares para leitura e realizam a quantificação exigindo apenas de 1 a 2 μL da amostra, o que é de grande importância para o exame de vestígios oriundos de locais de crime.

A quantificação de DNA por fluorescência pode se dar por vários procedimentos. No mais tradicional deles, o DNA é submetido à eletroforese em gel de agarose. A visualização do DNA se dá pela intercalação ou ligação à sua molécula de um corante fluorescente. Através da medida da intensidade da fluorescência, estima-se a quantidade de DNA. A quantificação de DNA em gel de agarose é técnica de menor precisão, porém de grande valia por sua simplicidade, sendo mormente empregada apenas como instrumento para averiguação de êxito na etapa de extração.

Vários *kits* comerciais baseados em fluorescência estão disponibilizados e dentre eles têm destaque os que possibilitam especificamente a quantificação do DNA humano extraído. Isto é fator relevante nas análises forenses, uma vez que é comum a contaminação de fungos e bactérias em materiais coletados em locais de crime. E, como tal, contaminação de DNA oriundos de outras espécies deve ser ignorada na quantificação do componente humano do DNA total (MANDREKAR et al., 2001).

Amostras coletadas em locais de crime podem estar degradadas devido a fatores ambientais e outros e, por isso, não conter DNA suficientemente detectável para propiciar a identificação humana. Baseadas na tecnologia de PCR em tempo real (RT-PCR) ou sistema de detecção de seqüências (SDS), empresas comerciais lançaram *kits* que permitem a quantificação de DNA humano total em níveis inferiores a 100 pg, quantificação específica de material humano masculino (cromossomo Y) e quantificação de DNA mitocondrial humano.

A tecnologia de RT-PCR para a quantificação consiste em utilizar um sistema que detecta o aumento da quantidade de DNA no tubo de reação, através da medida do aumento da emissão fluorescente, à medida que a reação está ocorrendo. O nível de fluorescência emitida pela amostra excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio associada a um filtro específico é detectado a cada ciclo e enviada para uma unidade processadora. Para detecção do produto da PCR ao longo de cada ciclo é preciso marcar o DNA amplificado com algum tipo de molécula fluorescente. O termociclador utilizado para quantificação em tempo real está equipado com cabos de fibra óptica que

direciona a luz do laser para cada um dos poços do bloco onde são colocadas as amostras (REBOUÇAS, 2004).

5. Amplificação do DNA

A qualidade e a quantidade de DNA contido nos vestígios oriundos de locais de crime ou de atos exumatórios podem ser fatores limitantes à análise. O advento da PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*, aumentou significativamente a possibilidade de análise das variações gênicas nestes tipos de vestígios, tornando-se técnica de eleição nos laboratórios forenses.

A PCR propicia a amplificação exponencial específica de seqüências do DNA *in vitro*, prestando-se como poderoso instrumento na avaliação da individualização humana. O princípio da técnica (MULLIS; FALOONA, 1987) é baseado na estrutura e na seqüência do DNA. Basicamente trata-se de uma reação enzimática catalisada por uma polimerase (termoestável¹⁷), cuja atividade depende de íons Mg^{++} , e ocorre em três etapas: desnaturação (*melting*) que consiste na separação da dupla fita do DNA a ser amplificado; anelamento (*annealing*) ou hibridização, com ligação do iniciador ou *primer* ao DNA a ser amplificado; e extensão (*extension*), quando ocorre a polimerização propriamente dita (HIRATA; HIRATA, 1998).

Desde sua descrição, o procedimento da PCR vem sendo aperfeiçoado de modo a permitir sua automação em aparelhos termocicladores. Microtubos contendo os componentes essenciais à reação¹⁸ são colocados em um termociclador previamente programado para repetição de ciclos de variação de temperatura, sendo cada um deles composto de três passos.

¹⁷ O que tornou a reação de PCR possível foi a descoberta, em 1976 por Thomas D. Brock, das enzimas DNA polimerases termoestáveis, ou seja, enzimas que apresentam seu ótimo de atividade sob temperaturas ao redor de 70°C. Estas enzimas são isoladas de bactérias (*Thermus aquaticus*) que habitam fontes termais e crateras de vulcões submarinos, onde convivem confortavelmente em temperaturas entre 90° e 100°C (HIRATA; HIRATA, 1998).

¹⁸ DNA molde ou *template*; um par de oligonucleotídeos para iniciar a síntese de DNA (*primers*), enzima DNA-polimerase termoestável; dNTPs ou nucleotídeos contendo as bases nitrogenadas A, T, C e G; cátion divalente, usualmente Mg^{++} ; tampão para manutenção do pH; e cátions monovalentes, usualmente K^+ (KCl) (REBOUÇAS, 2004).

No primeiro passo ocorre a desnaturação, isto é, a separação das duas fitas do DNA a ser amplificado. Isto se dá pela elevação da temperatura entre 90 e 95°C. O aquecimento aumenta a agitação térmica das moléculas propiciando a quebra das pontes de hidrogênio. No segundo passo, em temperatura inferior à da desnaturação (45 a 60°C), ocorre a etapa de anelamento com o pareamento ou ligação dos iniciadores a regiões específicas do DNA molde. O DNA é uma molécula com polaridade, possuindo uma extremidade 5'-P e outra 3'-OH. Os iniciadores são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples, usualmente com extremidade 5'-OH, e complementares à sequência do segmento de DNA de interesse. No terceiro e último passo, a 72°C, inicia-se a atuação da enzima polimerase que propicia o pareamento dos nucleotídeos livres, a partir dos iniciadores, às fitas do DNA, promovendo o alongamento ou extensão da cadeia, no sentido 5' → 3'. Todas as fitas de DNA sintetizadas durante a PCR têm a sequência de um dos *primers* na extremidade 5' e a sequência complementar ao outro *primer* na extremidade 3'.

O conjunto das reações de desnaturação, anelamento e extensão é chamado de ciclo. A execução de um ciclo resulta na amplificação da sequência desejada de DNA. O produto de um ciclo serve como molde para o próximo, dobrando-se, assim, a quantidade de DNA produzido a cada ciclo consecutivo. Sob condições teóricas, os produtos de PCR obedecem a equação $N = N_0 \times 2^n$, onde N é número de moléculas amplificadas; N_0 é número inicial de moléculas e n é número de ciclos de amplificação (HIRATA; HIRATA, 1998). A repetição destes ciclos, entre 25 e 35 vezes, leva à amplificação exponencial da região alvo, ou seja, do locus que se quer estudar, alcançando-se bilhões de cópias. A figura abaixo inserida ilustra esquematicamente a reação de PCR.

Figura 4 - Esquema da reação de PCR (adaptado de REBOUÇAS, 2004).

A cinética da PCR tem três fases. Nos ciclos iniciais ou fase de *screening*, os *primers* procuram o DNA molde com as seqüências que lhes são complementares, encontrando-as com certa facilidade uma vez que estão em excesso em relação ao *template*. Na fase intermediária o processo de amplificação está ocorrendo e existe acúmulo exponencial do fragmento de DNA. Agora o pareamento do *primer* com a seqüência que lhe é complementar está facilitado pela existência de várias cópias da seqüência alvo. Na fase tardia ou também denominada platô, a amplificação já está abaixo do ótimo, em decorrência da limitação dos reagentes e à competição dos produtos gerados. O crescimento linear do número de cópias ocorre até um determinado número de ciclos, ocorrendo, então, o chamado efeito platô. Este efeito pode ter várias causas como a falta de disponibilidade ou mesmo a perda da atividade das polimerases, acúmulo de produtos que tendem a parear entre si e outras (REBOUÇAS, 2004).

Alguns parâmetros são importantes para a otimização da PCR. Dentre eles podemos destacar a temperatura do *annealing* dos *primers*, o regime dos ciclos e a composição do tampão. Aditivos como glicerol, albumina e detergentes não iônicos podem aumentar a especificidade e o rendimento da PCR. Entretanto, a presença de contaminantes na amostra de DNA pode inibir fortemente a reação de PCR. Amostras contaminadas por polissacarídeos ou por corantes podem não ser amplificadas. Fenol, proteinase K, agentes quelantes como EDTA, hemoglobina e outras proteínas das hemácias, detergente forte

como SDS (dodecil sulfato de sódio) e elevadas concentrações de sal podem também inibir a reação enzimática (REBOUÇAS, 2004).

Um problema muito comum na análise do produto da PCR é o aparecimento de um *smear*, uma espécie de mancha ou rastro que tem como causas mais frequentes condições pouco específicas para o *annealing* dos *primers* ou DNA de má qualidade, fragmentado ou com contaminante. Uma das soluções para contornar o aparecimento de *smears* é a aplicação de *nested*-PCR, utilizando-se os produtos iniciais da amplificação que geraram o *smear* (REBOUÇAS, 2004).

A técnica da PCR é tão sensível que é capaz de amplificar uma molécula de DNA e tal é a sua especificidade que uma simples cópia de gene pode ser extraída de uma mistura complexa da sequência genômica de forma rotineira e ser visualizada como uma simples banda em um gel de agarose.

A sensibilidade¹⁹ e a especificidade que o método pode oferecer é algo singular. A PCR utilizando DNA polimerases termoestáveis foi descrita pela primeira vez por Kary Mullis e patenteada nos Estados Unidos sob os n.ºs. 2.683.195 e 4.683.202, em julho de 1987. Mullis; Faloona (1987) e Saiki et al. (1986) introduziram as diversas aplicações da PCR para a comunidade científica e atualmente é inesgotável a sua aplicação prática tanto na pesquisa básica como na aplicada (HIRATA; HIRATA, 1998).

Os *loci* analisados através da reação de PCR são muitos. A pesquisa básica forneceu as sequências das regiões de centenas de microssatélites de importância em hemogenética forense. Os *loci* de microssatélites conhecidos por STRs apresentam alelos ou fragmentos de DNA de 100 a 300 pares de bases e são os preferidos na análise pericial forense (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999).

¹⁹ Qualquer procedimento que usa a PCR é suscetível ao erro causado pela contaminação, podendo levar à amplificação do DNA errado. O processo de amplificação é tão eficiente que algumas moléculas perdidas de DNA contaminante podem ser amplificadas juntamente com o DNA que se quer analisar. A maioria destes erros é prontamente detectada após a análise por PCR, porque o DNA contaminante fornece um padrão fraco que difere do padrão predominante (NRC, 1992).

Estes *loci* podem ser analisados individualmente ou em grupos, através de sistemas chamados múltiplos ou multiplex que permitem o estudo simultâneo de diversos *loci*.

A evolução destes sistemas acompanhou o desenvolvimento dos formatos de detecção dos produtos de amplificação que veremos posteriormente. A amplificação de *loci* STRs progrediu de reações para estudos de um único locus para três, quatro, oito, nove *loci*, alcançando a amplificação simultânea de dezesseis *loci* em um único microtubo, incluindo amelogenina para determinação do sexo (LINS et al., 2000).

O primeiro multiplex largamente utilizado foi um quadriplex (KIMPTON et al., 1993) constituído de quatro simples STRs. Contudo, devido ao seu baixo poder discriminatório (aproximadamente 1 em 10.000), o primeiro caso criminal envolvendo STR autossômico foi resolvido em conjugação com sondas SLP. Adições subseqüentes de dois complexos de STRs aumentaram o poder discriminatório para, aproximadamente, 1 em 50 milhões. Esta segunda geração de multiplex (SGM) também inclui ensaios para amelogenina. Ela propicia a análise de LCN-DNA (DNA com baixo número de cópias) pela sujeição das amostras a um número aumentado de ciclos, objetivando maximizar os produtos da PCR obtidos de amostras com menos de 100 pg de DNA (GILL et al., 2000).

Esta geração deixou claro que ensaios com STRs são mais sensíveis que os outros métodos ao permitir o estudo dos alelos sem ambigüidades, sendo convenientes para o desenvolvimento de bancos de dados²⁰. Em 2000, quatro novos *loci* foram adicionados ao sistema SGM, passando a denominar-se SGM Plus, aumentando o poder discriminatório para aproximadamente 1 em 10.000.000.000.000 (COTTON et al., 2000), sendo recomendado por organizações como ENFSI – *European Network of Forensic Science Institutes e Interpol*.

Os caminhos acima traçados foram os percorridos no Reino Unido. Contudo, em outros locais o emprego dos sistemas STRs se deu de outra forma e

²⁰ Tais bancos combinam a ciência forense e a tecnologia da informática proporcionando uma efetiva ferramenta de informação para o desenvolvimento da investigação criminal. As bases de dados de DNA podem ser utilizadas para a busca de perfis de DNA que ajudem na resolução de um grande número de crimes violentos, através da comparação eletrônica de perfis, estabelecendo nexos entre casos criminais e delinquentes condenados (BUDOWLE; BROWN, 2001).

globalmente hoje existe um grande número de sistemas diferentes que, apesar de tudo, têm muitos *loci* em comum. O CODIS, coordenado pelo FBI, contém 13 STRs mais amelogenina para determinação do sexo, porém com um poder discriminatório menor que o do sistema adotado pelo Reino Unido (JOBBLING; GILL, 2004).

Tipicamente, dois sistemas multiplex são separadamente usados tanto nos Estados Unidos (MORETTI et al., 2001) como em outros países, como é o caso do Brasil. Porém, para aumentar a eficiência das análises, novos sistemas multiplex que amplificam 16 *loci* (incluindo a amelogenina) foram introduzidos no mercado (GREENSPOON et al., 2004), conforme ilustra a tabela abaixo inserida.

TABELA 3 - *Loci* STRs recomendados pelos principais bancos de dados de DNA e os sistemas multiplex disponíveis atualmente no mercado.

cromosomo	<i>loci</i> recomendados		principais kits comerciais		
	ENFSI INTERPOL	CODIS	SGM Plus™	PowerPlex 16™	AmpF/STR™
2	D2S1338	TPOX	D2S1338	TPOX	D2S1338 TPOX
3	D3S1358	D3S1358	D3S1358	D3S1358	D3S1358
4	FGA	FGA	FGA	FGA	FGA
5	Ø	D5S818 CSP1PO	Ø	D5S818 CSP1PO	D5S818 CSP1PO
7	Ø	D7820	Ø	D7820	D7820
8	D8S1179	D8S1179	D8S1179	D8S1179	D8S1179
11	TH01	TH01	TH01	TH01	TH01
12	vWA	vWA	vWA	vWA	vWA
13	Ø	D13S317	Ø	D13S317	D13S317
15	Ø	Ø	Ø	Penta E*	Ø
16	D16S539	D16S539	D16S539	D16S539	D16S539
18	D18S51	D18S51	D18S51	D18S51	D18S51
19	D19S433	Ø	Ø	Ø	D19S433
21	D21S11	D21S11	D21S11	D21S11 Penta D* * pentanucleotídeo importante para o estudo de casos com mistura de materiais	D21S11
X/Y	amelogenina	amelogenina	amelogenina	amelogenina	amelogenina

Foram também desenvolvidos sistemas multiplex para análise de *loci* STRs do cromossomo Y, com aplicação corrente nos estudos de vestígios de crimes sexuais. Os principais *loci* analisados deste cromossomo são: DYS393, AMELY-sex-test, DYS19, DYS391, DYS389I.II, DYS390, YCAII, DYS385, DYS392.

6. Formas de detecção do DNA amplificado

A identificação dos fragmentos amplificados pode ser realizada em gel de poliacrilamida. Uma fração de cada uma das diferentes amostras de DNA a ser analisado, bem como amostras já conhecidas de DNA para servirem como controle e indicadores de posição dos possíveis alelos a serem encontrados, são submetidos a um processo de eletroforese que promove, sob um campo elétrico, a migração diferencial dos fragmentos de DNA determinada pelo tamanho deles, sendo maiores as distâncias percorridas pelos fragmentos mais curtos.

Após a eletroforese, de acordo com os reagentes utilizados na amplificação do DNA, a identificação dos fragmentos pode se dar pela coloração do gel em prata ou pela detecção de sinal de fluorescência dos *primers* marcados com fluorocromos que permitem sua identificação por analisadores automáticos com tecnologia laser. Os resultados da detecção do DNA pela coloração do gel por precipitação de prata são bandas que correspondem aos alelos identificados. Já na detecção por fluorescência através de analisador automático, os alelos podem ser apresentados em bandas ou em picos, conforme ilustram as Figuras 5, 6, 7 e 8.

Figura 5 – Sistemas STR triplex de detecção por prata. Os sistemas multiplex CTT, FFv, e SilverSTR™III são mostrados nos painéis A, B e C, respectivamente. Cada uma das linhas numeradas de 1 a 4 contém individualmente amostras de DNA amplificado e as linhas denominadas como L contém uma escada alélica²¹ para os respectivos *loci* em cada sistema multiplex. Os fragmentos amplificados e as escadas alélicas foram separados em gel de poliacrilamida 4% e detectados por um sistema de coloração por precipitação de prata (adaptado de LINS et al., 2000).

²¹ *Allelic ladder*: marcador utilizado para identificar os alelos de um locus STR específico. Tais alelos são gerados por amplificação em PCR.

Figura 6 – Sistemas STR quadriplex de detecção por fluorescência. Os sistemas multiplex CTTv, FFFL, e GammaSilverSTR™ são mostrados nos painéis A, B e C, respectivamente. Cada uma das linhas numeradas de 1 a 6 contém individualmente amostras de DNA amplificado e as linhas denominadas como L contêm uma escada alélica para os respectivos *loci* em cada sistema multiplex. Os fragmentos amplificados e as escadas alélicas foram separados em gel de poliacrilamida 4% e detectados por *scanner* Hitachi FMBIO® II fluorescente (adaptado de LINS et al., 2000).

Figura 7 – Sistema *GenePrint™* PowerPlex™ 1.1. Seis amostras de DNA (linhas de 1 a 6) foram amplificadas usando o sistema PowerPlex™ 1.1, separadas em gel de poliacrilamida 4% e detectadas por *scanner* Hitachi FMBIO® II fluorescente. O painel A mostra a imagem do gel escaneado em três cores. As cores da imagem foram separadas em escaneamento individuais (painéis B, C e D). O painel B representa os *loci* que são marcados com fluoresceína (D16S539, D7S820, D13S317 e D5S818) que são mostrados em verde no painel A. O painel C representa os *loci* marcados com o corante fluorescente TMR (CSF1PO, TPOX, TH01 e vWA) que são mostrados em vermelho no painel A. O painel D representa o padrão interno CRX e está representado em azul no painel A. As linhas denominadas L contêm a escada alélica para os respectivos *loci* em cada cor (adaptado de LINS et al., 2000).

Figura 8 – Eletroferograma²² obtido em análise do Sistema *GenePrint*TM PowerPlexTM 1.2. Uma única amostra de DNA foi amplificada usando o sistema PowerPlexTM 1.2 e detectadas pelo analisador automático ABI PRISM[®]. O painel superior mostra os *loci* que são marcados com fluoresceína (D5S818, D13S317, D7S820 e D16S539). O painel central mostra os *loci* marcados com o corante fluorescente TMR (vWA, TH01, amelogenina, TPOX e CSF1PO) e o painel inferior mostra o padrão interno CRX (adaptado de LINS et al., 2000).

Atualmente, dado o grande volume de análises nos laboratórios forenses, mormente os sistemas multiplex são analisados e tipificados pela utilização de analisadores automáticos. Para facilitação do processo analítico, tem-se optado pela escolha de sistemas de eletroforese capilar com multicanais para detecção e que são combinados, nos laboratórios de grande porte, com sistemas robotizados e sistemas de gerenciamento de informações, incluindo código de barra das amostras para reduzir erros de operação.

²² Gráfico resultante da eletroforese em analisador automático, mostrando a intensidade da fluorescência como uma função do peso molecular; o pico em um determinado comprimento de onda (cor) corresponde a uma molécula especificadamente marcada e de tamanho particular.

A automação reduz custos e aumenta o ritmo de obtenção de resultados. A interpretação dos resultados, ou seja, a definição do perfil alélico, é mais difícil de automatizar. Contudo, tem havido progresso em se converter a tradicional e subjetiva interpretação do analista forense em regras heurísticas para programas de informática, conhecidos como *expert systems* (WERRETT; PINCHIN; HALE, 1998). Estes programas levam em conta o tamanho (medido com acurácia por meio do padrão interno e da escada alélica); a altura e a área dos picos do eletroferograma, com avaliação do balanço heterozigótico²³; e incluem, ainda, uma checagem automática para interpretação de artefatos da PCR como os *stutters* (JOBBLING; GILL, 2004).

A qualidade do DNA oriundo de amostras-referência é geralmente boa e isto faz com que a automação da tipagem e da identificação sejam relativamente simples. Nas amostras questionadas, uma avaliação preliminar é vital para determinar o melhor método de processamento, porém a automação é mais dificultosa porque a qualidade e a quantidade de DNA são variáveis e também porque misturas são freqüentemente encontradas, bem como perfis anômalos provenientes de mutações podem também aparecer, complicando a interpretação. Deve-se levar em conta ainda que se os métodos usados são sensíveis o suficiente para detectar moléculas de LCN-DNA (baixo número de cópias de DNA), então, a contaminação, seja por um ou por múltiplos alelos, apesar de severas precauções laboratoriais para evitá-la, possui forte possibilidade de ocorrência e para lidar com ela são necessárias determinadas estratégias para interpretação.

7. Significância e interpretação dos resultados²⁴

7.1. Frequência de genótipos e perfis na população

A análise dos fragmentos de DNA pode conduzir à verificação de que duas amostras diferem em seus perfis, levando à conclusão de que vieram de pessoas diferentes.

²³ Proporção entre dois alelos de um heterozigoto, expressa pela razão entre a área do menor pico e a área do maior pico em um eletroferograma.

²⁴ Na abordagem dos itens 7.1 e 7.2 optamos por seguir basicamente as diretrizes propostas pelo Conselho Nacional de Pesquisa (*National Research Council* - NRC) para o assunto, uma vez que as recomendações desta entidade norte-americana são referências mundialmente aplicadas e revistas por comitês sobre DNA na Ciência Forense, compostos por grandes expoentes da matéria. O primeiro comitê do NRC se reuniu em 1989 e emitiu seu relatório em 1992. O segundo comitê, com algumas alterações em seu corpo, se reuniu em 1994 e emitiu seu último relatório em 1996, reformulando ou completando alguns conceitos do relatório anterior.

Porém, se os perfis genéticos combinarem, nos deparamos com duas possibilidades: as duas amostras vieram da mesma pessoa (ou de gêmeos idênticos) ou elas vieram de pessoas diferentes cujos padrões de DNA nos *loci* estudados são os mesmos.

Ao considerar a combinação entre o DNA proveniente, por exemplo, de uma amostra encontrada em local de crime e a de um suspeito, temos que levar em conta que se o perfil deste DNA for comum na população, o vestígio pode ter sido originado por outra pessoa que não o sujeito. Entretanto, se for incomum, a combinação entre os perfis certamente não terá sido mera coincidência, pois quanto mais raro for perfil, será menos provável que as duas amostras de DNA tenham vindo de pessoas diferentes.

Cada teste adicional, isto é, a análise de um *locus* ainda não testado, propicia uma outra oportunidade de um resultado de exclusão, se o indivíduo conhecido que está sendo usado para a comparação não for a fonte do DNA do vestígio. Entretanto, se o indivíduo for a fonte biológica do vestígio, deverão ser analisados *loci* em número suficiente que comprove não somente que ele não possa ser excluído como fonte do DNA, mas também que se comprove virtualmente que fica excluída toda a população mundial. Somente assim, será tida como única a identificação daquele indivíduo como fonte do DNA (NRC, 1996).

A avaliação da probabilidade de que o DNA de uma pessoa escolhida ao acaso tenha o mesmo perfil que o DNA do vestígio analisado implica o conhecimento da frequência deste perfil na população. Esta frequência é determinada por comparação a um banco de dados, sendo necessário usar as frequências individuais dos alelos para estimar a sua frequência.

Esta abordagem exige algumas suposições sobre a forma pela qual a população se une. Em estruturas populacionais animais mais simples, as uniões ocorrem aleatoriamente. Já na espécie humana, as pessoas frequentemente escolhem seus parceiros por seus atributos físicos e comportamentais como altura e personalidade, o que não implica a escolha pelos marcadores nos estudos forenses como VNTRs e STRs (NRC, 1996). Assim, apesar das populações não se unirem aleatoriamente, o estudo das frequências destes marcadores genéticos em diferentes populações de um mesmo país pode demonstrar proporcionalidade de genótipos.

Considera-se união aleatória a preferência de escolha de parceiros independentemente do genótipo nos *loci* relevantes e independentemente da ascendência. As proporções esperadas após uniões aleatórias são chamadas proporções *Hardy-Weinberg* (HW) que consideram que: a proporção de pessoas com duas cópias do mesmo alelo (homozigotos) é o quadrado da frequência deste alelo [$A_iA_i: P_{ii} = P_i^2$] e a proporção de pessoas com dois alelos diferentes (heterozigotos) é o dobro do produto das duas frequências [$A_iA_j: P_{ij} = 2P_iP_j, i \neq j$].

Se uma população não exhibe proporções HW, o que pode ocorrer quando a união na geração ou gerações anteriores não foi aleatória, apenas uma única geração, com uniões aleatórias, será necessária para produzir proporções HW, pois as proporções dos gametas que se unem para produzir indivíduos da geração seguinte dependem somente da frequência dos alelos e não do genótipo dos pais da geração atual. Esta propriedade eleva muito a utilidade das equações acima descritas, pois aumenta a probabilidade delas serem exatas (NRC, 1996).

Populações de diferentes partes do mundo com diferentes frequências de alelos podem ser homogeneizadas em uma única geração, desde que a união seja aleatória. Certamente uniões perfeitamente aleatórias são pouco prováveis, mas as equações são suficientemente exatas para muitas finalidades práticas e o grau de variabilidade causado pelo afastamento das proporções de uniões aleatórias pode ser estimado, como veremos mais adiante.

Afastamentos das proporções HW nas populações podem ocorrer por três razões principais: existência de parentesco, subdivisão da população e processo de seleção.

A primeira delas se dá pelo parentesco entre os pais, levando à consangüinidade que diminui a proporção de heterozigotos com um aumento compensativo dos homozigotos.

A segunda pode ser decorrente da subdivisão da população em grupos raciais importantes como afro-descendentes, caucasianos, hispânicos, índios e outros. Em geral, as frequências dos alelos são bem diferentes entre grupos raciais, levando à confecção de bancos de dados separados. Dentro de uma mesma raça existe ainda

possibilidade de haver subdivisões pela miscigenação. Uma consequência da subdivisão populacional é que os parceiros podem ter ancestrais comuns, tendo também como consequência a diminuição dos heterozigotos e aumento dos homozigotos.

A terceira razão é decorrente do processo de seleção que porém aqui não será considerada, uma vez que na análise forense os *loci* tradicionalmente estudados são considerados seletivamente neutros (NRC, 1996).

Com uniões aleatórias, os alelos em diferentes *loci*, mesmo inicialmente em ligação no mesmo cromossomo, se separam por recombinação e com o tempo atingem o equilíbrio de ligação (EL)²⁵. Assumindo HW e EL, a proporção esperada de um perfil específico pode ser facilmente computada pela multiplicação das frequências dos genótipos em cada locus. Na literatura forense, este procedimento de cálculo é chamado de regra da multiplicação ou regra do produto²⁶.

Em geral, o cálculo da frequência de um perfil deve ser feito com a regra do produto. Se a raça da pessoa que deixou o vestígio de DNA for conhecida, o banco de dados contendo a frequência dos alelos da raça desta pessoa deve ser usado. Caso contrário, devem ser feitos cálculos para todos os grupos raciais aos quais ela possa pertencer. Para *loci* múltiplos, afastamentos do EL não são suficientemente grandes para causar erros. Entretanto, discordando das recomendações do relatório NRC de 1992, baseadas no princípio provisório da frequência alélica máxima, para uma estimativa conservadora, considerando os possíveis afastamentos do HW, o relatório do NRC de 1996 recomenda que, em sistemas como o das STRs onde genótipos exatos podem ser determinados, a fórmula $[2P_iP_j]$ deva ser mantida para os *loci* heterozigotos e a fórmula $[P^2 + P(1 - P)\theta]$ deva ser usada para a frequência no locus homozigoto aos invés de $[P^2]$, considerando 0,01 como um valor conservador para θ , para a população dos Estados Unidos e 0,03 tendo em vista a maior variabilidade dos marcadores baseados na PCR.

²⁵ Quando se trata da análise de herança dos alelos em dois *loci* diferentes no mesmo cromossomo, eles só podem ser transmitidos independentemente se houver uma distância suficiente entre eles denominada equilíbrio de ligação. Caso estes *loci* estejam localizados próximos demais, os alelos destes dois sítios podem ser transmitidos conjuntamente, ocorrendo o fenômeno chamado desequilíbrio de ligação, caracterizando-se em um desvio da herança independente postulada por Mendel. Quando regiões do genoma humano são utilizadas para fins de identificação humana, estas devem estar em equilíbrio de ligação para não sofrer influência na segregação, facilitando a análise da herança (KIRBY, 1990).

²⁶ Se dois ou mais eventos são independentes, a chance de que eles ocorram ao mesmo tempo é o produto de suas probabilidades separadas (NRC, 1992).

Certas vezes existem indícios de que o suspeito e outras fontes possíveis do vestígio analisado pertençam ao mesmo subgrupo, como uma aldeia isolada, fazendo-se necessária uma modificação no procedimento anterior. Nestes casos a recomendação do NRC de 1996 é a de que, se a subpopulação da qual a prova veio for conhecida, as frequências dos alelos para o subgrupo específico devem ser usadas conforme descreve a recomendação anterior. Entretanto, se as frequências dos alelos para o subgrupo não estiverem disponíveis, embora estejam os dados para toda a população, então os cálculos devem usar as equações (abaixo inseridas) da estrutura populacional para cada locus, e os valores resultantes devem então ser multiplicados.

$$\text{Homozigoto: } P(A_i A_i \perp A_i A_i) = \frac{[2\bar{\theta} + (1 - \bar{\theta})P_i][3\bar{\theta} + 1(1 - \bar{\theta})P_i]}{(1 + \bar{\theta})(1 + 2\bar{\theta})}$$

$$\text{Heterozigoto: } P(A_i A_i \perp A_i A_i) = \frac{[2\bar{\theta} + (1 - \bar{\theta})P_i][\bar{\theta} + 1(1 - \bar{\theta})P_i]}{(1 + \bar{\theta})(1 + 2\bar{\theta})}$$

O relatório do NRC de 1996 recomenda também que, se a pessoa que contribuiu com a amostra da prova pertence a um grupo ou tribo para os quais não existe banco de dados adequado, dados de vários outros grupos ou tribos que são considerados estreitamente relacionados a ela devam ser usados. A frequência do perfil deve ser calculada para cada grupo ou tribo, conforme descreve a primeira recomendação.

Por último, no tocante à genética populacional, o relatório do NRC de 1996 recomenda que nos casos em que existam evidências de que um ou mais parentes do suspeito são os possíveis criminosos, os perfis destes parentes devem ser obtidos. Se estes perfis não puderem ser obtidos, a probabilidade de encontrar o perfil do vestígio nestes parentes deve ser calculada com as seguintes fórmulas:

Genótipo do suspeito	Probabilidade do mesmo genótipo em um parente
Homozigoto: A_iA_i	$P_i^2 + 4P_i(1 - P_i)F$
Heterozigoto: A_iA_j	$2P_iP_j + 2(P_i + P_j - 4P_iP_j)F$

Para pais e filhos, $F = 1/4$; para meio-irmãos, $1/8$; para tio e sobrinho, $1/8$, para primos em primeiro grau, $1/16$.

Irmãos, sendo bilineares ao invés de unilineares, requerem fórmulas diferentes:

$$A_iA_i: (1 + 2P_i + p_i^2)/4$$

$$A_iA_j: (1 + P_i + P_j + 2P_iP_j)/4$$

Nestes casos, pressupõe-se que a população está nas proporções de HW. Como os *loci* forenses não estão ligados e parecem estar próximos a EL, a probabilidade condicional de um genótipo multilocus em um parente é o produto das probabilidades condicionais de locus único pertinentes.

7.2. Frequências como probabilidade e razão de verossimilhança

Vistas as formas de estudo das frequências dos genótipos e perfis na população, passemos à abordagem da interpretação destas frequências como probabilidades e razões de verossimilhança e de questões estatísticas. Ao tratar deste tópico, o relatório do NRC de 1996 salienta que dois aspectos importantes com relação à variabilidade devem ser considerados na avaliação estatística do DNA como prova. Um deles é o problema da subpopulação e o outro está associado às características de um banco de dados, como seu tamanho e representatividade adequada da população que poderiam implicar variações das inferências baseadas nos valores dele derivados.

Segundo Jobim; Jobim; Brenner (1999), para composição de um banco de dados, pelo menos 100 indivíduos não relacionados são necessários para gerar frequências alélicas de um determinado grupo. A frequência de um alelo dentro das amostras em uma população randômica é determinada em porcentagem, pela contagem observada do número de vezes que o alelo aparece na população. Para ilustrar a composição de um banco de dados, reproduzimos no ANEXO 3 um estudo realizado por Figueiredo et al. (2004) sobre as frequências alélicas observadas para 15 *loci* STR do sistema PowerPlex™ 16 para 100 caucasianos da população brasileira.

Supondo que uma amostra de DNA retirada de um vestígio encontrado na cena do crime e outra de um suspeito sejam comparadas e os perfis combinarem em todos os *loci* estudados, pode-se inferir que o suspeito é a fonte de DNA ou outra pessoa a seja. Para se avaliar a probabilidade de que este perfil não pertença ao suspeito, deve-se calcular a frequência do perfil na população. Esta frequência é chamada de probabilidade de combinação aleatória e é a estimativa da probabilidade de que uma pessoa que não a do suspeito, escolhida ao acaso na população, tenha este perfil. Quanto menor for esta probabilidade, maior será a verossimilhança de que duas amostras de DNA sejam oriundas da mesma pessoa (EVETT; WEIR, 1996).

De acordo com o relatório do NRC de 1996, uma alternativa seria calcular a razão de verossimilhança (LR) (*likelihood ratio*) que é uma medida de força da prova, considerando a hipótese que os dois perfis tiveram a mesma origem. A LR é a recíproca da probabilidade de uma combinação aleatória que pode ser assim expressa: $LR = 1/P(x)$. A razão de verossimilhança é uma forma de resumir a prova do DNA. Se a LR for 10.000, a probabilidade de que os perfis sejam os mesmos será 10.000 vezes maior se as amostras vierem da mesma pessoa do que se elas tivessem vindo de pessoas diferentes.

Um grande problema que os analistas forenses enfrentam é o de avaliar a verossimilhança em casos onde exista mistura de materiais, algumas vezes encontrada em casos criminais envolvendo vestígios de sangue e sêmen. Uma mistura apresenta um perfil procedente de mais de um indivíduo é evidenciada, na maioria dos *loci* investigados, pela presença de mais de duas bandas ou picos. Além disto, freqüentemente as diferentes bandas que aparecem para o mesmo marcador genético costumam estar desbalanceadas com picos de intensidade maior que os outros.

Gill, Sparkes; Buckleton, (1998) e Clayton et al. (1998) descreveram os passos para identificação de uma mistura. O primeiro deles é a determinação dos alelos sem ambigüidade, eliminando os componentes que estão abaixo do ruído de fundo, tais como artefatos específicos (*stutters*) e inespecíficos, resultantes da amplificação de DNA não humano ou os resultantes do *software* utilizado para detecção; contaminação extra ou intralaboratorial; supressão ou promoção da eficiência da amplificação e bandas múltiplas decorrentes de anomalias genéticas como mutações somáticas, translocações ou trissomias. O segundo passo é a designação dos picos alélicos por comparação à escada alélica. O terceiro passo é a identificação do número de possíveis contribuintes. O número máximo de alelos para qualquer locus para uma mistura com material de duas pessoas é quatro, levando-se em conta que nenhum fenômeno genético ocorra. Misturas mais complexas são de ocorrência relativamente rara. O quarto passo é o de estimar a proporção relativa, ou seja, a razão das contribuições individuais para a mistura pela comparação com as amostras-referência. O quinto e último passo é o de consideração de todas as possíveis combinações genotípicas, valorando os resultados através de cálculos estatísticos.

O parâmetro estatístico na análise de misturas é a razão de verossimilhança. Para sua estimativa, sempre se supõe que exista independência dos *loci* (EL), que os marcadores estejam em equilíbrio de HW e que não exista relação de parentesco genético entre os indivíduos da mistura.

Nas misturas de materiais de dois indivíduos somente três LR's diferentes são possíveis. A primeira delas, usualmente empregada em crimes sexuais, leva em conta duas hipóteses mutuamente excludentes. A amostra é uma mistura da vítima e do suspeito ou a amostra é uma mistura da vítima e de uma pessoa desconhecida. Aqui a LR será:

$$LR(1) = \frac{vítima + suspeito}{vítima + desconhecido}$$

A segunda LR, empregada quando não se tem certeza da existência de material da vítima na mistura, leva em conta duas hipóteses mutuamente excludentes. A amostra é uma mistura da vítima e do suspeito ou a amostra é uma mistura de duas pessoas desconhecidas:

$$LR(2) = \frac{vítima + suspeito}{dois.desconhecidos}$$

A terceira LR é empregada quando na mistura se detecta um perfil que não é compatível com nenhuma das amostras-referência analisadas. Aqui as duas amostras mutuamente excludentes são: a amostra é uma mistura do suspeito e de um desconhecido ou a amostra é mistura de dois desconhecidos:

$$LR(3) = \frac{suspeito + desconhecido}{dois.desconhecidos}$$

As fórmulas empregadas para os cálculos destas LRs estão contidas na tabela abaixo inserida.

TABELA 4 – Alguns dos cálculos para as LRs possíveis dependendo do número de alelos detectados na mistura (PEREIRA; MALAGHINI, 2004).

	LR(1)	LR(2)	LR(3)
alelos da mistura	$\frac{vítima + suspeito}{vítima + desconhecido}$	$\frac{vítima + suspeito}{dois.desconhecidos}$	$\frac{suspeito + desconhecido}{dois.desconhecidos}$
3 abc V = a S = bc	$\frac{1/P_1[c/abc]}{1/pc(pc+2pb+2pa)}$	$\frac{1/P_2[abc/abc]}{1/12papbpc(pa+pb+pc)}$	$\frac{P_1[ab/abc]/p_2[abc/abc]}{2papb/12papbpc(pa+pb+pc)} \cdot \frac{1/6pc(pa+pb+pc)}{1/6pc(pa+pb+pc)}$
3 abc V = ab S = c	$\frac{1/P_1[bc/abc]}{1/2pbpc}$	$\frac{1/P_2[abc/abc]}{1/12papbpc(pa+pb+pc)}$	$\frac{P_1[a/abc]/p_2[abc/abc]}{Pa(pa+2pb+2pc)/12papbpc(pa+pb+pc)}$
2 ab V = ab S = ab	$\frac{1/P_1[_/ab]}{1/(pa+pb)^2}$	$\frac{1/P_2[ab/ab]}{1/2papb(2pa^2+3papb+2pb^2)}$	$\frac{1/P_1[_/ab]/p_2[ab/ab]}{(pa+pb)^2/2papb(2pa^2+3papb+2pb^2)}$
2 ab V = b S = ab	$\frac{1/P_1[a/ab]}{1/pa(pa+2pb)}$	$\frac{1/P_2[ab/ab]}{1/2papb(2pa^2+3papb+2pb^2)}$	$\frac{1/P_1[_/ab]/p_2[ab/ab]}{(pa+pb)^2/2papb(2pa^2+3papb+2pb^2)}$

Apesar do alto poder discriminatório oferecido pela análise das STRs, a interpretação dos resultados em juízo pode gerar controvérsias. Um conhecido exemplo disto é o sofisma do promotor (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999; JOBLING; GILL, 2004; THOMPSON; SCHUMANN, 1987), baseado em um crime cometido em uma cidade com sete milhões de habitantes e com um vestígio pautado em DNA indicando combinação de perfis com LR de 1 em um milhão. Dada a combinação entre o perfil genético do acusado com o do vestígio, o promotor alega que as chances (*odds*) são de um

milhão a 1 a favor de o acusado ser condenado. Porém, devido o tamanho da população, espera-se que 7 pessoas também tenham o perfil coincidente com a amostra analisada, podendo ser argüido pela defesa que as chances são 7 a 1 em favor da inocência. Contudo, esta falácia da defesa erroneamente assume que cada uma das 7 pessoas tem a mesma probabilidade de condenação, o que não é verdade pois a prova de DNA não é utilizada isoladamente.

Este problema de lógica pode ser resolvido enfocando-se a razão de verossimilhança através de probabilidades condicionais baseadas nas teses da acusação e da defesa. O trabalho do júízo baseado na avaliação de provas pautadas não apenas pelo DNA, isto é, firmando-se em todas as evidências, é decisivo para o veredicto de culpa ou inocência. Sob um cenário com diferentes variáveis, sistemas bayesianos, como gráficos que podem mostrar hipóteses considerando relações probabilísticas entre as variáveis, são uma poderosa ajuda para compreensão dos resultados sem, contudo, suplantar o papel do júri (JOBLING e GILL, 2004).

7.3. Investigação de paternidade e identificação de cadáveres

Neste campo, costumeiramente também se faz uso de bancos de dados adequados às raças das pessoas envolvidas. Nos testes de paternidade, caso o suposto pai não tenha sido excluído, cálculos estatísticos devem determinar a força da hipótese de ser o pai biológico da criança. Para tanto, são calculados o índice de paternidade (IP), o índice de paternidade cumulativo (IPC), a probabilidade de paternidade (PP) e a probabilidade de exclusão (PE).

Para se ter um método uniforme de realização destes cálculos, a Associação Americana de Bancos de Sangue – AABB e o Escritório Federal de Suporte à Criança Violentada se reuniram com especialistas em paternidade do mundo em Arlie, Virginia, em 1982. Os resultados desta conferência começaram a ser aceitos inicialmente como método padrão nos Estados Unidos e posteriormente no mundo todo (HUBBELL, DRACKER; DAVEY, 1998).

O IP resume a informação fornecida pelo exame feito. É uma razão de verossimilhança, qual seja, a probabilidade de combinação do perfil mãe-filho-pai, se o suposto pai for o verdadeiro, dividido pela probabilidade desta combinação, se um homem aleatoriamente escolhido for o pai. Para seu cálculo, leva-se em conta que, em uma população em equilíbrio de HW, a probabilidade de que um homem qualquer transmita um alelo específico para a criança em questão é igual à frequência deste alelo na população. O IP de cada um dos *loci* dos sistemas múltiplos utilizados na avaliação deve ser calculado e o produto dos IPs estudados (regra do produto) é o IPC.

O IPC dá a idéia da força da prova de DNA, indicando se está mais de acordo com a hipótese de que o suposto pai seja o pai biológico da criança ou com a hipótese de que qualquer outro homem o seja.

A PP indica o *quantum* de credibilidade se pode atribuir à hipótese de que o suposto pai é o pai biológico da criança. Ela é baseada no teorema de Bayes, utilizado para o cálculo da probabilidade *a posteriori* e pautada nos perfis alélicos encontrados para a mãe, a criança e para o suposto pai. No cálculo da PP, assume-se uma probabilidade *a priori*, baseada em evidência não genética como o testemunho da mãe, de que o homem testado seja o pai biológico da criança. A PP pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$PP = \frac{IPC \times P}{[IPC \times P + (1 - P)]}$$

onde P é a probabilidade *a priori* que normalmente é tomada como sendo 0,5.

A PE é a probabilidade de se excluir como pai biológico da criança um homem qualquer da população, baseando-se na informação dos alelos da mãe e da criança testadas para seu cálculo. A PE refere-se à frequência de todos os homens na população que não possuem os alelos que coincidam com o alelo paterno obrigatório. As fórmulas do teorema de Bayes empregadas para os cálculos da PP e da PE estão contidas no ANEXO 4.

Além da situação envolvendo o trio: mãe-criança-suposto pai, os testes de paternidade podem também ser realizados na ausência da mãe, ou por reconstrução do perfil genético do suposto pai falecido através de familiares deste, ou ainda ter

desdobramentos em questões como, por exemplo, aquelas que envolvam cálculos para determinação de inconsistências (mutações) e de índice avuncular²⁷.

Nos casos de identificação de cadáveres pelo DNA nem sempre as amostras recebidas para análise completam um trio. No Instituto de Criminalística de São Paulo é comum o recebimento de amostra-referência apenas da suposta mãe ou do suposto pai do cadáver. Nestes casos, devem ser aplicadas as fórmulas do teorema de Bayes (ANEXO 4) próprias para a ausência de um dos pais. Contudo, quando se encontram presentes amostras da suposta mãe e do suposto pai, deve-se proceder ao cálculo do índice de parentesco reverso (IPR), uma vez que, diferentemente dos corriqueiros casos de investigação de paternidade, existe dúvida também sobre a maternidade. As fórmulas para este cálculo estão contidas no ANEXO 5.

8. Elaboração de laudo pericial ou relatório de análises

De acordo com o disposto no art. 145, caput²⁸ do Código de Processo Civil brasileiro, laudo é o documento apresentado por escrito onde se expõe a atividade desenvolvida pelo perito, geralmente no âmbito de um processo, como auxiliar da administração da justiça, de que se deve socorrer o juiz na instrução da causa em prol da formação de seu convencimento, quando a prova de fato depender do conhecimento técnico ou científico. O perito apresentará o resultado dos exames, pesquisas, investigações e diligências que realizar em um instrumento que tem o *nomem juris* de laudo pericial.

No foro criminal, laudo pericial é a peça de instrução que deve conter em seu cerne os esclarecimentos necessários que permitam fornecer ao promotor de justiça e ao juiz que preside o feito, condições, qualitativa e quantitativamente, suficientes para que possa o primeiro tipificar o fato como infração penal ou conter argumentos consistentes que comprovem a inexistência do delito ou contravenção penal e ao juiz oferecer

²⁷ Para detalhes sobre estes testes, pode ser consultada a didática apostila do *Workshop* “Análises Estatísticas para Identificação Humana” (PEREIRA; MALAGHINI, 2004), realizado no III Encontro de DNA Forense, ocorrido em 19 e 20 de outubro de 2004, em Belo Horizonte/MG, promovido pela Dialab – Diagnósticos.

²⁸ Art. 145, caput do CPC – “Quando a prova do fato depender do conhecimento técnico ou científico, o juiz será assistido por perito, segundo o disposto no art. 421”.

elementos materiais seguros que lhe permitam formar a convicção sobre um determinado evento.

Do ponto de vista de Zarzuela, Matunaga e Thomaz, (2000), laudo pericial consiste na exposição minuciosa, circunstanciada, fundamentada e ordenada das apreciações e interpretações realizadas pelos peritos, com a pormenorizada enumeração e caracterização dos elementos materiais encontrados no local do fato, no instrumento do crime, na peça de exame e na pessoa física, viva ou morta. A perícia é uma modalidade de prova destinada a levar ao juiz elementos instrutórios de ordem técnica, podendo consistir em uma declaração de ciência, na afirmação de um juízo ou em ambas as operações simultaneamente. Apresenta a perícia e, conseqüentemente, sua materialização instrumental, isto é, o laudo pericial, a peculiaridade de ser uma função estatal destinada a fornecer dados instrutórios e formação do corpo de delito. Assim, o exame pericial, realizado na fase preparatória do inquérito policial, não constitui simples peça de investigação, apesar de se prestar para integrar a *informatio delicti*. Quando realizado, em qualquer fase do processo criminal, o exame pericial representa sempre ato instrutório emanado do órgão auxiliar da justiça, a fim de procurar a verdade, e sua força probatória deriva da capacidade técnica de quem elabora o laudo pericial.

Será através do laudo que ficarão evidentes ou não todos os cuidados empreendidos na realização da perícia desde a preservação do local do crime (arts. 6º, I²⁹ e 169 § único³⁰ do Código de Processo Penal); a manutenção da cadeia de custódia dos vestígios examinados; a metodologia científica empregada na realização da perícia; a eventual guarda de material destinado à eventual nova perícia, por força do art. 170³¹ do Código de Processo Penal; a precisão nas respostas aos quesitos, caso existam; até o oferecimento de suas conclusões, transcritas de forma cristalina e didática, de forma que levem luz às informações técnicas buscadas no processo.

²⁹ Art. 6º, I do CPP – “Logo que tiver conhecimento da prática da infração penal, a autoridade policial deverá: I - dirigir-se ao local, providenciando para que não se alterem o estado e conservação das coisas, até a chegada dos peritos criminais”.

³⁰ Art. 169, § único do CPP – “Os peritos registrarão, no laudo, as alterações do estado das coisas e discutirão, no relatório, as conseqüências dessas alterações na dinâmica dos fatos”.

³¹ Art. 170 do CPP – “Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para a eventualidade de nova perícia. Sempre que conveniente, os laudos serão ilustrados com provas fotográficas, ou microfotográficas, desenhos ou esquemas”.

Os dispositivos legais contidos nos arts. 159, caput³², 160³³ e 179, § único³⁴ do Código de Processo Penal regulam, respectivamente, o número mínimo de peritos que elaborarão a perícia e que, conseqüentemente, serão signatários do laudo; o prazo de elaboração do laudo pericial e certo formalismo em sua apresentação, sem, contudo, regular um modelo para sua elaboração.

Para darmos início à abordagem das peculiaridades na elaboração de laudos periciais envolvendo exames de DNA, faz-se mister observar o significado das palavras de Weedn; Swarnen (1998, p.1435):

Nunca antes uma nova prova científica recebeu desafios legais intensos e tão altamente debatidos. A evidência do DNA é tão poderosa que a defesa tem pouco a escolher a não ser atacar as provas com vigor substancial.

Destas palavras devemos pressupor, para que o poder das provas pautadas em análises de DNA não se esmaça no exercício do contraditório pela formulação direta ou indireta de quesitos sobre a análise realizada, que devem os analistas se cercar de cuidados técnicos na realização da análise e, principalmente, na confecção do laudo pericial, pois será através desta peça que transparecerá todo o esforço por eles empreendido na elaboração da prova.

Os laboratórios de análise forense de DNA devem estabelecer procedimentos e indicações para certificar que os resultados apresentados aos tribunais sejam válidos e exatos em todas as instâncias. O laboratório deve assegurar a custódia das alíquotas das amostras, garantir que os testes sejam realizados de maneira adequada, com reagentes apropriados, por indivíduos qualificados e que os resultados sejam interpretados por indivíduos experientes.

³² Art. 159, caput do CPP – “Os exames de corpo de delito e as outras perícias serão feitos por dois peritos oficiais”.

³³ Art. 160 do CPP – “Os peritos elaborarão o laudo pericial, onde descreverão minuciosamente o que examinarem, e responderão aos quesitos formulados. Parágrafo único. O laudo pericial será elaborado no prazo máximo de 10 (dez) dias, podendo este prazo ser prorrogado, em casos excepcionais, a requerimento dos peritos”.

³⁴ Art. 179, § único do CPP – “No caso do art. 160, parágrafo único, o laudo, que poderá ser datilografado, será subscrito e rubricado em suas folhas por todos os peritos”.

Todas as etapas empreendidas para o estudo do DNA, desde a coleta e análise até a destinação final dos materiais, serão consubstanciadas no laudo pericial que servirá aos interesses de seus leitores.

Como subespécie de laudo, um relatório de análises de DNA poderá fornecer subsídios para auxiliar, por exemplo, na conclusão do laudo do perito criminal que o solicitou. Ou, então, subsidiar informações importantes a um médico legista responsável pela identificação de um cadáver em decomposição. Contudo, sua elaboração deverá também seguir a mesma estrutura utilizada para confecção de um laudo pericial.

Um laudo de análise de DNA poderá auxiliar diretamente a autoridade policial no esclarecimento de pontos nebulosos de um inquérito policial. Em instância final, poderá ainda servir, em sua precípua função, como elemento de convicção para juízes, promotores e advogados nas ações penais.

Os laudos periciais, bem como os relatórios de análises, não estão imunes de serem submetidos à apreciação de pareceristas, especialistas nas matérias tratadas nos laudos, e que são contratados pelas partes para avaliá-los. Ainda que a perícia tenha sido meticulosamente realizada, se o laudo pericial não tiver sido elaborado que forma a expressar todos os cuidados empreendidos, de modo a consubstanciá-lo em um trabalho verdadeiramente científico, sucumbirá fatalmente às críticas de seu avaliador, podendo perder sua credibilidade e acarretar conseqüências danosas aos peritos que o subscreveram.

O ataque contundente às provas de DNA ocorrerá se não forem seguidas na análise e na elaboração do laudo as recomendações sugeridas por entidades nacionais e internacionais, organismos controladores de qualidade e de fomento à pesquisa, responsáveis indiretas pelo controle de qualidade das análises forenses de DNA.

Para iniciar uma abordagem mais direta sobre a forma de elaboração do laudo pericial da análise de DNA, vamos comentar um artigo publicado na coluna Tendências e Debates do jornal Folha de São Paulo, em junho de 2001, pelo médico geneticista forense Luiz Fernando Jobim (2001), onde foram por ele tecidas amargas críticas a alguns exames de DNA, para em seguida apresentar um protótipo das principais recomendações neste mister.

As principais críticas apresentadas por Jobim como parecerista sobre laudos periciais dizem respeito ao não cumprimento de normas que têm por base os padrões internacionais na prática forense. Ele assevera inexistência de valor científico de um dos laudos porque nele o perito não comprovou experiência em genética forense; extraiu DNA sem equipamento adequado; não apresentou a identificação dos alelos por nomenclatura internacional; utilizou reagentes feitos *in house*, ou seja, não validados; não utilizou equipamentos adequados como seqüenciador automático para detecção dos fragmentos de DNA; não apresentou imagens dos perfis de DNA obtidos; e por não realizar testes externos de qualidade.

Ainda no mesmo artigo, fez críticas a outros casos, sendo que em um deles houve troca de materiais, redundando na prisão de um inocente, o que certamente acarretou ação contra o Estado para a indenização do prejudicado e apuração de responsabilidades. Teceu também comentários sobre a aceitação de incumbências sem a existência de equipamentos necessários para a análise, gerando laudos inconclusivos que são facilmente debeláveis por novas análises.

Os motivos alegados por Jobim para explicar a baixa qualidade dos testes relacionam-se com o não preenchimento pelo responsável pelo laboratório dos critérios internacionais de qualidade, faltando-lhe treinamento de no mínimo de três anos em laboratório de genética forense; com a falta de competência prévia na formação de laboratórios pelos governos e universidades, sem submissão a controle externo de qualidade e utilização de alunos como mão-de-obra; e pelo fato do Poder Judiciário ainda não ter capacidade de avaliar exames de DNA.

Segundo Jobim, o que falta para melhorar toda esta situação é um rigoroso controle externo de qualidade com treinamento do responsável técnico em instituição ou laboratório credenciado; comprovação da utilização de reagentes validados internacionalmente; utilização de equipamentos apropriados; e cuidadoso registro de amostras esclarecendo quem as entregou, recebeu e as manipulou durante o exame, e qual o destino final destas amostras.

Em relação à observação feita por Jobim quanto à utilização de reagentes elaborados *in house*, temos a esclarecer que o autor se refere ao uso de *primers*

“desenhados” para a reação de PCR, prática muito comum em laboratórios universitários mas reprovável para análises forenses. Devido à falta de fiscalização do controle de qualidade dos laboratórios forenses e ao baixo custo destes reagentes, tem sido comum o seu uso por pequenos e até por grandes e afamados laboratórios no Brasil, em detrimento do uso *kits* comerciais. Quando estes *primers* não são validados, os perfis alélicos obtidos por seu intermédio não correspondem à realidade, sendo, portanto, impassíveis de reprodutibilidade, além de eivar de erros todos os passos analíticos deles subsequentes, o que leva a desastrosos resultados técnicos que podem, conseqüentemente, conduzir a erros judiciais.

O exame forense de DNA é um exercício técnico de grande complexidade. Os procedimentos para a análise de DNA envolvem várias etapas e, dentre as mínimas recomendações para a elaboração de um laudo pericial desta análise com efetiva validade em nosso sistema judiciário, devem fazer parte de seu conteúdo: a perfeita identificação do número do inquérito policial ou processo; identificação das partes; informação, quando possível, da etnia (raça) dos envolvidos; citação da metodologia empregada na coleta e armazenamento de materiais e, se necessário, maiores esclarecimentos sobre os cuidados empreendidos para manutenção da cadeia de custódia destes materiais.

Deve ainda o laudo conter informações bibliográficas sobre as metodologias utilizadas para a extração, quantificação e amplificação do DNA; forma de leitura dos alelos obtidos nos testes; fórmulas empregadas para os cálculos estatísticos. Se possível, devem ser incluídas fotografias dos testes realizados. Deve ser utilizada a nomenclatura oficial na identificação dos alelos, como também a inclusão de suas frequências.

Como anteriormente fizemos notar, o Código de Processo Penal impõe um certo formalismo na apresentação do laudo pericial, sem, contudo, regular um modelo para sua elaboração. Por outro lado, em respeito às recomendações existentes e às características específicas dos exames de DNA, a elaboração do laudo pericial vem sendo consagrada como no protótipo (BONACCORSO, 2001) que passamos a discutir.

Normalmente constam da *capa* do laudo as seguintes informações:

- a. indicação do distrito policial ou do juízo requisitante;

- b.* número do boletim de ocorrência, do inquérito policial ou do processo;
- c.* número do laudo que está sendo elaborado;
- d.* indicação da natureza do exame;
- e.* identificação das partes, fazendo constar nomes da vítima, suspeito, indiciado ou réu e de supostos familiares quando for o caso de identificação de cadáver;
- f.* nome da autoridade requisitante e dos peritos relatores;
- g.* menção se o laudo elaborado está acompanhado ou não de peças e, caso partes destas estejam sendo devolvidas, deve também ser consignado o número do lacre de sua embalagem.

Com relação ao *preâmbulo*, este deve conter:

- a.* data da designação da perícia;
- b.* nome do diretor responsável pela designação;
- c.* nomes dos peritos designados para a perícia;
- d.* menção à natureza do exame a ser realizado;
- e.* nome da autoridade requisitante.

As informações preliminares devem ser constituídas de um pequeno texto explicativo e genérico sobre os possíveis alcances e limitações dos testes de DNA. De acordo com a natureza do exame realizado, tal texto deve também esclarecer especificamente as características (alcances e limitações) da técnica empregada para análises de materiais biológicos voltados a crimes sexo-relacionados, identificação de

cadáveres, confronto entre vestígios encontrados em local de crime e material referência ou determinação de paternidade.

No item *objetivo da perícia*, deve ser indicada de forma sucinta que se busca a comparação entre a amostra questionada e a amostra referência, através de seus perfis genéticos, na tentativa de se estabelecer se entre elas existe (ou não) um vínculo genético.

No tópico *dos exames*, no tocante aos *materiais*, deve ser indicado pormenorizadamente cada material biológico enviado, referente a cada uma das partes, citando:

- a.* todos os cuidados empreendidos na cadeia de custódia;
- b.* o número do termo de coleta de material biológico, contendo a etnia (raça) do doador;
- c.* relatório de coleta do vestígio, quando for o caso;
- d.* identificação e descrição das amostras;
- e.* número do lacre de cada material recebido;
- f.* o estado de conservação dos materiais, e, se for o caso, inserir fotos dos mesmos;
- g.* notações sobre a existência de registro de controle da cadeia de custódia interna das amostras analisadas.

Ainda neste tópico, no que se refere aos *métodos*, devem ser indicadas as metodologias empregadas, com as respectivas referências bibliográficas das seguintes etapas do exame:

- a. *extração* de DNA, indicando as diferentes metodologias empregadas de acordo com o tipo de material biológico analisado;
- b. *quantificação* de DNA, indicando a metodologia e a aparelhagem utilizadas;
- c. *amplificação* das regiões polimórficas de DNA, citando os reagentes empregados, seus fabricantes e data de validade; o tipo de termociclador utilizado e o programa empregado na amplificação;
- d. *detecção dos alelos dos loci* amplificados, explicando resumidamente o ensaio eletroforético empregado e a forma aplicada para evidenciar alelos, citando o equipamento utilizado para leitura dos perfis genéticos.

Em relação aos *resultados obtidos* e sua interpretação, deve ser indicada sucintamente a obtenção de êxito ou não para cada uma das etapas. Deve se dar destaque aos resultados finais estabelecidos para cada uma das amostras em cada marcador molecular examinado e, se possível, anexar imagens dos perfis obtidos. Nos casos em que não se alcance êxito em todas as etapas ou êxito parcial, deve-se destacar o resultado final alcançado e serem justificadas as razões ou possíveis razões que não levaram a termo a análise.

Nos casos em que se alcança êxito, nas hipóteses de inclusão, devem ser indicadas as frequências dos alelos obtidos, os cálculos estatísticos empregados e o banco de dados utilizado. Se for caso de exclusão, devem ser destacados o embasamento para este resultado e a informação que análise foi repetida por equipes independentes do laboratório.

No item *das conclusões*, deve ser resumidamente repetido o resultado final obtido, já exposto e discutido na interpretação, relacionando-o com o objetivo da perícia e, se for o caso, dar respostas aos quesitos formulados. Em casos de inclusão, o resultado deve ser sempre exposto em termos probabilísticos ou em razão de verossimilhança.

Nos casos de identificação de pessoas através de restos mortais, o cadáver não deverá ser identificado nominalmente pelo analista de DNA, pois sua análise limita-se tão somente à determinação do vínculo genético familiar existente entre as amostras, implicando cabalmente seu caráter subsidiário. Geralmente, o analista não possui elementos informativos suficientes que possam levar a uma identificação nominal inquestionável, devendo, portanto, esta conclusão ficar a cargo de legistas ou de outras pessoas que tenham à disposição elementos corroborantes como dados antropológicos e circunstanciais sobre o cadáver examinado, e informações sobre a ocorrência de pessoas de mesmo gênero na linhagem familiar do cadáver que pudessem também levar à mesma conclusão.

O *fecho* do laudo pericial deve conter:

- a. informação do número de páginas e, se for o caso, de anexos (planilha de cálculos estatísticos, imagens dos perfis alélicos) que o laudo contenha;
- b. citação, se for o caso, que o restante dos materiais não perecíveis, depois da retirada de amostra para eventual nova perícia, segue lacrado e anexado ao laudo, consignando-se também o número do lacre;
- c. indicação, se for o caso, que o restante ou parte dos materiais biológicos perecíveis permanece no laboratório para eventual nova perícia;
- d. indicação do responsável técnico do laboratório e sua titulação, bem como a notação da habilitação para trabalhos com marcadores genéticos moleculares de cada perito subscritor, emitida por conselho profissional competente.

No ANEXO 6 deste trabalho está contido um exemplo de laudo pericial emitido por peritos criminais do Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo.

9. Controle de qualidade

A garantia de padrões de excelência na tipagem do DNA depende da padronização das práticas e dos métodos aceitos para garantir sua qualidade. Cada método de análise possui suas vantagens e desvantagens, implicando diferentes graus de confiabilidade, aplicabilidade e poder discriminatório (EVETT et al., 1989).

As práticas na tipagem do DNA variam, assim como a experiência dos técnicos que realizam as análises. Aliada a isto, ainda temos a pertinente observação feita no relatório NRC de 1992 reconhecendo que, nos laboratórios forenses em geral, a padronização da prática é mais problemática que em outros tipos de laboratório, pois analistas exercem pouco ou nenhum controle sobre a natureza, condição, forma ou quantidade da amostra com que devem trabalhar.

Tendo em vista que os métodos analíticos de DNA se constituem em um auxiliar extremamente poderoso da ciência forense para a identificação de pessoas e elucidação de crimes e de grande benefício para a justiça, a padronização dos procedimentos laboratoriais se faz necessária para garantir resultados de alta qualidade.

Em princípio, a possibilidade de existência de resultados falso-positivos na tipagem de DNA é praticamente nula, de forma que os riscos de erro são decorrentes de práticas laboratoriais ou manipulação precária das amostras, fazendo-se mister que os laboratórios tenham competência para garantir que os resultados dos testes sejam confiáveis, reproduzíveis e corretos (NRC, 1992).

Para que os padrões laboratoriais sejam altamente mantidos, devem existir rígidos e idôneos controles de qualidade (CQ) e de garantia de qualidade (GQ). Em matéria de tipagem de DNA, o CQ diz respeito à tomada de medidas assecuratórias no sentido que os resultados da tipagem satisfaçam a padrões específicos de qualidade. A GQ é concernente ao monitoramento e documentação do desempenho laboratorial através de testes de qualidade e auditorias regulares, funcionando como uma aferição do CQ do laboratório.

O relatório NRC de 1992 propôs um programa de regulamentação de tipagem de DNA e indicou alguns componentes de CQ e GQ. São eles:

- a.* cada analista deve ter instrução, treinamento e experiência compatíveis com a análise que realiza e o testemunho que oferece;
- b.* os analistas devem ter ampla compreensão dos princípios, usos e limitações dos métodos e procedimentos aplicados aos testes realizados;
- c.* os analistas devem submeter-se, com sucesso, a testes periódicos de qualidade, e seu equipamento e procedimentos devem satisfazer a critérios específicos;
- d.* os reagentes e o equipamento devem ser adequadamente mantidos e monitorados;
- e.* os procedimentos usados devem ser geralmente aceitos e apoiados por dados publicados e revisados, cientificamente coletados e registrados;
- f.* controles adequados devem ser especificados nos procedimentos e devem ser usados;
- g.* novos procedimentos técnicos devem ser amplamente testados para demonstrar sua eficácia e confiabilidade no exame do material da prova, antes de serem implementados no processo;
- h.* devem existir procedimentos claramente redigidos e bem compreensíveis para manipular e preservar a integridade da prova, para sua segurança no laboratório e defesa do laboratório;

- i. cada laboratório deve participar de um programa externo de testes de qualidade que periodicamente avalie a capacidade de seus analistas e a confiabilidade de seus resultados analíticos;
- j. registros do caso – como observações, folhas com anotações, autoradiografias e bancos de dados populacionais – e outros dados ou registros que apóiem as conclusões dos examinadores devem ser preparados e arquivados pelo laboratório, ficando à disposição para inspeção do tribunal, após revisão da procedência de uma petição.

O relatório NRC de 1996 reafirma as diretrizes do relatório de 1992 e ainda discute o papel dos testes de qualidade e das auditorias, faz observações para que erros sejam evitados, discorre sobre a importância da repetição de testes, fazendo recomendações neste sentido.

Testes de qualidade e auditorias são mecanismos-chave para avaliação do desempenho de um laboratório. Para testar a proficiência, exige-se que sejam testadas as amostras apresentadas ao laboratório da mesma forma que as amostras rotineiramente recebidas para análise. As auditorias são revisões das operações do laboratório para determinar se ele está se desempenhando de acordo com um padrão definido. Estas avaliações podem ser conduzidas interna ou externamente, sendo que bons programas de GQ utilizam regularmente avaliações internas e externas.

Em testes abertos de proficiência, o analista tem consciência de que as amostras que estão sendo usadas em um teste de qualidade. Ele recebe um conjunto de amostras de um caso simulado e deve determinar quais amostras têm a mesma origem. Testes de excelência públicos avaliam os métodos analíticos e a interpretação dos resultados, identificam problemas sistemáticos devido a equipamentos, materiais, ambiente do laboratório (como contaminação) e erros de julgamento do analista. Estes testes são conduzidos por entidades externas e uma vantagem é que muitos laboratórios podem testar o mesmo conjunto de amostras, permitindo assim comparação, entre os laboratórios, do desempenho e da avaliação estatística dos resultados. Na implementação de programas de GQ, pode ainda ser realizada uma segunda modalidade de teste de excelência. Trata-se de um teste totalmente sigiloso, onde o analista não sabe que o teste está sendo conduzido. Tal

modalidade talvez forneça uma avaliação mais fidedigna da proficiência funcional. Entretanto, podem impor custos e demanda de tempo excessivos às instituições que fazem cumprir a lei (NRC, 1996).

Testes de qualidade na monitoração do desempenho laboratorial são complementados por auditorias regulares, a fim de comparar o desempenho real de um laboratório com os regulamentos e os objetivos de qualidade que ele declara ter. As auditorias, além de examinar todas as fases das operações laboratoriais relacionadas com o desempenho, tratam de outros assuntos não cobertos pelos testes de qualidade, como registro de controle de casos e esquemas utilizados na calibração de equipamentos. O objetivo dos testes de excelência e das auditorias é o de melhorar o desempenho laboratorial através da identificação de problemas que precisam ser corrigidos.

Algum risco de erro é sempre inerente a toda atividade humana. Existem fontes potenciais de erro durante todo processamento de um vestígio, desde sua coleta até a interpretação dos resultados de sua análise, sendo preocupante a ocorrência de erros que possam levar a condenações injustas.

Para que os resultados analíticos sejam precisos, devem ser tomados cuidados e atenção a detalhes, e se proceder a verificações independentes em todas as etapas da marcha analítica. Misturas ou identificação incorreta das amostras ou resultados podem ocorrer em qualquer ponto em que a amostra é manipulada ou dados são registrados, podendo levar a falsos resultados. A proteção contra a manipulação incorreta da amostra em campo, qual seja, no local do crime ou no necrotério, inclui o treinamento do pessoal incumbido da coleta e a apresentação preferencial ao laboratório, quando possível, do vestígio como um todo ao invés de recortes ou raspagens. Erros de manipulação dos vestígios no laboratório podem ser minimizados determinando-se que apenas um item seja manipulado a cada vez. Erros ou confusões como os de transferência de amostra para tubo incorreto³⁵, colocação da amostra a ser testada em faixa ou célula incorreta do gel de eletroforese ou falha no registro de dados podem ser mitigadas pelo

³⁵ O Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo faz uso de uma ficha de controle interno de procedimentos para a supervisão da passagem das amostras de DNA para novos tubos durante a marcha analítica das diferentes etapas do exame (ANEXO 7). Os tubos contendo DNA são numerados, devendo esta mesma numeração ser seguida nos novos tubos receptores. Cada transferência efetuada pelo auxiliar técnico é acompanhada e conferida, minimizando assim a possibilidade de troca de amostras.

rigoroso cumprimento de procedimentos definidos para lidar com as amostras e registrar dados, conforme já discutimos anteriormente quando abordamos os procedimentos que consubstanciam a chamada cadeia de custódia que também constituem aspectos relevantes no estabelecimento da política de qualidade de um laboratório forense.

Testes múltiplos em uma mesma amostra podem servir para testar a compatibilidade ou incompatibilidade de resultados. Testar o gênero (com amelogenina) em casos que envolvam homens e mulheres pode também servir para verificação de compatibilidade.

Ainda que o analista não observe um resultado incompatível, um revisor independente pode detectar falhas de raciocínio analítico e de interpretação, sendo, por isso, comum e recomendável uma “segunda leitura” independente nos laboratórios forenses³⁶.

A guarda de porções da amostra original, bem como de porções dela em diferentes estágios dos testes, talvez seja uma proteção definitiva contra os erros de manipulação ou registro pois oferece a oportunidade de que novos testes sejam realizados e que qualquer dúvida alegada possa ser dirimida.

Problemas com reagentes, equipamentos, controles ou técnicas podem levar a testes deficientes e à obtenção de resultados ambíguos. A proteção contra estes problemas passa pela obediência de um programa de CQ com monitoração de reagentes e equipamentos. O uso de padrões e de controles positivos e negativos deve ser rotineiro, servindo para identificação de erros, modificações nos procedimentos analíticos, variação ou deterioração de reagentes e equipamentos.

Os relatórios NRC de 1996 e de 1992 dão grande atenção ao problema da contaminação dos vestígios com material humano nos testes forenses de DNA e indicam a existência de três tipos de contaminação.

³⁶ Neste sentido foi instituída no Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo uma ficha geral de acompanhamento das análises (ANEXO 8), com o intuito de favorecer o trabalho do revisor independente.

A primeira delas é classificada como *contaminação inadvertida* que pode ocorrer durante o manuseio das amostras seja pelo seu coletor ou por pessoas que pertençam ou não ao laboratório. As consequências deste tipo de contaminação são que as amostras podem parecer misturas de materiais de várias pessoas e, na pior das hipóteses, que somente a substância contaminante possa ser detectada ou se o próprio contaminante viesse do suspeito. A melhor proteção contra este tipo de contaminação é estabelecer procedimentos rigorosos de manipulação do material desde sua coleta até a chegada ao laboratório, bem como manter separadas as amostras questionadas e as de referência até o momento em que serão submetidas a eletroforese. Amostras controle ou brancas podem ser retiradas do ambiente de coleta ou de áreas adjacentes de manchas de sangue e sêmen para serem usados na determinação da existência de contaminação. Pode-se também, como já enfatizamos ao tratar da coleta de materiais, conhecer os perfis genéticos das pessoas que poderiam ter contribuído para a contaminação do material. Entretanto, a melhor forma para a verificação da compatibilidade está na redundância do teste, pois a chance de que múltiplas amostras estejam todas contaminadas da mesma forma é muito remota.

O segundo tipo de contaminação é aquele onde as amostras são contaminadas pela própria natureza e sendo, por isso, denominadas *amostras mistas*, como esfregaços vaginais pós-coito com mistura de sêmen e fluidos vaginais, e mistura de sangue derramado por pessoas diferentes. Como vimos, o DNA do esperma pode ser separado do DNA que não é esperma pela extração diferencial, o que não ocorre, entretanto, com as amostras mistas de sangue. Nestes casos, testar amostras coletadas em diferentes áreas de uma mancha pode permitir que os tipos genéticos presentes sejam mais claramente diferenciados.

O terceiro e último tipo é a contaminação denominada *carryover* ou *contaminação por transporte do produto da PCR*. Esta contaminação ocorre quando um produto de amplificação por PCR encontra seu caminho na mistura da reação antes que o DNA-alvo, isto é, o DNA que se quer analisar, seja adicionado. O produto *carryover* pode ser amplificado juntamente com o DNA-alvo e o resultado pode ser uma tipagem incorreta da amostra. A proteção contra este tipo de contaminação inclui o uso de diferentes locais de trabalho para manipular amostras pré-PCR e pós-PCR; uso de máscaras, luvas, toucas, aventais e capas protetoras de sapatos; uso de equipamentos aferidos e manutenção de fluxo unidirecional de material das áreas de trabalho pré-PCR para pós-PCR, de modo que

os produtos da PCR jamais tenham contato com as amostras a serem analisadas. Precauções com a esterilização de instrumentos, equipamentos como pipetas, centrífugas, vidrarias, tubos, bancadas e reagentes também podem servir de proteção contra este tipo de contaminação. Proceder à tipagem da amostra questionada antes da amostra referência também diminui a possibilidade de contaminação entre elas. O uso de controles-padrão brancos para a detecção de contaminação de reagentes e da área de trabalho também é medida recomendável, além da possibilidade de se fazer testes com porções guardadas da amostra para eliminação de dúvidas sobre a contaminação. A figura abaixo inserida esquematiza a organização e a montagem de um laboratório para análise em PCR, para evitar contaminação *carryover*.

Figura 9 – Sugestão para organização e montagem de laboratório para análise em PCR, com separação de áreas pré e pós PCR para evitar contaminação *carryover* (adaptado de REBOUÇAS, 2004).

Outras recomendações e sugestões para impedir a contaminação em laboratório que efetuam tipagem de DNA pela PCR estão contidas no ANEXO 9.

Ainda segundo o relatório NRC de 1996, outro erro que pode ser apontado são as distorções conscientes ou inconscientes causadas pelo analista que geralmente

levam ao pecado de omissão ao invés de execução. Provas com possibilidade de inocentar podem ser ignoradas ou rejeitadas. Resultados contraditórios nos testes, ou provas de misturas na amostra, podem não ser levados em conta. Tais distorções são de relativamente simplicidade de detecção se os resultados do teste forem criticamente revistos. Os procedimentos laboratoriais devem ser planejados de forma a detectar distorções e identificar casos verdadeiros de ambigüidade.

A possibilidade de repetição de testes talvez seja a melhor proteção que uma pessoa erroneamente acusada tenha para não ser falsamente incriminada. Tal oportunidade deve ser dada sempre que possível, pois representa uma oportunidade ou talvez a única para sanear erros que possam ter sido cometidos no decorrer do exame. Para tanto, as amostras recebidas para análise devem ser divididas em duas ou mais partes e uma ou mais delas devem ser guardadas para a possível repetição. As amostras guardadas devem ser colocadas separadamente das amostras analisadas e sob condições que inibam a perda por deterioração. Se um novo teste for necessário, deve ser feito, de preferência, por um laboratório independente, ou por pessoas diferentes.

O rápido desenvolvimento e a aceitação universal da tecnologia baseada em DNA para identificação humana em casos forenses são em grande parte devido à colaboração ativa entre os grupos internacionais que são coordenados por várias instituições acadêmicas e patrocinadas por diferentes governos. Recomendações de padronização, edições de programas de CQ e GQ e atividades colaborativas têm sido feitas em nível global (JOBLING; GILL, 2004).

Dentre as entidades internacionais que coordenam grupos de genética forense, podemos destacar, além do *National Research Council (NRC) - Committee on DNA Forensic Science*, cujas recomendações foram sobejamente exploradas neste trabalho, as seguintes:

- a. *International Society of Forensic Genetics (ISFG)* que coordena a *DNA Commission*, o grupo *EDNAP – European DNA Profiling* e o *Paternity Testing Workshop*. A proposta desta entidade é a de promover conhecimentos de Genética Forense, através de

recomendações para uso de marcadores de DNA e harmonizar as tecnologias de DNA empregadas na Europa;

- b. *European Network of Forensic Science Institute* (ENFSI). Esta entidade representa principalmente as instituições governamentais européias. Seu trabalho é o de coordenar esforços para o desenvolvimento de um banco de dados de DNA europeu;
- c. *American Academy of Forensic Science* (AAFS). É um corpo acadêmico formado por cientistas forenses norte-americanos e que serve de foro para discussões sobre trabalhos com DNA;
- d. *Federal Bureau of Investigation* (FBI): possui o SWGDAM – *Scientific Working Group DNA Analysis Methods*. Este grupo norte-americano é responsável por estabelecer padrões, dar treinamento e desenvolver o banco de dados nacional de DNA;
- e. *National Institute of Science and Technology* (NIST). Este instituto dá suporte técnico à comunidade forense pela organização colaborativa de exercícios de proficiência. Possui um banco de dados que contém as características dos marcadores de STRs e SNPs úteis para a prática forense;
- f. *Academia Iberoamericana de Criminalística y Estudios Forenses* (AICEF) possui o *Grupo Iberoamericano de Trabajo en Análisis de DNA* (GITAD). Este grupo congrega laboratórios forenses da comunidade ibero-americana, estabelecendo estudos de controle de qualidade e de intercâmbio de dados.

Em nível nacional, a Sociedade Brasileira de Medicina Legal (SBML) editou, em 1999, recomendações para laboratórios que realizam testes de paternidade através de DNA. Trata-se de uma tentativa de normatização de adesão voluntária. Formou-se também, à mesma época, um Comitê Técnico Especializado de Biologia Molecular

(CTLE 04) do Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, para o estudo de parâmetros de sistematização voltado para a análise de DNA.

Programas de credenciamento voluntário não são suficientes, pois associações não têm autoridade regulamentar e os laboratórios forenses poderiam evitar o credenciamento e mesmo assim oferecer provas pautadas na tipagem de DNA em processos criminais.

O Projeto de Lei Nº 2.642/2000³⁷, de autoria do ex-Deputado Federal Zenaldo Coutinho, previa a necessidade de capacitação e aparelhamento dos laboratórios de análise de DNA e a sua obrigatoriedade de participação de programa de acreditação e de controle de qualidade. Este projeto de lei, apesar de haver tramitado por várias mesas e

³⁷ PROJETO DE LEI Nº 2642, de 2000.

Dispõe sobre as condições para a realização e análise de exames genéticos em seres humanos.

O CONGRESSO NACIONAL decreta:

Art 1º A análise de material genético em seres humanos, para determinação de paternidade, vínculos biológicos, doenças genéticas e demais casos obedecem ao disposto nesta lei.

Art 2º Para realizar os exames referidos no artigo anterior, o laboratório deve estar capacitado e aparelhado para a prática de genética molecular, na forma em que dispuser o regulamento, e participar de programa de acreditação e controle de qualidade do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) e da Sociedade Brasileira de Genética, que emitirão anualmente licença para seu funcionamento.

Art 3º A assinatura dos laudos, atestados e resultados de exames provenientes da análise de material genético humano deve ser feita por profissionais graduados em quaisquer das Ciências da Vida e que possuam pós-graduação ou mestrado em Genética ou Biologia Molecular, do quadro de funcionários do respectivo laboratório.

Art 4º A utilização dos dados genéticos com a finalidade de proceder ao aconselhamento genético caberá a médicos, com pós-graduação ou mestrado em genética clínica.

Art 5º O laboratório que descumprir os requisitos desta lei será interditado até sua adequação às exigências elencadas.

Art 6º Esta lei entra em vigor na data de sua publicação.

JUSTIFICATIVA

A evolução do conhecimento e da técnica no campo da genética humana tem sido espantosa, abrindo, a um só tempo, grandes perspectivas e imensos dilemas profissionais, sociais, econômicos e éticos para a humanidade. Exemplo eloqüente dessa afirmação são as conseqüências que um simples exame de DNA pode gerar junto à família e ao patrimônio de um indivíduo, com a confirmação ou não da alegada paternidade. Quem procede, no Brasil, os exames genéticos? Quais são os profissionais? Quais as suas habilitações? Quais são os laboratórios? Quais os equipamentos e aparelhos utilizados? Quem os controla e fiscaliza? O ilustre professor Zeno Veloso, civilista renomado no Pará e no Brasil, inspirou-me a buscar, mediante legislação federal, garantias ao cidadão usuário destes serviços. Para nosso espanto, inúmeras são as denúncias de descontrole absoluto da matéria. Profissionais desqualificados, laboratórios desaparelhados, tecnologias ultrapassadas e imprecisas. E, em contrapartida, o Judiciário e a sociedade como um todo admitem, como verdade inquestionável, o resultado proveniente desses exames, em razão das informações amplamente difundidas sobre a credibilidade desses procedimentos da ciência moderna. Não se leva em conta que nem todos - ou muitos - não dispõem do conhecimento e equipamentos que possam produzir esta verdade. Desse modo, estamos oferecendo proposição no sentido de disciplinar critérios para os laboratórios e para os profissionais que atuam nessa área, estabelecendo requisitos de acreditação e controle de qualidade para aqueles e de formação e de reconhecimento para esses. Cremos que deste modo estaremos contribuindo para a elevação do padrão de qualidade e de confiabilidade dos procedimentos laboratoriais e dos processos judiciais decorrentes.

comissões da Câmara dos Deputados, foi arquivado em 31 de janeiro de 2003 por haver findado a legislatura do Deputado.

Urge a criação de leis neste sentido, pois as justificativas apontadas pelo Deputado Zenaldo Coutinho para a criação de seu projeto de lei, apesar de nebuloso em relação aos laboratórios forenses criminais, são ainda atuais e verídicas. É notório que a existência de lei no sentido de assegurar padrões elevados no desempenho laboratorial constituirá um grande avanço, sem, contudo, representar o efetivo alcance de seus propósitos, correndo o risco de se transformar em letra morta, haja vista o despreparo geral para seu cumprimento imediato e quiçá posterior.

É digna de louvor a iniciativa governamental brasileira que, antes de tentar suprir qualquer lacuna legal, está promovendo um trabalho basal para preparar material e tecnicamente os laboratórios de órgãos periciais responsáveis pela análise forense de DNA para o cumprimento dos padrões de excelência ditados pelas entidades que acima citamos. Isto se dará com a implementação do Projeto de Implantação de Laboratórios Regionais de DNA da Secretaria Nacional de Segurança Pública do Ministério da Justiça (SENASP/MJ), iniciado em 2003, que, dada a sua importância, deve ser ressaltado.

Este projeto tem como objetivo geral a implantação de laboratórios de DNA forense em todo o território nacional, dotando os Estados do RS, RJ, DF, BA, AL, PA e AM como laboratórios regionais modelos que possibilitem a difusão de atividades de ensino, pesquisa aplicada e formação de recursos humanos na área pericial, para atendimento da demanda de suas áreas.

Como objetivos específicos, o projeto tem as seguintes metas:

- a.* definir técnicas, metodologias e procedimentos adotados em exames de DNA aceitos pela comunidade científica, que serão adotadas por todos os laboratórios regionais nas áreas de pesquisa, desenvolvimento, ensino e execução de exames periciais;
- b.* definir critérios para elaboração de um banco de dados nacional de DNA forense;

- c. desenvolver atividades de pesquisas conjuntas entre os órgãos periciais e as universidades, nos campos de genética humana, genética forense e biologia molecular;
- d. possibilitar o intercâmbio entre os profissionais dos institutos de perícias com o corpo docente universitário, trazendo o implemento de novas tecnologias na área de DNA forense;
- e. fomentar a multiplicação da “cultura do DNA”;
- f. promover a validação das metodologias empregadas em todos os laboratórios.

O projeto estabelece como laboratório mínimo aquele no qual a quantidade de equipamentos e insumos necessários para que opere com capacidade de realizar 900 exames (reações) de DNA.

Em relação à capacitação de pessoal, deverá ser realizado curso de especialização em genética forense de 360 horas, com objetivo de especializar cerca de dois peritos de cada Estado e seis da Polícia Federal. Será ainda realizado um curso prático avançado de 120 horas que constará de treinamento e trabalho nos laboratórios regionais para cerca de 90 peritos, 60 dos quais tenham freqüentado o curso anterior e cerca de 30 que já possuam conhecimentos em DNA.

Ao laboratório regional caberá a realização de pesquisas, desenvolvimento de tecnologia, e execução de exames de DNA criminais oriundos de sua área de atendimento. Atenderá no máximo dois peritos simultaneamente, devidamente capacitados para realizarem os exames periciais de DNA, de cada Estado de sua região de atendimento. A SENASP/MJ poderá deslocar peritos de outros Estados, fora da região de atendimento, para laboratórios regionais com condições de atendimento.

Os laboratórios regionais obedecerão a critérios e procedimentos adequados de coleta, cadeia de custódia e recebimento de amostras de acordo com a Resolução SSP/SP 194, de 02.06.99.

Os laboratórios deverão possuir estrutura para recebimento, armazenamento e custódia das amostras criminais de sua competência.

Serão também as instituições responsáveis pela multiplicação e fomento da “cultura do DNA” no ambiente da investigação criminal.

Serão, ainda, instituições de suporte técnico-científico para a criação de um banco de dados de perfis genéticos criminais, e da criação de uma “massa crítica” de dados para a formação do banco de dados de DNA criminal nacional.

Para o bom andamento dos trabalhos poderão ser publicadas normas locais como resoluções, instruções normativas, manuais, livros e artigos, sem prejuízo dos demais Estados de sua área de atendimento.

O coordenador do laboratório regional poderá:

- a. negar o recebimento de amostras que não se enquadrem nas normas estabelecidas anteriormente (coleta inadequada, cadeia de custódia inadequada, outros);
- b. fiscalizar a capacitação técnico-científica dos peritos que atuarão em seu laboratório, de acordo com os cursos acima estabelecidos ou com experiência comprovada;
- c. organizar, de forma a maximizar, o atendimento a cada Estado de sua área de atendimento.

Em relação à tecnologia laboratorial, para os laboratórios regionais do Distrito Federal, Bahia e Amazonas será aportado um laboratório mínimo padrão, que propiciará a realização de cerca de 900 análises. Para os laboratórios regionais que

possuem equipamentos adquiridos ou estejam em funcionamento (Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) serão aportados recursos para que os mesmos sejam nivelados aos demais.

Pretende-se estabelecer padronização de procedimentos, principalmente no que concerne à geração de perfis alélicos, tendo em vista a alimentação de um banco de dados de perfis genéticos de âmbito nacional, a ser desenvolvido e utilizado no futuro.

Será preferencialmente adotada a detecção os fragmentos de DNA por meio de fluorescência, com a utilização de analisadores genéticos (seqüenciadores) com quatro capilares, com capacidade de ler pelo menos cinco fluorescências diferentes. Esta definição justifica-se pela compatibilidade desses equipamentos com os *kits* comerciais de identificação humana de mais de um fabricante e pela compatibilidade com *softwares* de interpretação.

Com relação à genotipagem, seqüenciamento e comparação de seqüências de DNA, serão utilizadas escadas alélicas certificadas, adotadas internacionalmente; controle de qualidade periódico com trocas de amostras entre os laboratórios para experimentos do tipo duplo cego; realização de procedimentos para validação das técnicas a serem utilizadas nos laboratórios e exames de polimorfismos de fragmentos de DNA e de seqüências.

Os sistemas (multiplex) a serem utilizados serão aqueles validados, divulgados e utilizados pela comunidade científica internacional e permitirão a produção de dados que sejam intercambiáveis com as polícias internacionais.

Os laboratórios regionais disporão de um pulverizador de amostras com nitrogênio líquido, de tal forma a estarem aptos a trabalhar com amostras mais difíceis como ossos e dentes, e prestarem suporte regional aos demais Estados.

Para a manutenção das atividades dos laboratórios regionais após a execução deste projeto, serão necessários novos aportes financeiros. Estes aportes poderão ser feitos pelos Estados da área de atendimento para seus respectivos laboratórios regionais por meio de dotações orçamentárias específicas.

Poderão ser estabelecidos convênios estaduais entre universidades e órgãos de perícia, por meio de fundações, para o intercâmbio de equipamentos, recursos humanos e verbas.

Também serão estabelecidos convênios entre a SENASP/MJ e as Secretarias de Segurança Pública dos Estados, com possibilidade de participação do Ministério da Ciência e Tecnologia e de universidades.

Especificamente em relação a exercícios colaborativos e controle de qualidade, os laboratórios regionais e demais laboratórios interessados participarão de exercícios anuais, definidos pelos laboratórios regionais em parceria com universidades.

Para estes propósitos, o projeto sugere a adoção das seguintes fases:

- a.* formulário de procedimentos;
- b.* recebimento de amostra e tipagem e
- c.* visita de certificação (auditoria) a cada dois anos.

No intuito de promover o intercâmbio entre profissionais dos institutos periciais e das universidades, será criada uma página na Internet pela equipe do Laboratório de DNA da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A concepção da página será com área restrita, mediante o uso de senha, para disponibilização de protocolos, artigos, informações, novidades, tabelas de frequências alélicas e haplotípicas, entre outras, de forma a constituir uma revista eletrônica.

Com o objetivo de discutir as estratégias de disseminação da “cultura do DNA”, será constituído um grupo de discussões de genética forense que poderá comunicar-se através de mensagens eletrônicas na presença de um moderador, ou por meio de discussões *on-line* (reuniões virtuais) esporádicas. Este grupo será denominado de Rede Nacional de Genética Forense e terá como objetivo integrar os laboratórios universitários e os laboratórios periciais. Contudo, a questão mais importante a ser discutida pelos profissionais que integrarão a rede, será a criação de bancos de dados de perfis genéticos,

cuja concepção, criação, normalização e alimentação deverão levar em conta a opinião de diversos especialistas em DNA e em Direitos Humanos.

Idealiza-se ainda a criação de um banco de dados nacional de perfis genéticos que, a princípio, imagina-se poder comportar dados sobre criminosos (condenados), vestígios encontrados em locais de crime ou retirados de vítimas de crimes sexuais, pessoas desaparecidas ou restos mortais não identificados.

CAPÍTULO IV

O LABORATÓRIO DE DNA DO INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DE SÃO PAULO

1. Introdução

Desde março de 1999 o Instituto de Criminalística de São Paulo (IC) disponibilizou oficialmente os serviços de seu Laboratório de DNA. Além de pretender auxiliar nas análises antropológicas para identificação de cadáveres realizadas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo (IML), a implantação deste laboratório teve por objetivo principal oferecer à investigação policial e judicial elementos que pudessem objetivamente contribuir não apenas para a exclusão de suspeitos, mas para a determinação da autoria de crimes cometidos.

Houve necessidade de treinamento de sua equipe de peritos. Foram realizados estágios com marcadores genéticos moleculares nos laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, da Polícia Civil do Distrito Federal e do *Sheriff's Office de West Palm Beach*, na Flórida.

A equipe de peritos é composta por profissionais com formação em ciências biológicas, biomédicas e farmacêuticas, todos com especialização em biologia molecular reconhecida pelos respectivos conselhos profissionais. Os técnicos de laboratório têm graduação em ciências biológicas e os estagiários selecionados são geralmente estudantes das ciências da vida.

Durante os primeiros passos de nosso treinamento, antes mesmo de dar princípio ao atendimento de casos, fornecemos os fundamentos técnicos, jurídicos e éticos para a edição da Resolução SSP 194/99 que trata de coleta, acondicionamento e custódia dos materiais biológicos que serão submetidos à análise.

No início do funcionamento do laboratório, as análises de DNA eram realizadas pelo estudo de *loci* de sistemas monoplex, triplex, e quadriplex, revelados por precipitação de prata. Atualmente são empregados sistemas multiplex, detectados por meio

de plataformas de análise fluorescente da Hitachi Genetic System e da Applied Biosystems, não sendo ainda realizadas análises em DNA mitocondrial.

O Laboratório de DNA do IC segue as recomendações do NRC feitas nos relatórios de 1992 e 1996, cabíveis à metodologia empregada e adota uma política de qualidade seguindo as orientações do GITAD, ao qual são filiados alguns de seus peritos.

2. Análises realizadas

Desde sua fundação até julho de 2005, foram recebidos 1.638 casos, resultando na análise de mais de 4.000 perfis genéticos. As formas de apresentação dos materiais biológicos recebidos para análise são variadas. Entretanto, as perícias realizadas pelo laboratório podem ser assim classificadas:

- a. *identificação de cadáveres*: exames feitos em amostras cadavéricas como ossos, dentes, músculos, vísceras e outras, e sangue de supostos familiares;
- b. *confrontos genéricos*: realizados entre amostra questionada, geralmente coletada em local de crime, e amostra-referência do suspeito, da vítima ou de ambos;
- c. *crimes sexo-relacionados*:
 - *futuro confronto*: exame para a constatação da presença de espermatozóides e obtenção antecipada de perfis genéticos, realizado em peças de vestuário, *swabs* e esfregaços em lâminas de microscopia;
 - *confronto*: entre materiais da vítima (amostra questionada e amostra-referência) e sangue do suspeito e companheiro sexual, quando for o caso;
 - *teste de paternidade*: exame realizado com amostras da vítima de estupro, da criança e do suspeito.

A título de colaboração, realizamos ainda testes de paternidade envolvendo restos mortais para a Justiça Cível gratuita, uma vez o Instituto de Medicina Social e Criminologia de São Paulo - IMESC, órgão estatal responsável pelos testes de DNA oriundos de litígios cíveis, somente procede a análises de materiais biológicos de pessoas vivas. Em algumas oportunidades, efetuamos graciosamente testes de identificação em cadáveres para a Justiça Criminal de outros Estados da Federação.

Para ilustrar o presente trabalho, realizamos um levantamento de dados nos registros dos laudos emitidos pelo Laboratório de DNA do IC sobre análises de sistemas multiplex, expedidos entre janeiro de 2003 e agosto de 2004, compreendendo um período de 20 meses. Foram analisados 599 casos e os dados obtidos em nossa pesquisa serão a seguir comentados.

No período analisado, foram recebidos 238 casos referentes à identificação de cadáveres. Entretanto, dada a complexidade da metodologia empregada para a análise de ossos e dentes, resolvemos por bem isolar os dados dos casos que continham estas amostras. Assim, foi apurado que dos 150 casos envolvendo vestígios ósseos e dentários, 73 deles foram conclusivos, indicando a existência de vínculo genético familiar em 61 casos e 12 exclusões deste tipo de vínculo. A perícia foi inconclusiva para 77 casos. A Figura 10 ilustra percentualmente os dados obtidos nestas análises.

Figura 10 – Resultados obtidos nas análises de 150 casos de identificação de cadáveres, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

O alto número de perícias inconclusivas nestes casos pode ser explicado, na maior parte das vezes, pelo estado de conservação e pelo tempo de existência dos materiais encaminhados que implicam a degradação do DNA. Para o exame de materiais ósseos ou

dentários muito antigos é recomendada a tecnologia de análise de DNA mitocondrial, ainda não disponível do IC. A Figura 11 ilustra em termos percentuais a taxa de sucesso alcançado nas perícias dos 150 casos de identificação cadavérica.

Figura 11 – Taxa de sucesso nas análises de 150 casos de identificação de cadáveres, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Dos 238 casos recebidos referentes à identificação de cadáveres, 88 deles diziam respeito a cadáveres recentes e, por isso, continham amostras de sangue ou de vísceras ou mesmo de tecido muscular, facilitando a análise de DNA. Em consequência disto, foram agrupados com outros casos recebidos concernentes à análise de vestígios oriundos de locais de crime e que exigiam o mesmo tratamento analítico. Desta forma, estes 88 casos foram integrados a um grupo maior, perfazendo 177 casos. Dos 177 casos envolvendo a análise de DNA extraído de sangue, bulbos capilares, vísceras e outros tecidos, 131 deles foram conclusivos, indicando a existência de vínculo genético familiar ou combinação de perfis genéticos em 92 casos e 39 exclusões de qualquer de vínculo genético. A perícia foi inconclusiva para 46 casos. A Figura 12 ilustra percentualmente os dados obtidos nestas análises.

Figura 12 – Resultados obtidos nas análises de 177 casos de identificação em restos cadavéricos e outros vestígios, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Aqui o número de perícias inconclusivas pode ser explicado pela deficiência na conservação das amostras, pela exigüidade do material encaminhado ou ainda pela presença de contaminantes inibidores da PCR. A Figura 13 ilustra em termos percentuais a taxa de sucesso alcançado nas perícias dos 177 casos analisados.

Figura 13 – Taxa de sucesso nas análises de 177 casos de identificação em restos cadavéricos e outros vestígios, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Dos 599 casos recebidos no período analisado, 272 deles foram referentes a crimes sexuais. Os casos deste tipo costumam ser separados pelo Laboratório de DNA do IC pela existência ou não de amostras que permitam o confronto pretendido. Quando presente a amostra-referência do suspeito, são classificados como casos fechados e na ausência dela, futuro confronto. Dos 272 casos relativos a crimes sexuais, 116 deles foram de futuro confronto. Destes, 91 foram conclusivos, sendo que 49 deles indicaram a

possibilidade de confronto e 45 não. A perícia foi inconclusiva para 25 casos. A Figura 14 ilustra percentualmente os dados obtidos nestas análises.

Figura 14 – Resultados obtidos nas análises de 116 casos de futuro confronto em crimes sexo-relacionados, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

O número de perícias inconclusivas nestes casos pode ser explicado pela exigüidade do material encaminhado ou mesmo pela ausência de qualquer material biológico detectável. Interessante notar que estes casos inconclusivos se diferenciam daqueles conclusivos, sem possibilidade de futuro confronto. Nestes ou material biológico masculino está ausente ou a impossibilidade da análise se dá pela presença de interferentes inibidores da PCR, o que é comum ocorrer com lâminas coradas. A Figura 15 ilustra em termos percentuais a taxa de sucesso alcançado nas perícias dos 116 casos analisados.

Figura 15 – Taxa de sucesso nas análises de 116 casos de futuro confronto em crimes sexo-relacionados, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Ainda no que concerne aos crimes sexuais, 156 casos fechados foram analisados. Destes, 61 foram conclusivos, sendo que 37 deles levaram à inclusão do suspeito pela combinação de seu perfil genético com aquele encontrado no vestígio retirado da vítima e 24 deles à exclusão do suspeito. A perícia foi inconclusiva para 95 casos examinados. A Figura 16 ilustra percentualmente os dados obtidos nestas análises.

Figura 16 – Resultados obtidos nas análises de 156 casos de confronto em crimes sexo-relacionados, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Aqui o altíssimo número de perícias inconclusivas pode ser esclarecido por três causas concorrentes: *a)* o insucesso das análises pelas mesmas razões apontadas para os casos de futuro confronto que resultaram inconclusivos por exigüidade de material ou conclusivos sem possibilidade de confronto; *b)* pela demonstração gráfica considerando como inconclusivos a somatória de casos com exigüidade de material e casos sem possibilidade de confronto; e *c)* pelo péssimo estado de conservação que as amostras questionadas são encaminhadas ao laboratório. Esta última causa se dá pelo não encaminhamento imediato destas amostras ao laboratório, remanescendo por longo tempo, sem o devido acondicionamento, em distritos policiais no aguardo da aparição de um suspeito. A Figura 17 ilustra em termos percentuais a taxa de sucesso alcançado nas perícias dos 156 casos analisados.

Figura 17 – Taxa de sucesso nas análises de 156 casos de confronto em crimes sexo-relacionados, realizadas pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Dos 599 casos recebidos, nos 20 meses analisados, 238 deles foram referentes à identificação de cadáveres; outros 89 concernentes à análise de vestígios oriundos de locais de crime e os 272 restantes foram relativos a crimes sexuais. A Figura 18 ilustra percentualmente os tipos de análises realizadas e a Figura 19 informa os percentuais da taxa de sucesso geral alcançado nestas perícias.

Figura 18 – Classificação das análises realizadas pelo Laboratório de DNA do IC em 599 casos, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Figura 19 – Taxa geral de sucesso nas análises de 599 casos realizados pelo Laboratório de DNA do IC, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2004.

Acreditamos que a taxa geral de sucesso das análises realizadas pelo Laboratório do IC esteja dentro dos índices esperados para um laboratório de DNA voltado à elucidação de crimes e identificação de pessoas, onde, por mais que se queira, não se tem escolha sobre o tipo e a qualidade das amostras recebidas. Um trabalho didático mais profundo junto aos responsáveis pela coleta, acondicionamento e envio destas amostras, bem como o aperfeiçoamento de metodologias e de reagentes por certo ajudariam a elevar o índice de sucesso nas análises. Contudo, sempre restarão questões de ordem prática no tratamento analítico de materiais não ideais.

Quanto ao número de casos analisados, em média 30 por mês no período analisado, este se mostra condizente com a capacidade de atendimento de um laboratório de pequeno porte como é o do IC. Contudo, julgamos que este número não seja representativo frente aos notórios índices de violência e criminalidade no Estado de São Paulo. Temos notícias que cerca de 6.000 cadáveres são inumados por ano como desconhecidos. Mesmo levando em conta que grande parte deles não é reclamada e que muitos são identificados posteriormente por técnicas antropológicas diferentes do DNA, o número dos identificados através do estudo do DNA é muito reduzido.

O mesmo ocorre em relação aos crimes sexuais. O número de atendimentos internamente divulgado nesta área ultrapassa 5.000 casos por ano, somente na Grande São Paulo, contrapondo-se a uma média de 160 casos recebidos por ano de todo o Estado para análise de DNA no período analisado.

Em relação à análise de vestígios coletados em locais de crime, não podemos fazer ilações concretas em virtude da enorme diversidade dos crimes cometidos, cujos vestígios deixados podem dar azo a exames de DNA. Entretanto, podemos afirmar com convicção que a média de apenas 54 casos recebidos por ano no período analisado é indubitavelmente irrisória, fazendo-nos crer que providências urgentes devam ser tomadas no sentido de promover mudanças no critério de eleição dos vestígios a serem coletados.

3. Projetos e pesquisas em andamento

Paralelamente ao atendimento de casos, os componentes da equipe do Laboratório de DNA do IC realizam algumas pesquisas e tecem parcerias com outras entidades.

Na área dos crimes sexo-relacionados, o laboratório já realizou estudos para facilitação e melhoria da coleta e armazenamento de amostras-referência e ensaios para a determinação do número mínimo necessário de espermatozóides para o sucesso no exame de DNA. Atualmente faz estudos sobre diferentes metodologias de coleta de material vaginal de vítimas de estupro, principalmente do lavado vaginal, de modo a tornar o material coletado mais rico em espermatozóides. Esta pesquisa vem sendo desenvolvida em parceria com o *Programa Bem-Me-Quer* da Secretaria de Segurança Pública de São Paulo, voltado ao atendimento de vítimas de abuso sexual. Encontram-se ainda em andamento, estudos para validação de metodologia para análises do cromossomo Y e ensaios para introdução de novos testes confirmatórios para a presença de sêmen, baseados na P-30 e na quantificação da fosfatase ácida, dado o grande número de homens vasectomizados na atualidade.

No tocante à análise de pêlos e cabelos, o laboratório possui um projeto para determinação do número mínimo necessário de bulbos para a aplicação da metodologia disponível e melhor forma de conservação destes materiais.

No campo da identificação de cadáveres, o Laboratório de DNA do IC participa de alguns projetos. O primeiro deles foi elaborado em conjunto com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP de Araraquara,

para a formação de um banco de dados civil contendo informações genéticas de cadáveres desconhecidos e supostos familiares. Este projeto ainda se encontra sob análise da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP, porém avanços significativos já foram feitos no desenvolvimento do *software* que administrará as comparações dos perfis genéticos.

O segundo projeto do qual o laboratório de DNA participa foi recentemente desenvolvido pelo Instituto Oscar Freire da Faculdade de Medicina da USP e é, em parte, semelhante ao primeiro. Denomina-se *Projeto Caminho de Volta: Busca de Crianças Desaparecidas no Estado de São Paulo*. Este projeto tem o objetivo de contribuir na identificação de crianças, otimizando o atual sistema de busca, registro de dados, troca de informações e apoio às famílias dos desaparecidos. A contribuição do Laboratório do IC será a de realizar análise de DNA nas ossadas infantis encontradas.

O terceiro projeto está sendo desenvolvido pela Faculdade de Odontologia da USP e pretende o aperfeiçoamento de metodologia para estudos de DNA mitocondrial em material dentário, bem como a criação de um banco de dados. A contribuição do Laboratório de DNA do IC neste caso será apenas a de ceder material cadavérico.

Foi realizado nas dependências do Laboratório de DNA do IC um teste de validação, com 1291 amostras oriundas de casos criminais e de paternidade, em conjunto com técnicos da Dialab Diagnósticos, da Amersham Pharmacia, da UNESP de Araraquara e peritos criminais do Paraná, Minas Gerais e Distrito Federal, para o uso do *kit* PowerPlex™ 16 da Promega Corporation no analisador capilar MegaBace™ da Amersham Pharmacia.

No sentido de auxiliar a implementação do Centro de Custódia de Vestígios e Provas de que está sendo instalado na sede da Superintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo, o Laboratório de DNA do IC vem participando ativamente deste esforço, servindo como protótipo de suas atividades.

Pelo que foi exposto, é patente que as pesquisas realizadas pelo Laboratório de DNA do IC são aplicadas e buscam apenas a melhoria imediata dos serviços prestados, uma vez que a demanda destes serviços não permite que se alcem vãos maiores.

Entretanto, a descentralização futura dos serviços do laboratório em pólos regionais de Núcleos do Instituto de Criminalística do Interior talvez torne mais céleres suas análises e permita o aprofundamento de suas pesquisas.

Apesar do volume dos serviços prestados por este laboratório não ser significativo ante aos índices de criminalidade no Estado de São Paulo, pode-se concluir que seus esforços no sentido de auxiliar na identificação de cadáveres desconhecidos e na elucidação de crimes conferem-lhe certa relevância social, uma vez que tem contribuído para o oferecimento de um serviço policial e judicial mais eficiente e preciso aos cidadãos.

CAPÍTULO V

O EXAME DE DNA APLICADO AO PROCESSO PENAL E O SEU IMPACTO SOCIAL

1. A prova do DNA no sistema legal

A introdução de novas tecnologias causa preocupação em relação a seu impacto sobre a sociedade. A tecnologia da tipagem do DNA revolucionou as ciências forenses, tornando-se um marco divisório tanto para a Criminalística como para a Medicina Forense. O seu surgimento veio abalar as convicções e os critérios utilizados para o estabelecimento da certeza jurídica nas relações de filiação, campo do Direito Civil, e na formulação da culpabilidade, campo do Direito Penal (BONACCORSO, 2002).

As informações advindas desta tecnologia têm, além dos reflexos de ordem jurídica, outros que recaem sobre dados que a maior parte das pessoas reputa como extremamente particulares. Disto resulta que a utilização destas informações no sistema legal, principalmente nos processos criminais, envolve questões de ordem ética³⁸.

Os métodos forenses utilizados para individualização, assim como a tipagem do DNA, exigem habilidade e acurácia para poder precisar origens. Para que os exames resultantes da aplicação destes métodos sejam úteis judicialmente, é necessário o emprego de procedimentos cientificamente aceitáveis para garantir que comparações adequadamente realizadas possam distinguir possíveis origens. A aceitação científica do método laboratorial para comparar amostras e o fato de que as características estudadas no laboratório comprovam a identidade são questões distintas. Conseqüentemente, trataremos de abordá-las separadamente.

No sistema adversarial, adotado pela tradição anglo-americano, a iniciativa probatória incumbe preponderantemente às partes, entende-se que o melhor caminho para se alcançar a verdade é a contraposição das versões das partes, através da técnica do *cross-*

³⁸ Os dados genéticos resultantes de pesquisa associados a um indivíduo identificável não poderão ser divulgados nem ficar acessíveis a terceiros, notadamente a empregadores, empresas seguradoras e instituições de ensino, e também não devem ser fornecidos para cruzamento com outros dados armazenados para propósitos judiciais ou outros fins, exceto quando for obtido o consentimento do sujeito da pesquisa (RESOLUÇÃO CNS 340/04).

examination, onde as partes formulam suas questões diretamente às testemunhas. Neste sistema, inclusive, o perito é ouvido como testemunha da parte, sujeitando-se a todas as regras aplicáveis a elas. Uma preocupação neste sistema é a idoneidade das informações científicas trazidas pelo perito ao júri, de forma que somente as teorias genericamente aceitas pela comunidade científica podem embasar as opiniões periciais apresentadas, bastando que o juiz determine em cada caso se a técnica permitida é válida e que pode auxiliar os jurados no julgamento (GOMES FILHO, 1997).

A tecnologia usada para examinar VNTRs, STRs ou outros *loci* deve satisfazer aos padrões necessários das provas científicas. Nos Estados Unidos, existem dois padrões importantes para que se decida se os achados científicos serão admitidos como prova: *teste da aceitação* geral e padrão da *metodologia consistente* (NRC, 1996).

O padrão aceitação geral foi articulado pela primeira vez em um importante caso federal em 1923, *Frye v. Estados Unidos*. Em jurisdições que seguem este padrão o proponente da prova científica deve demonstrar que a teoria e a metodologia subjacentes são geralmente aceitas por setores relevantes da comunidade científica. O padrão da metodologia consistente teve origem no estatuto das regras federais sobre provas. Em *Daubert v. Merrell Dow Pharmaceuticals*, a Suprema Corte determinou que essas regras implicitamente alijassem a aceitação geral como um pré-requisito absoluto para a admissibilidade da prova científica. Contrariando o teste *Frye*, a corte preceituou um modelo mais amplo para decidir se o testemunho proposto tinha suficiente validade e confiabilidade científicas para ser admitido como conhecimento científico relevante que auxiliaria quem julga o caso (NRC, 1996).

A aplicação de padrões para admissibilidade da prova de DNA produziu resultados divergentes. A primeira onda de casos criminais envolvendo identificação pelo DNA começou em 1986. O enfoque estava nos problemas criados com a transferência de tecnologia da moderna Biologia Molecular dos laboratórios médicos e de genética para o laboratório forense que lida com material biológico degradado, escasso e, por isso, geralmente utiliza sistemas multialélicos complexos. Não obstante, a teoria subjacente, de que a determinação dos perfis de DNA é capaz de ajudar a identificar a origem de uma amostra nunca foi colocada em dúvida, o depoimento de peritos raramente foi contestado e os tribunais admitiram de imediato os achados laboratoriais (THOMPSON e FORD, 1989).

Após estes primeiros casos, especialistas de várias disciplinas passaram a examinar trabalho de laboratórios comerciais e governamentais. Como resultado disto, um grande número de questionamentos sobre os procedimentos e análises laboratoriais fez surgir uma segunda onda de casos em que vários tribunais excluíram alguns aspectos do DNA como prova. Contudo, a maioria dos tribunais continuou a considerar, apesar dos depoimentos conflitantes entre os peritos, admissíveis as combinações e probabilidades do DNA.

Após 1992, houve uma terceira onda de casos nos quais foram localizados menos os métodos laboratoriais para caracterizar e combinar o DNA, e mais os métodos estatísticos para interpretar a significância das semelhanças nas amostras do DNA. A difusão dos métodos baseados na PCR no campo forense fez chegar uma quarta onda de casos, envolvendo investidas contra os procedimentos para assegurar a precisão destas análises e questões sobre a interpretação quantitativa a tipagem genética. Mais uma vez a teoria subjacente não foi seriamente questionada, bem como, pelo menos em princípio, a habilidade dos laboratórios em obter resultados informativos. Os questionamentos giraram em torno da dúvida se os protocolos usados para o trabalho forense seriam suficientes para evitar resultados falso-positivos e sobre os procedimentos para estimar as frequências dos genótipos que são detectados após a amplificação pela PCR (NRC, 1996).

A maior parte das contestações sobre a admissibilidade dos resultados do DNA baseou-se em considerações como a de que os protocolos ou procedimentos seguidos pelos laboratórios não eram adequados para reduzir suficientemente o risco de erro, que não obedeceram aos protocolos estabelecidos ou que não conseguiram demonstrar sua capacidade para tipagem das amostras com exatidão em uma série de testes de qualidade. Assim mesmo, os tribunais mostraram pouca inclinação para excluir provas considerando esses fatos. Uma exceção importante ocorreu em Nova York, em 1989, no caso *O povo v. Castro*, no qual um tribunal concluiu que a teoria que fundamenta a tipagem do DNA é geralmente aceita pelos cientistas da genética e áreas relacionadas, que a tipagem de DNA também é aceita e é confiável, mas que a técnica, conforme aplicada neste caso em particular, tinha tantas falhas que não era possível afirmar que havia uma combinação de padrões de DNA. Havia várias falhas na declaração do laboratório sobre a combinação entre duas amostras, por inúmeras razões, incluindo a presença de várias bandas anômalas. O tribunal não deu crédito à explicação do laboratório sobre as razões das anomalias e criticou o seu insucesso em realizar um segundo teste adequado. Além disto, o tribunal

concluiu que o banco de dados da frequência populacional utilizado não podia fornecer uma estimativa precisa da probabilidade de que réu era a origem do DNA (NRC, 1992). Os equívocos deste caso levaram à criação de organismos com a finalidade de examinar cuidadosamente os diversos problemas na aplicação forense da tipagem do DNA, inclusive criando-se mecanismos seguros para um controle de qualidade (FRANÇA, 2000).

O progresso da ciência não garante uma pesquisa imune a erros e seus métodos, aceitos pela generalidade dos estudiosos, em um determinado momento, podem parecer errôneos no momento seguinte (DENTI, 1972). Uma das mais sérias preocupações com relação à evidência científica, recente ou não, é que ela possui uma aura de infalibilidade que pode influenciar as faculdades críticas de um júri.

O extraordinário desenvolvimento científico e tecnológico, propiciando o acesso a conhecimentos cada vez mais especializados e seguros, tem apresentado significativas repercussões no campo da prova na tarefa de reconstrução dos fatos no processo, a ponto de se afirmar que a perícia teria conquistado o reinado antes atribuído às confissões³⁹. Esse arsenal informativo de alta especialização pode servir para uma apuração mais exata da verdade, porém torna maior o risco⁴⁰ de que eventuais distorções da realidade, neste tipo de prova, não sejam percebidas pelo juiz e pela sociedade devido à complexidade das provas (GOMES FILHO, 1997).

Dadas as possibilidades de erro, o réu deve ou deveria ter direito a examinar a prova física apresentada no processo, incluindo-se aí o direito de testar novamente uma amostra que se encontra sob controle o sistema judicial ou policial. Entretanto, no tocante aos testes forenses de DNA, nem sempre isto é possível, tendo em vista a usual exigüidade

³⁹ Neste mesmo sentido: “Em relação à prova pericial pautada na tecnologia do DNA, ‘a rainha das provas’ suplantou todas as perícias hematológicas empregadas até então no debate judiciário civil e penal. O desenvolvimento da genética na última década abriu novos horizontes para a pesquisa científica, para as intervenções no campo biomédico e no campo das práticas jurídicas, que nos interessa mais particularmente [...] muitos operadores e usuários do direito assumem uma posição de adoração, quase chegando às raias do fanatismo e religiosa submissão aos laudos periciais e o emprego ilimitado desta prova espetacular começa a dar sinais de esgotamento e provoca questionamentos de ordem ética, social e jurídica” (LEITE, 1999).

⁴⁰ Neste mesmo sentido: “Mas temos que alertar para os grandes riscos e perigos que se corre com esta confiança cega, irrestrita, absoluta, nos testes genéticos. A veneração, a sacralização, a divinização do DNA (e sem, mesmo, ter-se conhecimento de quem faz ou de como foi feito o exame) é atitude desarrazoada, que tem causado transtornos e desvios. A questão ainda está envolvida de muita incerteza e insegurança. Em países muito mais desenvolvidos do que o nosso, os próprios cientistas têm sugerido que se tenha cuidado com a supervalorização dos testes de DNA” (VELOSO, 2000).

das amostras coletadas em cenas de crime. Daí que, quando testes posteriores não são exequíveis, tornam-se particularmente importantes, para aferição da manutenção da cadeia de custódia, as informações contidas no registro documental de todos os estágios do processo analítico.

Além das possibilidades de erro laboratorial, outros problemas também fizeram os tribunais norte-americanos inicialmente hesitar em admitir plenamente a prova pelo DNA. Estes problemas, entre outros, implicaram discussões sobre os métodos para caracterizar o grau observado de semelhança nos genótipos de DNA, em questionamentos sobre a representatividade dos bancos de dados utilizados para as estimativas das frequências dos genótipos, e em controvérsias sobre a subestrutura populacional. Não obstante, estas questões foram, de certa forma, pacificadas, em parte graças a estudiosos, cujos trabalhos são convertidos em recomendações em prol da excelência das análises de DNA como um todo, tais quais as que tivemos a oportunidade de discorrer neste trabalho, e à instituição de programas de CQ e GQ, fazendo com que o uso da informação sobre o DNA no sistema legal de tradição anglo-americana se firmasse como um poderoso auxiliar na determinação da culpabilidade ou da inocência. Entretanto, em nossa opinião, a causa subjacente da excelência alcançada é o tipo de contraditório ao qual a evidência de DNA fica submetida neste sistema que dá oportunidades a acirrados debates técnicos que indubitavelmente levam ao aprimoramento do modo de realização das análises.

O uso das informações sobre o DNA no sistema legal brasileiro tornou-se corriqueiro a partir do final da década de 1990 em litígios cíveis, e, posteriormente, conforme assinala Dotti (2000), o exame de DNA converteu-se em um dos mais recentes meios de convicção probatória com trânsito livre na investigação criminal, tanto na fase do inquérito policial como na instrução judicial, ficando sua adoção apenas subordinada aos princípios gerais de cabimento e realização das provas.

Percebe-se que, diferentemente do sistema anglo-americano, onde as regras de admissibilidade de provas são, como vimos, extremamente cautelosas e rígidas, a introdução das provas pautadas em exame de DNA no sistema legal brasileiro se deu de forma acrítica, tal qual se passa com as aquisições de produtos culturais estrangeiros em nossa sociedade.

No afã da modernidade, importamos a técnica sem, contudo, importar as soluções propostas para sua adequação e, o que talvez seja pior, principalmente nos laboratórios públicos, sem as mínimas condições materiais para desenvolvê-la com excelência e sem o preparo técnico exigido para a implementação de uma técnica de tão grande complexidade.

Talvez, se a forma de exercício do contraditório das provas periciais em nosso sistema se desse de modo mais crítico e vigoroso, pudéssemos com maior celeridade alcançar ao menos os patamares técnico-científicos mínimos exigidos para o uso seguro e adequado no sistema judicial das informações propiciadas pelo DNA. Assim sendo, passamos a discorrer sobre as características gerais de como se dá o contraditório das provas periciais em nosso sistema, para em seguida pontuarmos nossas assertivas quanto às melhorias técnicas não só para a excelência da prova de DNA, mas para provas periciais como um todo.

No sistema anglo-americano, o perito é introduzido no processo como testemunha da parte e presta depoimento oral, sujeito às mesmas regras de inquirição da prova testemunhal comum (inquirição direta e cruzada). Evita-se que ele possa trazer informações que não sejam do seu conhecimento pessoal. A parte contrária pode também trazer um especialista que será inquerido igualmente como testemunha e pode contrariar as opiniões do perito da outra parte.

Ressaltamos como prudente o impedimento de utilização de informações que não sejam da seara de conhecimento pessoal do perito, pois, uma vez evidenciado seu despreparo pela falta de domínio técnico, ficará patente a ausência de credibilidade da perícia por ele realizada. Infelizmente, a forma de contraditório exercida em nosso sistema não emprega, como veremos, este tipo de dispositivo, dando azo a um pernicioso comodismo, redundante em estagnação técnico-científica. E, pelos mesmos motivos, entendemos como salutar a previsão de inquirição do perito por seus pares, em contraditório.

No sistema acusatório que é o adotado pelo nosso ordenamento, observa-se constante preocupação com o contraditório, devendo todos os atos probatórios respeitar

este princípio. Entretanto, na prática, existem grandes dificuldades para o exercício pleno do contraditório em relação à prova pericial. Os peritos são em regra oficiais e normalmente as perícias são realizadas na fase de inquérito policial, onde ainda não existe a participação da defesa.

Embora se admita o contraditório posterior, nem sempre as informações técnico-científicas são elaboradas para uma discussão paritária entre os interessados, fazendo prevalecer uma versão única sobre os fatos examinados, normalmente aceita de forma acrítica não só pelo juiz como também pelas próprias partes (GOMES FILHO, 1997).

Para a superação destas dificuldades, seria louvável uma maior integração de conhecimentos entre o Poder Judiciário, o Ministério Público, a Ordem dos Advogados e os Institutos Oficiais de Perícias que mormente seguem alheios às dificuldades das exigências processuais. Complementando esta parceria, melhor seria a obrigatoriedade de disciplinas como Criminalística e Medicina Forense nos cursos jurídicos, prelecionadas de modo a propiciar o desenvolvimento de um senso crítico, suficiente ao menos para a aferição da existência ou não no laudo pericial dos requisitos mínimos para que ele possa ser considerado como um trabalho científico de qualidade, independentemente de uma compreensão profunda sobre a matéria nele abordada. Por outro lado, faz-se também mister que nos cursos de formação de peritos oficiais sejam ministradas, de forma mais profunda e integrada, as disciplinas de Direito Penal e Processual Penal, com grande ênfase nos ensinamentos sobre formação da prova e seu contraditório, tendo-se em conta a interdisciplinaridade como exigência desta formação.

O Código de Processo Penal brasileiro, no artigo 176, prevê a possibilidade de formulação de quesitos até o ato da realização das perícias. Assim, quando na fase processual houver um requerimento de realização de perícia ou a determinação *ex-offício* da realização desta, a parte poderá formular quesitos, exercendo, neste momento a garantia do contraditório.

Poderá também ser feito pelas partes requerimento para a repetição da perícia já realizada na fase de inquérito policial sem o crivo do contraditório. Por certo este entendimento cabe apenas para a realização de perícias que ofereçam condições materiais

de reexame. Neste sentido, é louvável e prudente a previsão contida no artigo 170 do Código de Processo Penal determinando que nas perícias laboratoriais os peritos deverão guardar material suficiente para a eventualidade de nova perícia.

Não existe no processo penal brasileiro o direito a que as partes possam produzir, tal qual no processo civil, prova pericial por meio de assistentes técnicos⁴¹. Isto não impede que a parte, geralmente a defesa, recorra a peritos particulares para análise da perícia oficial e emissão de parecer técnico para instruir suas alegações finais.

Nos termos do artigo 182 do Código de Processo Penal, o juiz não ficará adstrito às conclusões dos laudos periciais e, por conseguinte, nem às dos peritos extrajudiciais. Ele poderá confrontar as conclusões dos peritos oficiais com as do parecer técnico e até mesmo optar pela orientação deste parecer. Isto devido ao fato que no processo penal qualquer elemento levado aos autos pode ser utilizado para fortalecer a presunção de inocência ou de não culpabilidade em razão, principalmente, do princípio *in dubio pro reo*.

Os pareceres técnicos trazidos aos autos pela defesa têm, em termos de elementos probatórios intrínsecos, valor oriundo da seriedade e credibilidade de seus argumentos. O juiz não pode deixar de avaliá-los desde que não fique adstrito às suas conclusões, como, aliás, não fica em relação às perícias (GRINOVER; FERNANDES; GOMES FILHO, 2001). Isto significa que o processo em contraditório não se esgota no direito à prova e à sustentação dos argumentos das partes, mas indica ainda a exigência de que o juiz valore atentamente as atividades instrutórias e seus resultados. Os pareceres técnicos juntados pela defesa podem ter suas conclusões rejeitadas pelo juiz, devido à regra da livre formação de seu convencimento, mas devem ser consideradas analisadas, sopesadas e, enfim, motivadamente acolhidas ou rejeitadas.

Em resumo, apesar do silêncio da lei processual, a melhor doutrina, face aos princípios constitucionais do contraditório e da ampla defesa, entende que a participação dos interessados é essencial também neste tipo de prova, dando sua participação através da

⁴¹ É de se questionar se o art. 3º do Código de Processo Penal, ao preceituar que “a lei processual penal admitirá interpretação extensiva e aplicação analógica, bem como o suplemento dos princípios gerais do direito”, não autorizaria, por analogia ao Código de Processo Civil, a nomeação de assistentes técnicos.

possibilidade de crítica (pareceres) e pedidos de esclarecimento em relação aos laudos já apresentados ou pela formulação de quesitos antes da realização da perícia.

A ausência de dispositivos claros e precisos, no sentido da ampla participação das partes na realização das perícias em nosso sistema, já suscitou projetos para reforma do Código de Processo Penal. No anteprojeto José Frederico Marques, de 1983, previa-se a indicação de assistentes pelas partes, mas sucumbiu.

O Projeto de Lei nº. 4205/2001 para reforma do Código de Processo Penal, elaborado por uma comissão de juristas, no tocante à prova pericial, propõe simplificar a realização das perícias, notadamente nas regiões mais distantes e desprovidas de recursos, de modo que se elabore um regramento simples para o caso da inexistência de perito oficial na região. Propõe também a possibilidade de indicação de assistente técnico pelas partes para melhor assegurar o contraditório, aproximando a disciplina da perícia no processo penal com a já adotada no processo civil⁴².

Consideramos tais previsões como desejáveis, pois além de agilização processual, irão propiciar obrigatoriamente, tal qual se existisse um exame cruzado, a elevação do nível técnico e científico dos peritos e um reaparelhamento das instituições periciais, no sentido de adequação às novas exigências.

O princípio do contraditório é essencial para a existência do processo, entretanto não pode ser considerado como indispensável na formação de todas as modalidades de prova, uma vez que algumas delas têm gênese pré-processual. Preferimos, então, o entendimento de que imprescindível é a existência de um controle contraditório necessário sobre todas as provas formadas ou não no processo e utilizáveis para a decisão.

⁴² Pelas proposições da reforma, o artigo do Novo Código de Processo Penal terá a seguinte redação: “Art. 159. O exame de corpo de delito e outras perícias serão, em regra, realizados por perito oficial. § 1º. Na falta de perito oficial, o exame será realizado por duas pessoas idôneas, escolhidas, de preferência, dentre as que tiverem habilitação técnica. § 2º. Os peritos não oficiais prestarão o compromisso de bem e fielmente desempenhar o encargo. § 3º. Serão facultadas ao Ministério Público e seu assistente, ao querelante, ao ofendido, ao investigado e ao acusado a formulação de quesitos e indicação de assistente técnico, que atuará a partir de sua admissão pelo juiz” (CALMON FILHO, 2001).

Desloca-se, desta forma, a problemática para a qualidade e a eficiência deste controle contraditório. Para as provas que se formam no processo, ocorre um contraditório ideal e, para aquelas de origem extraprocessual, o possível (TARUFFO, 1992).

No intuito de maximizar a eficiência deste controle sobre as provas com formação extrajudicial, como é o caso das perícias judiciais cautelares, faremos algumas considerações.

Ao tratar do tema, em suas observações sobre nosso inquérito policial, Gomes Filho (1997, p.146) sugere, ante a impossibilidade de atuação da acusação e da defesa em fase de inquérito devido à rotina da atividade policial, a “previsão de incidentes jurisdicionalizados para a coleta de elementos utilizáveis para as decisões finais”.

No mister da busca de eficiência do controle do contraditório sobre as provas com formação extraprocessual, entendemos a previsão pretendida por Gomes Filho como absolutamente pertinente e indispensável. Este controle deverá subsistir mesmo se concretizando a possibilidade de nomeação de assistentes técnicos pelas partes, prevista pela reforma do Código de Processo Penal, haja vista que a atuação destes será facultativa e impraticável em algumas perícias que versem sobre vestígios com possibilidade de dispersão, como é o exame de local de crime.

No sentido de implementar estes incidentes jurisdicionalizados, despretensiosamente sugerimos que devam ser normalizadas técnicas rígidas para a preservação e análise de locais de crime, coleta, preservação e custódia de amostras, de forma a garantir às partes, em momentos posteriores, a possibilidade de aferição da existência ou não de uma cadeia de custódia no levantamento do local de crime e no tratamento dos vestígios, o que, em última instância, irá garantir a credibilidade das provas e a imparcialidade em sua formação.

Estes momentos de aferição poderão se dar antes, durante ou após a elaboração do laudo pericial. Dar-se-á antes, quando se tratar de vestígios a serem analisados, devendo estes permanecer devidamente depositados em centro de custódia de vestígios dos órgãos periciais e disponíveis para exibição. O segundo momento se dará

durante o exame dos vestígios, na presença das partes, ainda que leigas. Por último, restará a possibilidade de aferição através do laudo pericial.

Este último momento é o mais importante, pois o laudo pericial deverá consubstanciar não apenas os usuais aspectos técnicos e científicos ou cuidados empreendidos e exigidos para garantia de sua credibilidade, mas também, e, principalmente, a demonstração da efetiva aferição pelos interessados em sua elaboração.

Deste modo, o laudo pericial servirá também como forma de certificação do cumprimento dos requisitos mínimos exigidos para sua participação na formação do conhecimento judicial, não se olvidando a possibilidade e, para alguns casos, a necessidade de exercício do tradicional controle contraditório diferido.

O exercício da aferição preliminar efetuada pelas partes contribuirá para elevar a eficiência do contraditório possível das provas periciais. Entretanto, sua existência não eximirá o magistrado da observância de cautelas até mais rigorosas que as empregadas quando da valoração das provas formadas no processo e sob a égide do contraditório ideal, uma vez que é sempre dificultoso um controle efetivo dos atos praticados sem a imediação do juízo e, principalmente, acerca aqueles que versem sobre matéria técnica diferente do direito.

Mesmo que não aprovada a proposta de reforma do Código de Processo Penal na ampliação do contraditório, levando consigo parte de nossas expectativas quanto à elevação do padrão técnico-científico das provas periciais em geral, restará, ao menos para as perícias pautadas em DNA, a esperança da rápida e efetiva da implementação do projeto da SENASP/MJ, anteriormente visto, em prol da excelência na elaboração destas provas.

Ainda que haja o alcance desta tão almejada excelência técnica, ela poderá ser frustrada se os operadores do direito, receptores finais das provas periciais, não estiverem preparados para o uso das complexas informações contidas nas provas de DNA e nem conscientizados do real alcance e das limitações da técnica, tida por muitos deles como absoluta, infalível e imbatível.

Atitudes coadjuvantes, como eventos de integração entre órgãos periciais e instituições correlatas a estes operadores, podem promover a oportunidade para quebrar a aura mítica destas provas e para alertar sobre a possibilidade de ocorrência de erros procedimentais. Estes encontros podem servir também para explicar o complexo significado da valoração probabilística dos resultados dos testes de DNA, bem como a postura cautelosa que se deve ter de não se desprezar o conjunto dos outros elementos probantes em prol do DNA que deve apenas ser tido como um referencial a mais.

2. A tipagem do DNA e a sociedade

Conforme expressa o relatório NRC de 1992, bem como o que acima em parte já relatamos, a introdução de qualquer tecnologia nova causa preocupações com relação a seu impacto sobre a sociedade. Possíveis danos a interesses pessoas, custos financeiros e ameaças à liberdade ou à privacidade são somente algumas inquietações tipicamente expressas quando uma nova tecnologia surge no horizonte. A tecnologia da tipagem do DNA potencialmente descobre e traz à luz inumeráveis informações que a maioria das pessoas considera extremamente particulares.

O programa genoma humano forneceu uma quantidade enorme de informações genéticas, gerando novos bancos de dados. Uma preocupação básica advinda deste programa é a da defesa do sigilo das informações genéticas de uma pessoa. Como alerta o citado relatório, com a maior compreensão do genoma humano, aumentará o potencial para uso indevido das amostras de DNA, coletadas ou preservadas para uso da justiça criminal. Quanto mais bancos de dados de perfis genéticos forem estabelecidos, maior será o risco de violação do sigilo e de uso indevido das informações.

O uso forense da tecnologia do DNA vem ocasionando, em nível mundial, vários impactos econômicos. A proliferação do uso de exames de DNA em investigações e julgamentos faz exigir um aumento do número de especialistas e de laboratórios. O custo das instalações físicas destes laboratórios, bem como o dos equipamentos, dos materiais e dos recursos humanos já é muito grande, sem se olvidar o custo para implantação de centros necessários para armazenamento de material para os bancos de dados e para identificar suspeitos.

Custos adicionais relacionados a treinamento, certificação e proficiência também devem ser computados, pois a implementação de qualquer tecnologia nova requer treinamento e certificação do pessoal. Custos decorrentes do desenvolvimento de mecanismos que assegurem programas de CQ e GQ nos laboratórios que realizam testes forenses de DNA devem também ser incluídos.

A tecnologia do DNA acaba por impor, direta ou indiretamente, uma demanda fiscal à sociedade já que o custo da justiça criminal aumenta, ainda que este possa ser aliviado pela exclusão precoce de suspeitos inocentados. Pode-se entender estes gastos como justificáveis em vista das vantagens decorrentes do emprego da análise de DNA no meio forense, sendo um claro exemplo disto o Projeto Inocência desenvolvido nos Estados Unidos com fundos federais. Este projeto, através da utilização da análise de DNA por métodos de altíssima sensibilidade, tem permitido a reabertura de casos que tem levado à libertação de prisioneiros (alguns já na fila de execução) condenados por erros judiciais (JOBILING; GILL, 2004).

Em relação aos aspectos éticos que envolvem o uso das informações advindas da tecnologia do DNA, é oportuno aqui ressaltar, complementando e corroborando nossas colocações de ordem prática já feitas, a concisão de idéias do relatório NRC de 1992 (p.163) sobre o assunto:

As considerações éticas com relação ao uso da tecnologia do DNA na ciência forense se sobrepõem a várias questões tratadas nas análises sociais e legais, incluindo os direitos reais e processuais das pessoas e os custos e benefícios globais não financeiros que provavelmente resultam quando se estabelece o uso da nova tecnologia nos processos nos tribunais.

De tais considerações, resultaram recomendações desta entidade para que, no contexto forense, tal qual no cenário médico, a informação contida no DNA seja considerada pessoal e que a privacidade da pessoa e a necessidade de sigilo devem ser respeitadas. A liberação de informações sobre o DNA de uma população de criminosos, sem a permissão dos sujeitos e com finalidades outras que o cumprimento da lei, deve ser considerada uso indevido de informação, e devem ser estabelecidas sanções legais para

deter a disseminação não autorizada ou a aquisição de informação sobre o DNA que foi obtida para finalidades forenses.

Outro impacto social importante causado pela introdução de novas e poderosas tecnologias é a criação de expectativas injustificadas ou irreais sobre elas. Com a tipagem de DNA não foi diferente. Neste sentido, a força da mídia não só impressionou pessoas do cenário forense como as de camadas mais carentes da população, normalmente alheias às notícias de qualquer conquista tecnológica.

Em relação ao meio forense, dois aspectos contribuem para que sejam criadas expectativas inadequadas sobre a tecnologia da tipagem do DNA. O primeiro deles resulta da extraordinária probabilidade de identificação do autor de um crime. O segundo diz respeito à falta de entendimento do alcance e das limitações da técnica dada a sua complexidade, tendendo a levar, em conjunto com o primeiro, ao alijamento de outros elementos do conjunto probatório. Impressionados com o propalado poder da tipagem do DNA, podem os julgadores negligenciar a possibilidade de erros cometidos pelo laboratório, o que não ocorreria se suas expectativas sobre o DNA fossem as mesmas esperadas para outras técnicas.

A adequação das expectativas aos reais alcances da tecnologia da tipagem do DNA será fruto de um processo a ser iniciado no meio forense e que acabará por incutir em toda sociedade uma “cultura do DNA” mais apropriada e madura, sendo certo que os analistas forenses, detentores dos reais conhecimentos sobre a tecnologia, desempenharão um papel desmistificador preponderante neste processo.

Por último, no rol das recomendações do relatório da NRC de 1992, ratificadas pelo relatório de 1996, concernentes à tipagem do DNA e a sociedade, encontram-se aquelas relacionadas com a responsabilidade e vigilância pública dos laboratórios que realizam os testes de DNA e com a necessidade de intercâmbio internacional para asseguarção de padrões.

A primeira destas recomendações vem da preocupação de que, como a aplicação da tipagem de DNA na ciência forense deve ser usada a serviço da justiça, é particularmente importante para a sociedade criar mecanismos para o estabelecimento de

responsabilidades e assegurar uma vigilância pública adequada, ficando tal responsabilidade vinculada a testes de proficiência e credenciamento dos laboratórios. A recomendação vem, então, no sentido de que devem ser estabelecidos mecanismos para assegurar a responsabilidade dos laboratórios e do pessoal envolvido na tipagem do DNA e para tornar possível uma fiscalização pública adequada.

A segunda dessas recomendações assevera que esforços para cooperação internacional devem ser envidados para assegurar padrões internacionais uniformes e um intercâmbio o mais amplo possível de conhecimentos científicos e especialização técnica. Estas recomendações foram já cumpridas pela existência de sólidas entidades fomentadoras do almejado intercâmbio. O cumprimento da primeira delas dependerá, ao menos em nosso país, de grandes esforços governamentais.

CONCLUSÕES

1. Os avanços da Biologia Molecular favoreceram o aperfeiçoamento e o desenvolvimento dos testes de identificação humana. Com o surgimento de técnicas moleculares para avaliação de características genéticas dos indivíduos através de estudos do DNA, os testes tradicionais foram sendo sistematicamente substituídos, dando-se, desta forma, o início de uma nova e significativa fase do desenvolvimento da Medicina Forense.
2. O estudo dos polimorfismos de STRs e o do DNA mitocondrial baseados na PCR são os mais adequados para as análises dos vestígios que rotineiramente aportam nos laboratórios forenses voltados à elucidação de crimes e identificação de cadáveres.
3. Cuidados indispensáveis devem ser tomados para a coleta de materiais e manutenção da cadeia de custódia das amostras que serão estudadas, não se olvidando também dos aspectos éticos e garantias legais dos acusados que permeiam esta questão.
4. Para que o poder das provas pautadas em análises de DNA não se esmaça no exercício do contraditório, os analistas devem se cercar de cuidados técnicos na realização da análise e, principalmente, na confecção do laudo pericial, pois, ao menos em nosso sistema legal, é através desta peça que transparece todo esforço por eles empreendido na elaboração da prova.
5. Os procedimentos laboratoriais utilizados para a análise de DNA devem seguir as padronizações recomendadas por entidades preocupadas em garantir resultados de alta qualidade, uma vez que há a possibilidade de erros decorrentes de práticas laboratoriais.

6. A taxa geral de sucesso das análises realizadas pelo Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo está dentro dos índices esperados para um laboratório de DNA voltado à elucidação de crimes e identificação de pessoas. Contudo, apesar do número de casos atendidos ser condizente com o porte do laboratório, o volume de serviços prestados não é significativo frente aos notórios índices de violência e criminalidade no Estado de São Paulo.
7. O emprego da análise de DNA no meio forense impõe direta ou indiretamente uma demanda fiscal à sociedade. Porém, em contrapartida, contribui para o oferecimento de um serviço policial e judicial mais eficiente e preciso aos cidadãos.
8. O ideal em um sistema de provas, inclusive o brasileiro, é considerar o exame de DNA um meio concreto que poderá contribuir para a reconstrução dos fatos durante o processo. Saliente-se, entretanto, que sua interpretação e valoração ficam sujeitas a eventuais distorções em vista de sua complexidade.
9. A ampliação do contraditório em nosso sistema legal, aliada a medidas educativas e a ações governamentais, certamente contribuirá para que se alcance a excelência técnica necessária para a realização das provas de DNA.
10. Devem ser envidados esforços no sentido de preparar os operadores de direito para o uso das complexas informações contidas nas provas de DNA, bem como conscientizá-los do real alcance e das limitações da técnica, de forma a expurgar qualquer falsa expectativa sobre seu poder probatório.
11. O papel do analista forense não é o de proceder a identificações nominais de cadáveres ou fazer presunções de culpabilidade ou de inocência, mas o de fornecer informações exatas para o sistema judicial e assim contribuir para melhor distribuição de justiça.

12. É certo que a norma jurídica precise ir ao encalço dos avanços científicos, mas é certo também que o emprego da prova de DNA deva se dar com prudência, pois, apesar do grau de certeza e segurança que pode gerar, está sujeita a erros.
13. Assim sendo, entendemos que a análise de DNA mesmo sendo uma poderosa ferramenta, está longe de ser considerada condição *sine qua non* em estudos forenses, devendo a prova de DNA ser considerada dentro de um conjunto de variadas evidências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁴³

A AVALIAÇÃO DO DNA COMO PROVA FORENSE (Conselho Nacional de Pesquisa – NRC, 1996. Comitê sobre Tecnologia do DNA na Ciência Forense, Conselho de Biologia Comissão sobre Ciências da Vida). trad. e rev. DUARTE F. A. M. et al. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2001, 283p.

A TECNOLOGIA DO DNA NA CIÊNCIA FORENSE (Conselho Nacional de Pesquisa – NRC, 1992. Comitê sobre Tecnologia do DNA na Ciência Forense, Conselho de Biologia Comissão sobre Ciências da Vida). trad. e rev. DUARTE F. A. M. et al. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 1999, 202p.

AKANE, A. et al. Y. Sex determination of forensic samples by Polymerase Chain Reaction (PCR) two alternative methods. **Forensic Sci. Int.**, v.49, p.81-88, 1991.

ALBANO, L. M. J. **Biodireto: os avanços da Genética e seus efeitos ético-jurídicos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 166p.

ALBERTS, B. et al. **Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing, 1998. 630p.

ALESSANDRINI, F. et al. Multiplex PCR development of Y-chromosomal biallelic polymorphisms for forensic application. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.519-525, 2005.

ANSLINGER, K. D., et al. mtDNA investigations after differential lysis. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.579-581, 2005.

BAMSHAD, M. et al. Deconstructing the relationship between genetics and race. **Nature Rev. Genet.**, v.5, p.598-609, 2004.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas populações e nas famílias**. 2 ed. São Paulo: Edart, 1972. 212 p.

BONACCORSO, N. S. Alguns aspectos jurídicos do exame de DNA à luz do direito brasileiro. **Forénsica – Revista Iberoamericana de Criminalística, Criminologia, Medicina y Ciencias Forenses**, v.1, n.2, p.9-15, 2002.

⁴³ Apresentadas de acordo com a norma NBR nº 6023/2002 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e com as observações de Rebello (2004).

BONACCORSO, N. S.; PERIOLI, C. **Centro de Custódia**. 2001. Trabalho apresentado no XVI Congresso Nacional de Criminalística, Florianópolis, 2001.

BONACCORSO, N. S. Elaboração de laudos e relatórios de análise de exames de DNA realizados pelo Instituto de Criminalística de São Paulo. **Arquivos da Polícia Civil – Revista Tecnocientífica**. São Paulo: ACADEPOL, v.46, n.1, 2001.

BRASIL. **Código de Processo Civil**. Lei nº 5.869, de 1 de janeiro de 1973.

_____. **Código de Processo Penal**. Decreto-Lei nº 3.684, de 3 de outubro de 1941.

_____. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado 1988.

_____. Ministério da Justiça - Secretaria Nacional de Segurança Pública – Departamento de Políticas, Programas e Projetos. **Projeto para implantação dos Laboratórios Regionais de DNA**. Brasília, 2003.

_____. Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 196, de 10 de outubro de 1996**. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/comissoes/etica/Reso196.doc>>. Acesso em: 12 nov. 2004.

_____. Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 340, de 8 de julho de 2004**. Aprova diretrizes para análise ética e tramitação dos projetos de pesquisa da área temática especial de genética humana. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/docs/Reso%20340.doc>>. Acesso em: 25 jul. 2005.

BRINKMAN, B. Harmonization of medico-legal autopsy rules. **Int. J. Leg. Med.**, v.113, p.1-14, 1999.

BROWN, T. A. **Genética: um enfoque Molecular**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 336p.

BUDOWLE, B. **Curso prático de DNA forense – apostila de práticas**. Academia de Polícia Civil do Distrito Federal. Brasília: APC/DF, 1996.

BUDOWLE, B.; BROWN, B. L. El uso del análisis de ADN en la identificación forense. **Forénsica – Revista Iberoamericana de Criminalística, Criminología, Medicina y Ciencias Forenses**, v.1, n.2, p.9-22, 2001.

BUDOWLE, B. et al. **DNA typing protocols: molecular biology and forensic analysis**. The Federal Bureau of Investigation. Washington, DC: BioForensic Sciences Book Series from Bio Techniques Journal, 2000. 312p.

CALABREZ, M. C. T. **Influência do calor na análise do DNA extraído de sangue e tecidos humanos: importância para a identificação de corpos carbonizados**. 1999. 92p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CALMON FILHO, P. **Reforma constitucional do poder judiciário: reforma do código de processo penal – projeto de lei nº. 4.205/2001**. São Paulo: IBDP, 2001.

CAMARGO, A. L. C. **Sistemas de penas, dogmática jurídico-penal e política criminal**. São Paulo: Cultural Paulista, 2002.

CLAYTON, T. M. et al. Analysis and interpretation of mix forensic stains using DNA STR profiling. **Forensic Sci. Int.**, v.91, p.55-70, 1998.

COLLUCCI, E. A origem das organelas e a teoria endossimbionte. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 7 nov. 2002. Fovest especial, p. 7.

COMNEY, C. T. The use of DNA amplification in the analysis of forensic evidence. **Crime Lab. Digest**, v.15, n.4, p.99-103, 1988.

COTTON, E. A. et al. Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework. **Forensic Sci. Int.**, v.112, p.151-161, 2000.

CROUSE, C.; CONOVER, J. **Successful validation and implementation of (semi) automation in a small caseworking laboratory**. 2004. Disponível em: <<http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp14proc/oralpresentations/Crouse.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2004.

DAVIES, A. The appearance and grouping of mixtures of semen and vaginal material. **Med. Sci. Law**, v.21, p.22, 1982.

DENTI, V. Scientificità della prova e libera valutazione del giudice. **Rivista di Diritto Processuale**, v.27, n.3, p.414-437, 1972.

DIVNE, A. M. et al. Forensic casework analysis using the HVI/HVII mtDNA linear array assay. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.548-554, 2005.

DOTTI, R. A. O exame de DNA e as garantias do acusado. In: LEITE, E. O. (Coord.). **Grandes temas da atualidade – DNA como meio de prova da filiação**. Rio de Janeiro: Forense, 2000. p.261-286.

ERLICH, H. A. **PCR technology principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton Press, 1989.

EVETT, I. W.; WEIR, B. S. **Interpreting DNA evidence statistical genetics for forensic scientists**. Sunderland: Sinauer, 1996.

EVETT, I. W. et al. DNA fingerprint on trial, **Nature**, v.340, p.435, 1989.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION – FBI. **Handbook of Forensic Service – DNA Examinations**. U. S. Department of Justice. 2003. Disponível em: <<http://www.fbi.gov/hq/lab/handbook/forensics.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2004.

FERREIRA, H. B. Organização gênica de procariotos. In: ZAHA, A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. cap.4.

FIGUEIREDO, M. S. et al. Brazilian caucasian population data for 15 STR *loci* (PowerPlex 16™ kit). **J. Forensic Sci.**, v.49, p.1-3, 2004.

FRANÇA, G. V. O Vínculo Genético da Filiação pelo DNA: sua aplicação nos tribunais. **Panorama da Justiça**, v.25, p.26-30, 2000.

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.**, v.112, p.17-40, 2000.

GILL, P.; JEFFREYS, A. J.; WERRET, D. J. Forensic application of DNA “fingerprints”. **Nature**, v.318, p.577-579, 1985.

GILL, P.; SPARKES, R.; BUCKLETON, J. Interpretation of simple mixtures when artefacts such as a stutters are present – with special reference to multiplex STRs used by the Forensic Science Service. **Forensic Sci. Int.**, v.95, p.213-224, 1998.

GOMES FILHO, A. M. **Direito à prova no processo penal**. São Paulo: Ed. RT, 1997. 191p.

GREENSPOON, S. A. et al. Validation and interpretation of the PowerPlex™ 16 BIO System STR multiplex for forensic casework. **J. Forensic Sci.**, v.49, p.71-80, 2004.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **An introduction to genetic analysis**. 7th ed. New York: Freeman, 2000. 860p.

GRINOVER, A. P.; FERNANDES, A. S.; GOMES FILHO, A. M. **As nulidades no processo penal**. 7^a ed. São Paulo: Ed. RT, 2001.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Aplicação da PCR em laboratório clínico e medicina forense – apostila de práticas**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1998.

HUBBELL, C.; DRACKER, R.; DAVEY, F. R. Teste de paternidade. In: HENRY, J. B. et al. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 19^a ed. São Paulo: 2Manole, 1998. cap.40, p.1181-1191.

JEFFREYS, A. J.; BROOKFIELD, J. F. Y; SEMEONOFF, R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. **Nature**, v.317, p.818-819, 1985.

JEFFREYS et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, p.10953-10971, 1988.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V; THEIN, S. L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985a.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V., THEIN, S. L. Individual specific “fingerprints” in human DNA. **Nature**, n.316, p.76-79, 1985b.

JOBIM, L. F. et al. Perícias médicas em investigação de paternidade pelos principais sistemas genéticos. **Rev. Hosp. Clín. Porto Alegre**, v.16, p.13-20, 1996.

JOBIM, L. F.; JOBIM M. R.; BRENNER, C. Identificação humana pelo DNA: investigação de paternidade e análise de casos forenses. In: TOCHETTO, D. (Coord.). **Identificação Humana**. Porto Alegre: Sagra-Luzzatto, 1999. parte IV.

JOBIM, L. F. Testes de DNA. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 11 jun. 2001. p.3.

JOBLING, M. A.; GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.739-751, 2004.

KIMPTON, C. P. et al. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat *loci*. **PCR Methods Appl.**, v.3, p.13-22, 1993.

KIRBY, L. T. **DNA fingerprinting: an introduction**. New York: Stockton Press, 1990.

KLINE, M. C. et al. Results from the NIST 2004 DNA quantification study. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.571-578, 2005.

KOBILINSKY, Y, L. Recovery and stability of DNA of samples of forensic science significance. **Forensic Sci. Rev.**, v.4, p.67, 1992.

LEE, H. C. **Collection and preservation of DNA evidence**. 1999. Disponível em: <<http://www.promega.com/geneticidprocussymp7proc/0704.html>>. Acesso em: 30 nov. 2004.

LEE, H. C. et al. Forensic application typing: collection and preservation of DNA evidence. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, v.19, p.10-18, 1998.

LEE, H. C. et al. Guidelines for the collection and preservation of DNA evidence. **J. Forensic Ident.**, v.41, p.344-356, 1991.

LEITE, E. O. Reflexões sobre a prova científica da filiação. **Revista dos Tribunais**, São Paulo, v.4, p.192, 1999.

LINS, A. M. et al. The evolution of short tandem repeat (STR) multiplex system. 2000. Disponível em: <<http://www.promega.com/geneticidproc/eusymp2proc/07.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2004.

LUTZ, S. et al. mtDNA as a tool for identification of human remains: identification using mtDNA. **Int. J. Legal Med.**, v.109, n.4, p.205-209, 1996.

MANDREKAR, M. N. et al. Development of a Human DNA quantitation system. **Croatian Medical Journal**, n.42, p.336–339, 2001. Disponível em: <http://www.promega.com/profiles/403/403_09.html>. Acesso em: 16 nov. 2004.

MANIATIS, T.; SAMBROOK, I.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1996. 3v., E3-E4.

MARCHI, E. Methods developed to identify victims of the world trade center disaster. **Am. Labor.**, n.36, p.30-36, 2004.

MARQUES, M. A. S. et al. DNA typing: an accessory evidence in doping control. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.587-592, 2005.

MCKUSICK, V. A. **Mendelian inheritance in man: catalog of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes**. 10th ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 1992.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.3, p.1215-1216, 1988.

MONTPETIT, S. A.; FITCH, I. T.; O'DONNELL, P. T. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.555-563, 2005.

MORETTI, T. R. et al. Validation of the short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. **J. Forensic Sci.**, v.46, p.647-660, 2001.

MOURA NETO, R. S. A Investigação de Crimes Sexuais através do Estudo do DNA. **Rev. Panorama da Justiça**, n.10, 1998.

MUAKAD, I. B. **O infanticídio: análise da doutrina médico-legal e da prática jurídica**. São Paulo: Ed. Mackenzie, 2002. 198p.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.155, p.335-350, 1987.

OLIVEIRA, F. **Engenharia Genética: o sétimo dia da criação**. 2ª. ed. reform. São Paulo: Ed. Moderna, 2004. 224p.

PEREIRA, R. W.; MALAGHINI, M. **Análises estatísticas para identificação humana – apostila de workshop**. 2004. Trabalho apresentado no III Encontro de DNA Forense, Belo Horizonte, 2004.

PETKOVSKI, E. et al. SNPs and MALDI-TOF MS: tools for DNA typing in forensic paternity testing and anthropology. **J. Forensic Sci.**, v.50, n.3, p.535-541, 2005.

RACE R.; SANGER, R. **Blood groups in man**. 5th ed. Oxford: Blackwell, 1968. 377p.

RASHBAUM, W. K. Nova York usará perfil de DNA para identificar agressores em casos de crimes sexuais. **The New York Times**, New York, 5 nov. 2003. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/midiaglobal/nytimes/ult574u3187.jhtm>>. Acesso em: 05 ago. 2003.

REBELLO, M. A. de F. R. Normalização das referências de um artigo científico. **Laes[&] Haes**, ano 25, v.150, p.112-142, 2004.

REBOUÇAS, N. A. **Fundamentos teóricos dos métodos de biologia molecular aplicados à pesquisa e ao diagnóstico clínico - apostila de curso**. São Paulo: Oficina da Universidade de São Paulo, 2004.

RECOMENDAÇÕES da Sociedade Brasileira de Medicina Legal para laboratórios de teste de paternidade. 1ª ed. Rio de Janeiro: Regional, 1999.

RECOMENDACIONES del Grupo Español y Portugués de la ISFG - International Society of Forensic Genetics - para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética. Madeira: ISFG, 2000.

RECOMENDACIONES del Grupo Iberoamericano de Trabajo en Análisis de DNA – GITAD para recogida de pruebas y muestreo de ADN. Granada: Academia Iberoamericana de Criminalística y Estudios Forenses (AICEF), 2002.

RECOMMENDATIONS of the Forensic Science Service concerning submission requirements for routine DNA analysis. **The scenes of crime handbook**. 2nd ed. Birmingham: FSS, 1994.

REPORT concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of the DNA polymorphisms. [Editorial] **Forensic Sci. Int.**, v.42, p.125-130, 1992.

SAIKI, R. K. et al. Analysis of enzymatically amplified β globin and HLADQ α DNA with all specific oligonucleotide probes. **Nature**, v.324, p.163-166, 1986.

SÃO PAULO (Estado). Resolução SSP 194 de 2 de junho de 1994. Estabelece normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 2 jun. 1999. Poder Exec., Seção I, p.3.

_____. Procuradoria Geral do Estado. Grupo de Trabalho de Direitos Humanos. **Instrumentos internacionais de proteção dos direitos humanos**. São Paulo: Centros de Estudos da Procuradoria Geral do Estado, 1996.

SCHRANK, A. Estrutura dos ácidos nucléicos. In: ZAHA, A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. cap.2.

SILVER, H. (Ed.): **Probability of inclusion in paternity testing: a technical workshop**. Washington, DC: AABB, 1982.

TARUFO, M. **La prova dei fatti giuridici**. Milano: Ed.Guiffre, 1992.

THOMPSON, W. C.; FORD, S. DNA typing: acceptance and weight of the new genetic identification test. **Virginia Law Rev.**, v.75, p.45-108, 1989.

THOMPSON, W. C.; KRANE, D. 2003. [Chapter 11: DNA in the courtroom](http://bioforensics.com/articles/Chapter11.pdf). **Psychological and Scientific Evidence in Criminal Trials**. West Group. Disponível em: <<http://bioforensics.com/articles/Chapter11.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2004.

THOMPSON, W. C.; SCHUMANN, E. L. Interpretation of statistical evidence in criminal trials: the prosecutor's fallacy and the defense attorney's fallacy. **Law Hum. Behav.**, v.11, p.167-187, 1987.

VELOSO, Z. A sacralização do DNA na investigação de paternidade. In: LEITE, E. O. (Coord.). **Grandes temas da atualidade – DNA como meio de prova da filiação**. Rio de Janeiro: Forense, 2000. p.379-390.

VIGILANT, L. et al. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern african population. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.9350, 1989.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing forensic material. **Biotechniques**, v.10, p.506-513, 1991.

WEEDN, V. W; SWARNEN, S. L. Exames forenses de identificação por análises do DNA. In: HENRY, J. B. et al. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19ª ed. São Paulo: Manole, 1998. cap.63, p.1427-1438.

WIKIPEDIA THE FREE ENCYCLOPEDIA. **Chain of custody**. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chain_of_custody>. Acesso em: 12 dez. 2004.

WERRET, D.; PINCHIN, R.; HALE, R. Problem solving: DNA data acquisition and analysis. **Profiles DNA**, v.2, p.3-6, 1998.

ZARZUELA, J. L.; MATUNAGA, M.; THOMAZ, P. L. **Laudo pericial: aspectos técnicos e jurídicos**. São Paulo: Ed. RT, 2000. 371p.

GLOSSÁRIO

Alelo – uma de duas ou mais formas alternativas de um gene.

Amplicons – fragmentos de DNA amplificado por PCR.

Análise de RFLP – técnica que usa sonda de locus único ou multilocus para detectar variações em uma sequência de DNA com base nas diferenças de tamanho dos fragmentos produzidos cortando-se o DNA com uma enzima de restrição.

Banco de dados ou base de dados de DNA – uma coleção de perfis de DNA tipados de indivíduos selecionados ou ao acaso.

Banda – representação de um fragmento de DNA.

Codificar - representar, sob a forma de código genético, uma ou mais etapas da biossíntese de uma proteína.

Controle de qualidade – atividades internas ou atividades conduzidas de acordo com padrões externos usadas para monitorar a qualidade da tipagem de DNA para alcançar e satisfazer critérios específicos.

Cromossomo - unidade morfológica e fisiológica, constituída por fibras cromatínicas compostas basicamente por DNA e proteína e que contém a informação genética.

Cromossomos sexuais (cromossomos X e Y) – cromossomos envolvidos na determinação do sexo. Em humanos, XX corresponde a pessoas do sexo feminino e XY ao sexo masculino. Em testes de STR, tais cromossomos são tipados pelo locus amelogenina.

Decomposição – quebra ou destruição do DNA por ação de fungos e bactérias.

Degradação - quebra ou destruição do DNA por meios físicos ou químicos.

Deterioração – estado alterado para pior; estrago causado por processo de decomposição ou degradação sem necessariamente importar na destruição total do DNA.

Desequilíbrio de ligação fenômeno em que um alelo específico de um locus está associado de maneira não casual a um alelo de um outro locus.

Desnaturação processo de desespiralização do DNA para formar fitas únicas.

Diplóide – que tem o dobro do número de cromossomos típico dos gametas normais.

DNA - ácido desoxirribonucleico - molécula com informações genéticas, formada por cadeia de polinucleotídeos, constituída de grupo fosfato, de açúcar (desoxirribose) e de base nitrogenada (adenina, timina, citosina ou guanina) [Sim.: ADN e (ingl.) DNA].

DNA mitocondrial (mtDNA) – DNA encontrado no interior da mitocôndria (não associado aos cromossomos nucleares). Sua transmissão se dá somente de mãe para filho.

DNA-template – amostra de DNA que será amplificada pela PCR.

Eletroforese – migração das partículas de uma solução coloidal sob a influência de um campo elétrico.

Eletroforese capilar – método de separação que utiliza um estreito tubo preenchido por polímero para propiciar a separação de DNA por tamanho.

Enzima de restrição – enzima que cliva moléculas de DNA em uma sequência particular de nucleotídeos.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg – condição, para um locus genético particular e para uma população específica, com as seguintes propriedades: as frequências alélicas do locus são constantes no tempo e não há correlação estatística entre os dois alelos de cada locus na população; uma aproximação desta condição é alcançada em grandes populações em que os cruzamentos se fazem ao acaso, na ausência de seleção, migração e mutação.

Eucarioto - organismo composto por uma ou mais células que possuem núcleo distinto, envolvido por membrana nuclear; eucarionte.

Fator C – quantidade total de DNA presente no genoma haplóide, expressa em pares de bases (pb).

Fenótipo - característica de um indivíduo, determinada pelo seu genótipo e pelas condições ambientais

Frequência alélica – ocorrência relativa de um alelo particular na população.

Gel – matriz (usualmente agarose ou acrilamida) usada na eletroforese para separar moléculas.

Gene – unidade hereditária ou genética, situada no cromossomo, e que determina as características de um indivíduo; uma sequência de nucleotídeos do DNA.

Genoma – constituição genética total de um indivíduo ou zigoto.

Genótipo – o conjunto dos genes de um indivíduo.

Haplóide - que tem número de cromossomos típico dos gametas normais.

Haplótipo - grupo de alelos situados em regiões muito próximas, sendo transmitidos em conjunto para os descendentes.

Heteroplasmia – pequenas variações algumas vezes encontradas em perfis de DNA de diferentes células da mesma pessoa, devido à mutações.diferentes sequências de bases.

Heterozigoto – indivíduo com alelos diferentes em um determinado locus nos dois cromossomos.

Homoplasmia - sequência única de DNA presente na célula.

Homozigoto – indivíduo com alelos idênticos em um determinado locus nos dois cromossomos.

Locus (pl. loci) – posição de um determinado gene num cromossomo.

Marcador – gene ou uma estrutura genética com uma localização conhecida no cromossomo e com um fenótipo bem definido, que é usado como referência para o mapeamento de outros loci.

Meiose – processo de divisão pelo qual as células-filhas têm metade dos cromossomos da célula-mãe.

Mitose - processo mediante o qual o material genético é duplicado com precisão, gerando dois novos conjuntos de cromossomos iguais ao original.

Nucleotídeo - unidade constituinte dos ácidos nucléicos que, por hidrólise, fornece um açúcar, ácido fosfórico e uma base nitrogenada. Nos nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico, o açúcar é a desoxirribose e a base nitrogenada pode ser timina, adenina, citosina ou guanina.

Padrões – critérios estabelecidos para controle de qualidade e segurança de qualidade; reagentes conhecidos como, por exemplo, padrões de peso molecular.

pb (par de bases) - dois nucleotídeos complementares no DNA; o pareamento de bases ocorre entre A (adenina) e T (timina) e entre G (guanina) e C (citosina).

PCR (polymerase chain reaction) ou Reação em cadeia da polimerase – processo de amplificação que produz milhões de cópias de desejadas regiões do DNA através de repetidos ciclos que envolvem a enzima DNA-polimerase.

Polimórfico – um locus é polimórfico se uma população contiver dois ou mais alelos detectáveis.

Polimorfismo – presença de mais de um alelo de um gene em uma população em uma frequência maior do que aquela provocada por mutação nova; operacionalmente, a população em que o alelo mais comum em um locus tem uma frequência menor que 99%.

População – um grupo de indivíduos que ocupa uma determinada área em um determinado momento.

Primer ou iniciador – curta sequência de nucleotídeos (em geral, 17 a 23 bases) complementares a uma região do DNA, que delimita a região que será amplificada na reação de PCR.

Procarionte - organismo formado por uma única célula desprovida de membrana nuclear; procarioto.

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) – polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição; variação do tamanho dos fragmentos de DNA produzidos por uma endonuclease de restrição que corta o DNA em um locus polimórfico.

SNP - *polimorfismo nucleotídeo único* - uma substituição de base simples dentro da sequência do DNA.

Sorologia – disciplina que estuda a imunologia dos fluidos orgânicos.

Southern blot – membrana de náilon à qual o DNA adere após o processo de *Southern blotting*.

Southern blotting – técnica de transferir do gel para a membrana de náilon os fragmentos de DNA que foram separados por eletroforese.

STR (*short tandem repeat*) – repetições curtas repetitivas de bases nitrogenadas.

Stutter – produtos de amplificação da PCR que possuem uma ou mais unidades de repetição a mais ou a menos do tamanho que possui o verdadeiro alelo; artefato.

Tandem - [Do lat. tandem, 'finalmente', pelo ingl. tandem, 'um depois ou atrás do outro'.] conjunto de unidades alinhadas, uma atrás da outra, consecutivas.

Taq polimerase – uma DNA-polimerase usada para formar DNA de dupla fita a partir de uma mistura de nucleotídeos e um molde de DNA de fita simples, na técnica conhecida como PCR.

Teorema de Hardy-Weinberg – é aplicado para estimar frequências gênicas e genotípicas de populações em equilíbrio e para verificar se uma população está ou não em equilíbrio genético, ou seja, se está ou não evoluindo.

Testes de proficiência – testes para avaliar a competência de técnicos e a qualidade do desempenho do laboratório; em testes abertos os técnicos estão cientes que estão sendo testados, mas em testes cegos eles não estão informados; testes de proficiência internos são conduzidos pelo próprio laboratório, enquanto que testes externos são conduzidos por uma agência independente do laboratório que está sendo testado.

VNTR (*variable number of tandem repeat*) – número variável de repetições consecutivas de bases nitrogenadas.

ANEXOS

ANEXO 1

Resolução SSP-194, de 2-6-99

Estabelece normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana.

O Secretário da Segurança Pública, nos termos do Decreto 42.815, de 19, publicado a 20-1-98, Considerando:

- a) a necessidade de normalizar os serviços periciais relativos à coleta de materiais biológicos para exames de identificação humana, tanto nos locais de crime quanto na pessoa humana, viva ou morta;
- b) que os procedimentos a serem seguidos pelos órgãos policiais e periciais oficiais devem estar em consonância com os ditames da legislação em vigor, e
- c) que é imprescindível à correta preservação das amostras para não haver contaminações ou outros prejuízos,

RESOLVE:

I - DISPOSIÇÕES GERAIS

Artigo 1º - A coleta de material biológico e os procedimentos preliminares para exame de identificação humana pela análise do DNA ou equivalente seguirão as normas e procedimentos dispostos no ANEXO desta Resolução.

Parágrafo Único - Por exame de identificação humana entende-se todo e qualquer procedimento experimental biológico ou bioquímico tendente a estabelecer a identidade da pessoa humana, bem como sua inclusão ou exclusão em análises de confronto entre o material coletado e aquele por ela, ou seus parentes, fornecido.

Artigo 2º - As análises de DNA serão realizadas exclusivamente em materiais relacionados, direta ou indiretamente, a ilícitos penais, salvo determinação legal em contrário, e desde que estejam acompanhadas dos respectivos padrões biológicos para confronto.

Artigo 3º - As coletas em locais de crimes, mediatos ou imediatos, ou ainda, idôneos ou inidôneos, para os exames definidos no artigo 1º, serão procedidas, exclusivamente, por Peritos Criminais, ressalvado o disposto no artigo 5º.

§ 1º - Ficam impedidos de proceder às análises de laboratório os Peritos que efetuaram a coleta de material em local.

§ 2º - Os Peritos Criminais que coletaram as amostras elaborarão o respectivo laudo pericial, do qual fará parte o relatório do exame de identificação requisitado.

Artigo 4º - Somente serão recebidas para análises biológicas de identificação humana as amostras de acordo com as normas aqui estabelecidas.

§ 1º - Não havendo condições imediatas de confronto pela ausência de material padrão para comparação, mas sendo o caso de interesse judiciário para futura identificação, as amostras que, após análise prévia por Perito especialista em identificação humana, revelarem-se adequadas, serão devidamente selecionadas, etiquetadas e preservadas, pelo prazo de 90 (noventa) dias, para futuro exame.

§ 2º - O interesse judiciário a que alude o parágrafo anterior deverá estar devidamente exposto e justificado na requisição de exame pericial.

§ 3º - Decorrido o prazo aludido no parágrafo anterior, e não havendo nova manifestação do requisitante, o material será descartado.

§ 4º - Havendo possibilidade tecnológica, as amostras a serem preservadas poderão ser analisadas, sendo o resultado desta análise registrado em computador para futuro confronto.

Artigo 5º - É competência exclusiva de Médico Legista a coleta de material biológico para fins de identificação de pessoas vivas ou cadáveres, nos termos desta Resolução.

Parágrafo Único - A coleta de material biológico em pessoas vivas será feita somente em locais apropriados e com o exposto consentimento destas.

Artigo 6º - Em toda coleta de material biológico de pessoas vivas, suspeitas, vítimas ou parentes consanguíneos de primeiro grau e de envolvidos em crimes, será lavrado um termo de coleta, contendo:

- a) nome do doador;
- b) número da Cédula de Identidade e respectivo órgão expedidor;
- c) somente no caso de coleta de amostra de sangue:
 - 1) declaração de estar doando voluntariamente 02 (duas) amostras de sangue periférico, a serem colhidas por punção venosa;
 - 2) declaração de não haver recebido transfusão sanguínea nos últimos 90 (noventa) dias e não ter sido submetido a transplante de medula óssea;
- d) número do Boletim de Ocorrência Policial, Inquérito ou Processo a que se refere o caso, bem como da Autoridade requisitante;
- e) local, data e horário da coleta;
- f) assinatura do doador, do Médico Legista e de 02 (duas) testemunhas. No caso do doador ser analfabeto ou incapacitado, além de sua impressão digital, será exigida a assinatura de uma terceira testemunha a rogo;
- g) declaração do doador de que está fornecendo o material de livre e espontânea vontade;
- h) declaração do órgão coletor de que a coleta será utilizada exclusivamente para exames forenses relacionados com a ocorrência em tela, visando preservar seus direitos de pessoa humana e evitar imputações criminosas indevidas.

II - DISPOSIÇÕES TRANSITÓRIAS

Artigo 7º - O Instituto de Criminalística, através do Centro de Exames, Análises e Pesquisas, planejará e providenciará o necessário treinamento para as equipes periciais designadas estarem aptas à coleta de amostras, a iniciar-se no prazo máximo de 30 (trinta) dias da data de publicação desta Resolução.

Parágrafo Único - Até que a Superintendência da Polícia Técnico-Científica esteja estruturada para o treinamento aludido no "caput", a Academia de Polícia Civil fornecerá o necessário aporte didático e administrativo.

Artigo 8º - Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação, revogando-se as disposições em contrário.

ANEXO DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

- I - Durante qualquer coleta de material biológico é imprescindível a utilização de luvas descartáveis, para que se evite contaminação exógena.
- II - Todos os instrumentos e materiais utilizados na coleta deverão ser estéreis.
- III - Deverão ser evitadas coletas de amostras contaminadas por terra, vegetais e outros elementos orgânicos.
- IV - Cada vestígio eleito para coleta deverá ser fotografado, ter sua origem descrita em relatório individual de identificação, indicando a data e a natureza da ocorrência; o local, a forma e as condições da coleta; o horário em que foi coletado, consignando-se, quando possível, o tempo aproximado após o crime; bem como a forma utilizada para acondicionamento e preservação.
- V - Qualquer material que se destine à análise forense de DNA deverá, desde sua coleta até seu encaminhamento final, ser acondicionado isoladamente e devidamente identificado, através de relatório preceituado no item anterior.
- VI - Todo material úmido coletado deverá permanecer em embalagem plástica pelo tempo máximo de duas horas.
- VII - Para que se evite a degradação e a contaminação por microrganismos, o material a ser analisado, quando úmido, deverá ser necessariamente seco antes de seu acondicionamento final.

DA COLETA, ACONDICIONAMENTO, PRESERVAÇÃO E ENCAMINHAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISE BIOLÓGICA DE IDENTIFICAÇÃO

A) Amostras relacionadas a locais e instrumentos de crime

1. Fluidos líquidos (sangue, espermatozoides e saliva)

VIII - Os fluidos líquidos deverão ser colhidos através de dispositivos próprios para coleta deste tipo de material, composto por haste longa, flexível, com ponta de algodão (denominados *swab*) ou gaze. Deverão secar à temperatura ambiente em local ventilado e abrigado da luz solar, acondicionados isoladamente em envelope de papel escuro ou na própria embalagem do *swab*, e armazenados preferencialmente em congelador a vinte graus Celsius negativos (-20°C) ou, na impossibilidade, em geladeira, a quatro graus Celsius (4°C).

2. Demais fluidos líquidos (urina e outros).

IX - Deverão ser colhidos com seringa ou pipeta plástica, transferidos para frasco próprio e armazenados sob refrigeração.

3. Fluidos líquidos contidos em vestes ou em objetos

X - As vestes ou os objetos umedecidos por manchas de fluidos biológicos deverão ser secos à temperatura ambiente, em local ventilado e protegido da luz solar, acondicionados em envelope de papel escuro ou caixa de papelão própria e armazenados sob refrigeração.

4. Fluidos secos (sangue, espermatozoides, urina, saliva e outros)

XI - Vestígios de material biológico seco, contidos em pequenas áreas de vestes ou em pequenos objetos, deverão, quando possível, ser enviados em sua totalidade para análise.

XII - No caso destes vestígios serem encontrados em grandes objetos ou superfícies não absorventes como metais, paredes e móveis, a mancha de material biológico deverá ser

retirada com o auxílio de uma lâmina de bisturi ou espátula própria para raspagem ou, ainda, com o uso de *swab* umedecido em água destilada estéril e, neste último caso, proceder-se-á necessariamente, após a coleta, a secagem do material.

XIII - Em caso dos vestígios estarem contidos em objetos que possam ser cortados como carpetes, tapetes e madeira, o fragmento com a mancha deverá ser recortado com o auxílio de tesoura ou bisturi.

XIV - Todo vestígio de material biológico seco, independentemente do método utilizado para sua coleta, deverá ser acondicionado isoladamente em envelope de papel escuro ou caixa de papelão própria e armazenado sob refrigeração.

5. Tecidos, órgãos, dentes e ossos novos ou antigos

XV - Deverão ser retirados fragmentos ou partes inteiras de tecidos, órgãos, dentes e ossos com a utilização de pinças, evitando-se mistura de materiais que deverão ser acondicionados isoladamente em frasco próprio ou em envelope de papel ou caixa de papelão, de acordo com o tipo de material e armazenados em congelador (-20°C).

XVI - Como regra geral de preservação do material biológico a ser analisado, não deve, em hipótese alguma, ser utilizada água oxigenada, substâncias cáusticas (como soda) ou clarificantes (como água sanitária), para limpeza de ossos ou dentes.

6. Pêlos e cabelos

XVII - Sejam as amostras individuais ou em tufo, se misturadas com fluidos e tecidos corpóreos, os pêlos ou cabelos, com bulbos, deverão ser separados dos componentes da mistura que os contém.

XVIII - Devem ser evitadas amostras desprovidas de bulbos (raízes), cujo exame dependa da extração diferenciada de DNA (DNA-mitocondrial).

XIX - No caso de amostras úmidas, o material deverá ser seco à temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar e em local ventilado e, em qualquer tipo de amostra, cada grupo de pêlos ou cabelos deverá ser acondicionado separadamente em envelope de papel escuro e acondicionado sob refrigeração.

B) Amostras *post-mortem* (em casos de crimes sexuais)

XX - As amostras da vítima deverão ser sempre coletadas em duplicata.

XXI - Nos crimes sexuais, além da coleta de sangue para identificação da vítima, como preceituada no item XXVII a seguir, deverão ser colhidas, com a utilização de *swab*, amostras da vagina, ânus, boca e possíveis vestígios contidos sob as unhas.

XXII - Sêmen contido na face, ou outras áreas do corpo, também pode ser com *swab* umedecido em água destilada estéril. Nestes casos, uma outra área adjacente, livre de sêmen, deverá ser também esfregada com *swab* para a obtenção de um controle.

XXIII - Após secagem em temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar e em local ventilado, cada *swab* deverá ser isoladamente acondicionado em sua própria embalagem e armazenado sob refrigeração.

Amostras-referência (de origem conhecida)

1. Em vivos:

XXIV - Precedendo-se à coleta de material, o suspeito ou familiar de vítima a ser identificada deverá fornecer por escrito seu consentimento de doação, lavrado em um "Termo de Coleta de Material Biológico" que seguirá junto às amostras para a aceitação do material a ser analisado.

XXV - Aproximadamente 5,0 mL de sangue periférico deverão ser colhidos em duplicata, através de punção venosa, com seringa hipodérmica descartável e transferidos para tubos plásticos com EDTA, devidamente identificados e armazenados em congelador (-20° C).

2. Em cadáveres:

XXVI - Amostras sangüíneas colhidas *post-mortem* podem sofrer problemas de contaminação e degradação do material para análise. Assim sendo, recomenda-se, quando possível, a retirada de sangue por punção cardíaca ou diretamente da cavidade cardíaca ou, ainda, de vaso de grosso calibre.

XXVII - No caso de cadáveres carbonizados, em decomposição ou decompostos, poderão ser retirados como amostras, conforme o caso, fragmentos de fígado, músculos, tufo de fios de cabelos com bulbos, coágulos de sangue contidos nas cavidades e nos órgãos, dentes e ossos, preferencialmente como crista ilíaca, fêmur ou costela.

XXVIII - Cada amostra deverá ser colhida isoladamente e, de acordo com o seu tipo, preservada e acondicionada conforme as normas aqui dispostas para cada tipo específico de material e armazenadas em congelador (-20° C).

ANEXO 2

Alguns dos principais métodos de extração adotados pelo Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo

1 – Para extração de DNA de sangue *in natura* e bem conservado

EXTRAÇÃO DE DNA COM IODETO DE SÓDIO⁴⁴

1. Adicionar 300 µL de NaI, 6M a 300 µL de sangue *in natura*;
2. Agitar por inversão;
3. Acrescentar 600 µL de solução de clorofórmio + álcool isoamílico na proporção 24:1;
4. Centrifugar por 5 min a 10.000 rpm;
5. Remover o sobrenadante com pipeta e colocá-lo em um novo tubo (desprezar o restante);
6. Acrescentar 300 µL de álcool isopropílico absoluto gelado e agitar o tubo (observa-se o DNA na solução);
7. Centrifugar por 5 min a 10.000 rpm;
8. Remover o sobrenadante, por inversão do tubo;
9. Lavar uma vez com álcool isopropílico a 37% e secar em bomba de vácuo;
10. Suspende com 100 µL de TE;
11. Deixar em banho-maria a 56°C, por 10 min
12. Utilizar 2 µL para uma reação de 50 µL de PCR (no caso de sangue) o que corresponde a aproximadamente 400 ng de DNA.

2 - Para extração de DNA de ossos, dentes ou para manchas de sangue ou sangue *in natura* em péssimo estado de conservação

EXTRAÇÃO DE DNA COM FENOL-CLOROFÓRMIO⁴⁵

1. Pipetar 50 µL de sangue *in natura* ou de medula óssea em um tubo eppendorf de 1,5 mL;
2. Acrescentar 10 µL de proteinase K e 300 µL de “*digestion buffer*” e agitar suavemente no vórtex por 10 s;
3. Colocar em banho-maria a 56°C por:
 - a) 2 horas, se a amostra for sangue;
 - b) *overnight* (18 a 24 h), se o material for medula óssea;
4. Para medula óssea, após o banho-maria *overnight*, acrescentar mais 10 µL de proteinase K e incubar mais 1 h a 56°C;
5. Acrescentar às amostras, 300 µL da mistura fenol, clorofórmio, álcool isoamílico, na proporção 25:24:1 e, em seguida, agitar suavemente no vórtex até formar uma mistura homogênea;
6. Centrifugar a 10.000 rpm de 1 a 2 min;

⁴⁴ LOPAREV et. al., An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. **Journal of Virological Methods**, v.34, p.105-112, 1991.

⁴⁵ MANIATIS, T.; SAMBROOK, I.; FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning**, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. 1996. v.3, E3-E4.

7. Separar o sobrenadante (fase aquosa) com uma pipeta (cuidando sempre para não puxar a interfase) e transferi-lo para um outro tubo de 1,5 mL,
 8. Se o sobrenadante não estiver limpo, repetir a operação por uma ou duas vezes, voltando ao item 5;
 9. Acrescentar ao sobrenadante (fase aquosa) 200 µL de acetato de amônia, 6M (este item não é obrigatório);
 10. Acrescentar 300 µL de etanol absoluto gelado e agitar lentamente por inversão do tubo. Nesta fase é possível visualizar uma “nuvem” de DNA que se precipita lentamente. Caso tal nuvem não seja visível, colocar a mistura na geladeira (4°C) por 1 h, pois a baixa temperatura ajuda na precipitação;
 11. Centrifugar a 5.000 rpm por 1 min e inverter o tubo com cuidado para desprezar o sobrenadante;
 12. Lavar o *pellet* de 1 a 3 vezes com etanol 70% gelado;
 13. Desprezar o sobrenadante por inversão do tubo e deixá-lo secar (bomba de vácuo favorece a secagem);
 14. Após constatação da ausência de líquido no tubo, acrescentar de 50 a 100 µL de TE para solubilizar o DNA e colocar o tubo em banho-maria a 56°C por 15 min e o material já estará pronto para quantificação ou reação de PCR.
- OBS: Não será necessária a precipitação com álcool, caso se utilize filtro MICROCON™.

3 – Para extração de DNA de ossos em péssimo estado de conservação

EXTRAÇÃO DE DNA DE OSSO USANDO DNA-IQ™⁴⁶

A) SOLUÇÕES

- 1) Solução de proteinase K → 944 µL de *Bone Incubation Buffer* + 56 µL de solução de PK (volume final 1mL);
- 2) DTT 1M → 5 g de DTT para 32,4 mL de água;
- 3) Tampão de lise → 1 µL DTT 1M + 100 µL de *Lysis Buffer*;
- 4) 1X *Wash Buffer* → 15 mL etanol 96% + 15 mL de álcool isopropílico + 30 mL de 2X *Wash Buffer*.

B) PROTOCOLO

- 1) Colocar 2 g de osso pulverizado em 3 mL de solução de proteinase K a 56°C por 1 h (ou mais);
- 2) Centrifugar a 5000 rpm por 5 min e transferir a solução para outro tubo;
- 3) Adicionar 2X o volume de tampão de lise;
- 4) Levar ao vórtex o tubo com a resina e adicionar 15 µL de resina à amostra;
- 5) Levar ao vórtex a mistura amostra/tampão/resina por 5 s;
- 6) Deixar à temperatura ambiente por 10 min, invertendo o tubo de 1 a 3X;
- 7) Levar ao vórtex por 5 s e colocar tubo na estante magnética;
- 8) Remover e descartar a solução;
- 9) Colocar 100 µL de tampão de lise e levar ao vórtex por 2 s;
- 10) Transferir a mistura para tubo de 1,5 mL;
- 11) Levar ao vórtex por 2 s e colocar o tubo na estante magnética;
- 12) Remover e descartar a solução;
- 13) Colocar 100 µL de *Wash Buffer* 1X;

⁴⁶ Produto de fabricação da Promega Corporation para extração e purificação de DNA.

- 14) Retirar tubo da estante e levar ao vórtex por 2 s;
- 15) Colocar tubo na estante, remover e descartar o tampão;
- 16) Repetir 2X passos 13, 14 e 15;
- 17) Secar a resina com tubo aberto na estante magnética por 5 min (atenção: não deixar secar por mais de 20 min);
- 18) Colocar de 25 a 100 μL de *Elution Buffer* (quanto menor volume, mais concentrado ficará o DNA);
- 19) Fechar tubo, levar ao vórtex por 2 s e deixar a 65°C por 5 min;
- 20) Retirar do banho, levar ao vórtex por 2 s e colocar imediatamente na estante magnética;
- 21) Retirar a solução e transferir para outro tubo. Armazenar DNA a mais ou menos 4°C.

Componentes do *Kit DNA-IQ™*:

Elution Buffer – 15 mL;

2X Wash Buffer – 30 mL;

Lysis Buffer – 40 mL;

Resin – 900 μL ;

Bone Incubation Buffer – 300 mL.

4 – Para extração de DNA de manchas, lâminas e *swabs* contendo esperma

EXTRAÇÃO DIFERENCIAL DE DNA PELO MÉTODO ORGÂNICO⁴⁷

1. Recortar uma pequena porção de tecido contendo a mancha ou do cotonete (*swab*) umedecido em água (usado para retirar o material da lâmina). Colocar em um microtubo de 1,5 mL;
2. Adicionar 501 μL de Tampão de Extração FNE:
 - 400 μL de Tris/EDTA/NaCl^{*};
 - 25 μL de Sarkosil 20%;
 - 75 μL de H₂O;
 - 1 μL de Proteinase K (20 mg/mL)
- (*) Tris/EDTA/NaCl: 10mM Tris-HCl - 1mM EDTA - 100mM NaCl, pH 8,0
3. Submeter ao vórtex e centrifugar por 10 s;
4. Envolver o tubo com *parafilm* e deixar incubando em banho-maria a 37°C por 2 horas;
5. Na falta de tubo spin-X, retirar o tecido ou o algodão (que podem ser congelado, se necessário) e centrifugar a solução a 12.000 rpm por 5 min;
6. Transferir o sobrenadante (rico em células epiteliais femininas = FNE – Fração Não Espermática) para um microtubo estéril e guardá-lo^{**} em geladeira (4°C) até o início da extração propriamente dita (passo 13);
- (**) As Frações obtidas nesta extração podem durar até uma semana se mantidas a 4°C ou por mais tempo a -20°C. No caso de congelamento, antes da utilização, as Frações deverão ser submetidas a banho-maria a 56°C por 5 min;
7. Ao *pellet* (ao que restou no tubo após a retirada do sobrenadante = FE – Fração Espermática, rica em espermatozoides), acrescentar 500 μL de Tampão de Lavagem de Esperma (previamente preparado: 10 mM Tris-HCl - 10 mM EDTA - 50 mM NaCl - 2% SDS, pH 7,5) e submeter ao vórtex;
8. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min;
9. Remover e descartar o sobrenadante;

⁴⁷ FBI – Federal Bureau of Investigation. **PCR-based typing protocols FBI Laboratory**. Albuquerque: FBI, 1994.

10. Repetir os passos 7, 8 e 9 até um total de 3 lavagens;
 11. Adicionar 357 μL de Tampão de Extração FE:
 - 150 μL Tris/EDTA/NaCl;
 - 50 μL de Sarkosil 20%;
 - 150 μL de H_2O ;
 - 2 μL de Proteinase K (20 mg/mL);
 - 7 μL de DTT
 12. Submeter ao vórtex e centrifugar por 10 s;
 13. Envolver o tubo com *parafilm* e deixar incubando em banho-maria a 37°C por 2 h;
 14. Adicionar 400 μL de Clorofane {fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1, v/v)} às Frações FNE e FE de cada amostra e agitar suavemente no vórtex por 10 s;
 15. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 min;
- (FASE DE UTILIZAÇÃO DE MICROCON™ YM - 100 Amicon # 42413)⁴⁸
16. Transferir cuidadosamente (sem tocar com a pipeta a membrana do filtro) a fase aquosa (sem contaminação de solventes) para unidades concentradoras (plástico azul) de MICROCON™ que já deverão conter 100 μL de TE^{-4} (10mM tris-HCl - 0,1 mM EDTA, pH 8,0) ou água estéril;
 17. Centrifugar a 500g ($\cong$ 5.000 rpm) até que o volume tenha sido filtrado ($\cong$ 15 min);
 18. Adicionar 400 μL de TE^{-4} à unidade concentradora do MICROCON™ e centrifugar a 500g ($\cong$ 5.000 rpm) até que o volume tenha sido filtrado ($\cong$ 15 min);
 19. Adicionar de 40 a 100 μL de TE^{-4} (recomenda-se 50 μL) ou água estéril à unidade concentradora do MICROCON™.
 20. Para recuperar o DNA extraído, remova o concentrador do tubo que contém o filtrado (a ser desprezado) e cuidadosamente inverter a unidade concentradora do MICROCON™ (contendo 50 μL de TE^{-4}) em um novo tubo previamente identificado;
 21. Centrifugar a 500g ($\cong$ 5.000 rpm) por 5 min;
 22. Utilizar o filtrado que contém todo DNA extraído e concentrado e utilizá-lo para quantificação e amplificação.

⁴⁸ Filtro concentrador de DNA fabricado pela Millipore.

ANEXO 3

Frequências alélicas observadas para 15 *loci* STR do sistema PowerPlex™ 16 para 100 caucasianos da população brasileira (FIGUEIREDO et al., 2004).

alelo	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317
5		0,00500			0,06000		
6		0,17000					
7		0,23000			0,10500	0,00500	
8		0,14000			0,03000	0,01000	0,11500
9		0,19500			0,02000	0,03500	0,07500
9.3		0,22500					
10		0,03500		0,02500	0,10000	0,05500	0,04000
11				0,01000	0,17500	0,38500	0,30000
12				0,08500	0,15500	0,34000	0,32500
13	0,00500			0,09000	0,09500	0,14500	0,11000
14	0,06500			0,18000	0,06500	0,02500	0,03500
15	0,30500			0,15000	0,06500		
16	0,31000			0,13000	0,03000		
17	0,20500			0,14000	0,01000		
18	0,09500			0,05500	0,04000		
19	0,01500			0,05500	0,01500		
19.2				0,00500			
20				0,04000	0,02000		
21				0,02000	0,01000		
22				0,01000			
23				0,00500			
24					0,00500		
27			0,06500				
28			0,16500				
29			0,20000				
30			0,20000				
30.2			0,04000				
31			0,05000				
31.2			0,10000				
32			0,01500				
32.2			0,09500				
33.2			0,03500				
34.2			0,01000				
35			0,015000				
35.1			0,01000				
homozigosidade*	0,495	0,017	0,263	0,969	0,263	0,159	0,287
teste exato**	0,362	0,041	0,715	0,473	0,764	0,017	0,630
PD	0,89740000	0,92940000	0,96200000	0,96860000	0,97620000	0,85640000	0,91800000
PE	0,53064161	0,61603724	0,72804410	0,76701342	0,79647518	0,47093924	0,56613593

continuação								
alelo	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
2.2				0,015000				
6							0,00500	
7	0,01000		0,03000					
8	0,16500	0,02000	0,00500	0,05000		0,00500	0,51500	
9	0,11000	0,16000	0,02500	0,15000		0,00500	0,10500	
10	0,26500	0,07000	0,21500	0,16000		0,10500	0,07000	
11	0,24500	0,32000	0,35000	0,19500		0,05500	0,25500	
12	0,17500	0,21500	0,30500	0,18500		0,13500	0,04500	
13	0,03000	0,19500	0,06500	0,16000	0,01000	0,25500	0,00500	
14		0,01500		0,06000	0,07000	0,25000		
15		0,00500	0,00500	0,02000	0,18500	0,17000		
16					0,25500	0,02000		
17					0,28000			0,00500
18					0,14500			
18.2								0,00500
19					0,05000			0,07000
20					0,00500			0,14500
21								0,14500
22								0,15500
22.2								0,01000
22.3								0,00500
23								0,18000
24								0,13000
24.2								0,00500
25								0,10500
26								0,03000
27								0,01000
homozigosidade*	0,857	0,735	0,412	0,242	0,194	0,368	0,074	0,400
teste exato**	0,065	0,395	0,785	0,133	0,046	0,466	0,527	0,156
PE	0,91900000	0,91380000	0,88720000	0,94880000	0,90480000	0,93300000	0,81300000	0,95840000
PD	0,60128470	0,57664122	0,49523125	0,69194011	0,59566631	0,62637293	0,41488206	0,73148288

PD = poder de discriminação

PE = poder de exclusão

* X^2_{ldf} baseado em estimativa imparcial de 2000 rearranjos

** teste exato baseado em 2000 rearranjos

ANEXO 4

Fórmulas para cálculo de índice de paternidade (IP) ou de maternidade (IM) e poder de exclusão (PE)

tipo	M	C	SP	IP	PE
1	P	P	P	$1/p$	$p(2-p)$
2	P	P	PQ	$1/2p$	$p(2-p)$
3	P	PQ	PQ	$1/2q$	$q(2-q)$
4	PQ	PQ	PQ	$1/(p+q)$	$2(p+q)-(p+q)^2$
5	PQ	P	P	$1/p$	$p(2-p)$
6	PQ	PQ	P	$1/(p+q)$	$2(p+q)-(p+q)^2$
7	PQ	P	PQ	$1/2p$	$p(2-p)$
8	Q	PQ	Q	$1/q$	$q(2-q)$
9	PQ	QR	R	$1/r$	$r(2-r)$
10	P	PR	QR	$1/2r$	$r(2-r)$
11	PQ	QR	PR	$1/2r$	$r(2-r)$
12	PR	PR	QR	$1/[2(p+r)]$	$2(p+r)-(p+r)^2$
13	PR	QR	QR	$1/2q$	$q(2-q)$
14	PR	R	QR	$1/2r$	$r(2-r)$
15	ausente	PQ	QR	$1/4q$	$2(p+q)-(p+q)^2$
16	ausente	PQ	Q	$1/2q$	$2(p+q)-(p+q)^2$
17	ausente	PQ	PQ	$(p+q)/4pq$	$2(p+q)-(p+q)^2$
18	ausente	Q	QR	$1/2q$	$q(2-q)$
19	ausente	Q	Q	$1/q$	$q(2-q)$
				IM	PE
20	QR	PQ	ausente	$1/4q$	$2(p+q)-(p+q)^2$
21	Q	PQ	ausente	$1/2q$	$2(p+q)-(p+q)^2$
22	PQ	PQ	ausente	$(p+q)/4pq$	$2(p+q)-(p+q)^2$
23	QR	Q	ausente	$1/2q$	$q(2-q)$
24	Q	Q	ausente	$1/q$	$q(2-q)$

Notas: Probabilidade de Exclusão = $1 - (\text{poder de exclusão})$; M = mãe; C = criança; SP = suposto pai.

ANEXO 5

Fórmulas para cálculo de índice de parentesco reverso (IPR)

(PEREIRA; MALAGHINI, 2004)

SM	C	SP	numerador	denominador	IPR
A	A	AB	0,5	a^2	$0,5/a^2$
A	AB	AB	0,5	$2ab$	$0,5/2ab$
A	AB	BC	0,5	$2ab$	$0,5/2ab$
AB	A	AB	0,25	a^2	$0,25/a^2$
AB	A	AC	0,25	a^2	$0,25/a^2$
BC	AB	AB	0,25	$2ab$	$0,25/2ab$
BC	AB	AC	0,25	$2ab$	$0,25/2ab$
BD	AB	AC	0,25	$2ab$	$0,25/2ab$
A	A	A	1	a^2	$1/a^2$
AB	A	A	0,5	a^2	$0,5/a^2$
B	AB	A	1	$2ab$	$0,5/ab$
BC	AB	A	0,5	$2ab$	$0,25/ab$
AB	AB	AC	0,25	$2ab$	$0,125/ab$
AB	AB	A	0,5	$2ab$	$0,25/ab$
AB	AB	AB	0,5	$2ab$	$0,25/ab$

Notas: SM = suposta mãe; C = cadáver; SP = suposto pai.

ANEXO 6**Exemplo de laudo de identificação humana emitido pelo Laboratório de DNA do
Instituto de Criminalística de São Paulo**

Neste trabalho serão omitidos todos os dados que possam implicar a identificação das partes envolvidas, uma vez que não é de nosso conhecimento se caso continua ou não ainda *sub judice*.

São Paulo

DELEGACIA DE POLÍCIA DE A/SP
B. O. N° 000/04
I. P. N° 00/04
PROCESSO N° 000/2004 da 1ª Vara Criminal de A/SP

LAUDO N° 02/130/00000/2004*
NBB/LABORATÓRIO DE DNA

NATUREZA DO EXAME: Análise de DNA genômico para pesquisa de ocorrência de **vínculo genético** familiar em caso de **ENCONTRO DE CADÁVER**

LOCAL: Rua José da Silva, 25 – Bairro da Consolação – A/SP

DATA: 01/04/04 **HORA:** 15:00

PARTES: **XX**
FRAGMENTO DE FÊMUR DO CADÁVER
ENCONTRADO

REQUISITANTE: Dr. Y – DD. Delegado de Polícia da Delegacia de Polícia de A/SP

RELATORES: Peritos Criminais Norma Sueli Bonaccorso e Cristina Lekich Gonzalez

*NÃO ACOMPANHA PEÇA

LAUDO

Aos 29 dias do mês de abril do ano dois mil e quatro, na cidade de São Paulo e no Instituto de Criminalística da Superintendência da Polícia Técnico-Científica da Secretaria da Segurança Pública do Estado de São Paulo, em conformidade com o disposto no artigo 178 do Decreto-Lei nº 3.689, de 03 de outubro de 1941, foram designados, pelo Dr. José Domingos Moreira das Eiras, Diretor deste Instituto de Criminalística, os Peritos Criminais Dra. Norma Sueli Bonaccorso e Dra. Cristina Lekich Gonzalez para procederem ao exame supracitado, em atendimento à requisição do Dr. Y – DD. Delegado de Polícia da Delegacia de Polícia de A/SP.

1 INFORMAÇÕES PRELIMINARES

Cada indivíduo possui características genéticas comuns que o inclui como membro da espécie humana, além das individuais exclusivas que diferenciam uma pessoa da outra. A este fenômeno, dá-se o nome de "polimorfismo genético". Os exames de vínculo genético de filiação são baseados na análise das características genéticas que são próprias e exclusivas para cada indivíduo. Tais características são herdadas, pelos filhos, de seus pais biológicos, sendo metade delas proveniente da mãe e a outra metade do pai. Essa análise pode ser realizada pelo estudo de marcadores genéticos utilizando sistemas de amplificação de DNA⁴⁹ que revelam com grande precisão as características genéticas que foram fornecidas por cada um dos pais biológicos ao seu filho, tornando possível avaliar o vínculo genético familiar, com precisão de 99,9999%. Isto significa que podemos determinar os pais biológicos, analisando as regiões específicas do DNA ou *loci* genéticos onde ocorrem polimorfismos.

Após a identificação dos alelos como bandas ou picos, é possível assinalar com certeza os alelos de DNA do material biológico estudado e compará-los com o familiar direto, seja ele o pai, a mãe, o filho ou a filha. Estes deverão apresentar metade dos alelos iguais aos encontrados no DNA do sangue de quem lhe é aparentado na relação pai/mãe - filho/filha. No caso de irmãos, ter-se-á, em média, metade das bandas ou picos similares e no caso de avô/avó - neto/neta, 25%.

⁴⁹ Ácido Desoxirribonucleico - molécula que contém a informação genética, formada por cadeia de polinucleotídeos constituída de grupo fosfato, de açúcar (desoxirribose) e de base nitrogenada (adenina, timina, citosina ou guanina) [Sim.: ADN e (ingl.) DNA].

A análise genética de vestígios biológicos está diretamente relacionada com a quantidade, porém, muito mais com a qualidade do DNA obtido de evidências. Dessa forma, muitas vezes, pequenas quantidades de material biológico são suficientes para a obtenção de material genético, devido às técnicas avançadas de amplificação do DNA. Contudo, deve-se levar em consideração que alguns materiais encontrados em local de crime, coletados no exame de necropsia e preparados com determinados conservantes ou oriundos de atos exumatórios podem apresentar substâncias contaminantes e/ou interferentes que implicam a não amplificação do DNA extraído e, por conseguinte, na impossibilidade de obtenção de informações genéticas sobre o material questionado, no todo ou em parte.

2 OBJETIVO DO EXAME

O presente exame tem por objetivo inicial a determinação do padrão de DNA na amostra cadavérica enviada e, caso se alcance êxito na obtenção deste padrão, por meio da comparação de genótipos, se buscará estabelecer eventual relação de vínculo familiar com a amostra sangüínea de sua suposta mãe XX.

3 DOS EXAMES

3.1 Materiais e métodos

3.1.1. Materiais biológicos

- a)* Amostras de sangue de XX, suposta mãe do cadáver, coletadas sob Termo nº 0000/04 e sob lacre nº 000000;
- b)* Material ósseo (terço superior do fêmur esquerdo), retirado do cadáver encontrado que se supõe ser fulano de tal, sob lacre nº 00000.

Todos os materiais recebidos foram devidamente colhidos, identificados e preservados nos ditames da Resolução 194, de 02/06/99, da Secretaria da Segurança Pública do Estado de São Paulo⁵⁰.

⁵⁰ D.O.E.; Poder Exec., Seq. I, São Paulo, 109 (104), quinta-feira, 3 jun. 1999 - 3.

3.1.2 Métodos

a) Extração de DNA

Amostras do material sangüíneo acima descrito foram submetidas a métodos de extração para retirada de alíquotas de DNA genômico, tendo sido empregada a extração salina pelo iodeto de sódio (LOPAREV et al., 1991⁵¹).

Em relação ao material cadavérico, foram empregadas as seguintes metodologias de extração de DNA: orgânica por Fenol/Clorofórmio (MANIATIS; SAMBROOK; FRITSCH, 1986⁵²) e modificado com aplicação de diferentes volumes de EDTA e concentrações de proteinase K, bem como pelo emprego do sistema de extração e purificação DNA IQ™ (Cat. # DC6700 – Lot # 142416 – Exp. Date JUN 04), da Promega Corporation, com emprego de filtros concentradores de DNA MICROCON™ YM – 100 da Millipore (Cat. # 42413 – Lot # R3JN96320).

b) Quantificação de DNA

As amostras de DNA total foram quantificadas em gel de agarose 0,7% e coradas com brometo de etídio.

c) Amplificação das regiões polimórficas do DNA (*loci*)

As amostras extraídas contendo DNA em quantidade satisfatória foram submetidas ao processo de amplificação pelo método da PCR⁵³, com o emprego dos seguintes sistemas marcadores ou *loci*: SISTEMA MULTIPLEX - Power Plex™ 1.1 System: CSF1PO, TPOX, TH01, vWA, D16S539, D7S820, D13S317 e D5S818 (Cat. # DC6090 – Lot# 144227 – Exp. Date Jan 05) e SISTEMA AMELOGENINA, para determinação do sexo, (Cat. # DC5170 – Lot# 174805), sendo ambos os sistemas da Promega Corporation. Para tal propósito, foi utilizado o termociclador PT-100, fabricado por M. J. Research, programado de forma específica, segundo protocolos recomendados pela Promega Corporation.

d) Caracterização dos alelos dos *loci* amplificados

Os produtos de amplificação do sistema multiplex e amelogenina foram caracterizados, após separação eletroforética⁵⁴, em gel de poliacrilamida desnaturante a 6%

⁵¹ LOPAREV et. al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. **Journal of Virological Methods**, v.34, p. 105-112, 1991.

⁵² MANIATIS, T.; SAMBROOK, I.; FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning**, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. 1996. v.3, E3-E4.

⁵³ *Polimerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase.

⁵⁴ Método que submete as partículas de uma solução coloidal à influência de um campo elétrico, promovendo a sua diferenciação por migração; anaforese.

e detecção por meio de plataforma de análise fluorescente FMBIO[®] IIe, da Hitachi Genetic System.

4 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

a) Quantificação de DNA

Os resultados nesta etapa demonstraram que ambas as amostras analisadas se encontravam em quantidade suficiente para o prosseguimento das análises.

b) Amplificação das regiões polimórficas do DNA (*loci*)

Os resultados alcançados estão expressos na tabela abaixo reproduzida.

Perfis alélicos e suas respectivas frequências para os *loci* analisados, obtidos das amostras biológicas oriundas da suposta mãe XX (a) e do material cadavérico (b)

<i>loci</i> amostras	CSF1PO	TPOX	TH01	vWA	D16S539	D7S820	D13S317	D5S818	sexy
(a)	8/11	7/8	7 0,208	14/17	11/12	9/13	9/13	11/13	XX
	0,027	0,012		0,087	0,312	0,104	0,085	0,337	
	0,279	0,461		0,248	0,246	0,036	0,118	0,177	
(b)	8/11	7/8	7 0,208	14/17	12/13	10/13	8/9	13	XY
	0,027	0,012		0,087	0,246	0,310	0,088	0,177	
	0,279	0,461		0,248	0,139	0,036	0,085		

Os alelos expostos na tabela acima deixam evidente que o material cadavérico é de origem masculina e que em todos os *loci* polimórficos analisados, o perfil genético do cadáver (item 3.b) apresenta os alelos em comum com a suposta mãe XX (item 3.a), estabelecendo a condição de inclusão de maternidade na ausência do pai.

Para a verificação da condição estabelecida, é suficiente calcular-se o índice de maternidade⁵⁵ na ausência do pai, tomando-se em conta os valores de frequências dos alelos identificados pelos marcadores utilizados, segundo os seus bancos de dados específicos⁵⁶.

⁵⁵ O *Índice de Maternidade* é verificado por meio da razão entre a probabilidade das bandas pertencentes ao perfil genético do(a) filho(a) e que estejam em coincidência com o perfil da suposta mãe, serem oriundas dessa suposta mãe, e a probabilidade delas serem oriundas de qualquer indivíduo da população.

⁵⁶ Lins, A.M. et al. Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. **J. Forensic Sci.**, v.43, p.1168, 1998.

Conforme ilustra o ANEXO A, o valor encontrado para o índice de maternidade na ausência do pai é de 237.543,6911. A probabilidade de maternidade⁵⁷ na ausência do pai encontrada, baseando-se nos mesmos parâmetros, é de 99,9996% e a probabilidade de exclusão⁵⁸ é de 99,7174%.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e expressos na tabela acima reproduzida e no ANEXO A oferecem condições para que se possa concluir, após tratamento estatístico, que existe uma **probabilidade mínima de 99,999%**, calculada na ausência do pai e corroborada com uma **probabilidade de exclusão de 99,72%**, de que XX seja a genitora da pessoa que deu origem ao material cadavérico aqui analisado.

O presente laudo foi aqui protocolado sob nº **02/130/00000/2004**, o qual, rubricado e assinado, é digitado no anverso de 06 (seis) folhas deste impresso mais o ANEXO A e dele fica aqui arquivada cópia devidamente autenticada.

Era o que havia a relatar⁵⁹

São Paulo, 27 de maio de 2004

NORMA SUELI BONACCORSO
Perita Criminal
CRB 2780/01-D

CRISTINA LEKICH GONZALEZ
Perita Criminal
CRBM 3315

⁵⁷ A *Probabilidade de Maternidade* é calculada de acordo com o Teorema de Bayes, a partir do Índice de Maternidade, e representa a probabilidade de a suposta mãe ser a mãe biológica do cadáver ($PM = [IMC/(IMC + 1)] * 100$).

⁵⁸ A *Probabilidade de Exclusão* indica a probabilidade de **não** se encontrar outro indivíduo, aleatoriamente selecionado na população, que possua o mesmo perfil genético da mãe biológica do cadáver.

⁵⁹ O restante dos materiais analisados permanece guardado neste Laboratório de DNA para eventual nova perícia.

ANEXO A do laudo 02/130/00000/2004

	IM	Poder de Exclusão	LOCI
1	10,1553	0,5184	CSF1PO
2	21,3756	0,7223	TPOX
3	4,8077	0,3727	TH01
4	3,8816	0,5578	vWA
5	1,0163	0,6218	D16S539
6	6,9444	0,5723	D7S820
7	2,9412	0,3161	D13S317
8	2,8249	0,3227	D5S818
IMC ⇒	237.543,6911	0,0028	⇐ PoEC

PM(%) ⇒

99,9996

PEC(%) ⇒

99,7174

IM = Índice de Maternidade: com fórmula específica derivada do Teorema de Bayes

Poder de Exclusão: com fórmula específica derivada do Teorema de Bayes

IMC = Índice de Maternidade Combinado - $IMC = (IM1 * IM2 * IM3 * ... * IMn)$ PM = Probabilidade de Maternidade - $PM = [IMC / (IMC + 1)] * 100$ PoEC = Poder de Exclusão Cumulativo - $PoEC = (PE1 * PE2 * PE3 * ... * PEn)$ PEC = Probabilidade de Exclusão Cumulativa - $PEC = (1 - PoEC) * 100$

ANEXO 7**LABORATÓRIO DE DNA DO INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DE SÃO PAULO
CONTROLE INTERNO DE PROCEDIMENTOS**

PASSAGENS DE: ☒ EXTRAÇÃO ☐ QUANTIFICAÇÃO ☐ AMPLIFICAÇÃO ☐ APLICAÇÃO ELETROFORESE
TÉCNICO A SUPERVISOR B DATA 15 / 04 / 05 FOLHA Nº 01

TUBOS ORIGINAIS **TUBOS RECEPTORES**

ANEXO 8

INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA
“Perito Criminal Dr. Octávio Eduardo de Brito Alvarenga”
CENTRO DE EXAMES, ANÁLISES E PESQUISAS - CEAP
NÚCLEO DE BIOLOGIA E BIOQUÍMICA - LABORATÓRIO DE DNA

FICHA GERAL DE ACOMPANHAMENTO DAS ANÁLISES

PERITOS: _____ / _____ CONTROLE CASO Nº _____
 RE/RA _____
 ORIGEM _____
 ENTRADA ____/____/____
 INÍCIO ____/____/____
 TÉRMINO ____/____/____
 OBS. PRAZO: _____

TIPO DE CASO: ☐ VÍNCULO FAMILIAR
☐ CONFRONTO
☐ CRIME SEXUAL (☐ CONSTATAÇÃO ☐ CONFRONTO)

MATERIAIS RECEBIDOS:

- (1) _____
 (2) _____
 (3) _____
 (4) _____
 (5) _____
 (6) _____

OBS. ESTADO DE CONSERVAÇÃO/IDENTIFICAÇÃO AMOSTRAS/CADEIA DE CUSTÓDIA:

☐ PRESENÇA DE LACRE: _____
☐ IDENTIFICAÇÃO: _____
☐ PRESERVAÇÃO: _____

PREPAROS PRÉ-AMPLIFICAÇÃO: _____

EXAMES PRELIMINARES:

☐ UV/LUMINOL _____
☐ FOSFATASE ÁCIDA _____
☐ Nº ESPERMATOZÓIDES/LÂMINA _____
☐ CONSTATAÇÃO SANGUE _____
☐ PROTEÍNA HUMANA _____
☐ OUTROS _____

EXTRAÇÃO (MATERIAIS/Nº. TENTATIVAS):

☐ LOPAREV _____
☐ FENOL/CLOROFÓRMIO _____
☐ EXTRAÇÃO DIFERENCIAL _____
☐ DNA IQ: ☐ EXTRAÇÃO _____ ☐ PURIFICAÇÃO _____
☐ OUTROS KITS _____

continuação

QUANTIFICAÇÃO (AMOSTRAS/RESULTADOS OBTIDOS):

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____
- (4) _____
- (5) _____
- (6) _____

AMPLIFICAÇÃO (TAQ/KITS UTILIZADOS):

TAQ: _____

☐ PP 1.1

☐ PP 2.1

☐ PP 16

☐ AMELOGENINA

☐ MONOPLEX _____

☐ CROMOSSOMO Y

ELETROFORESE (OBS. GEL/CORRIDA):

FICHAS DE CONTROLE INTERNO DE PROCEDIMENTOS: _____

LEITURA:

☐ ANEXOS

CÁLCULOS ESTATÍSTICOS:

☐ ANEXOS

RESULTADO/CONCLUSÃO:

GUARDA DE MATERIAL PARA NOVA PERÍCIA: _____

DEVOLUÇÃO MATERIAIS:

ANEXOS: ☐ NÃO ☐ SIM – LACRE(S): _____

ANEXO 9

Sugestões para evitar a contaminação em laboratório que efetuam tipagem de DNA pela PCR

Rebouças (2004) recomenda que no laboratório exista a separação de três áreas distintas. A área 1 deve ser destinada ao preparo e à extração de DNA das amostras recebidas. Na área 2 deve ser destinada para a mistura de reagentes e pipetagem das reações. Aqui deve ser lembrado que, sempre que se forem fazer várias reações, deve ser preparado um *master mix*, para ser em seguida aliquoteado em cada tubo de reação. A área 3 (pós-PCR) fica destinada à análise dos produtos de PCR.

O fluxo de ar deve se dar das áreas 1 e 2 para a área 3, ou estas áreas devem ser completamente independentes para evitar transmissão de aerossóis da área 3 para as áreas 1 e 2.

Micropipetas exclusivas devem ser dedicadas para cada área específica, sendo que as micropipetas utilizadas na área 2 para pipetar DNA nas misturas de reação para PCR devem ser dotadas de dispensadores positivos (que não provocam aerossol) e de ponteiros com filtro que jamais devem ser reutilizadas.

É ideal que a área 2 tenha câmara de segurança com luz ultravioleta. A exposição da área de preparo, do material, e mesmo de alguns reagentes à luz ultravioleta danifica o DNA que eventualmente esteja contaminando o local, tornando-o não amplificável, reduzindo-se, assim, a contaminação por moléculas de DNA contaminante. A exposição por 4 horas à luz ultravioleta reduz em 1.000 vezes o número destas moléculas.

Materiais plásticos como tubos e ponteiros não devem ser reutilizados. Todo material plástico empregado deve ser estéril, como também devem ser autoclavadas as partes próprias das micropipetas.

Todas as soluções devem ser autoclavadas, com exceção do DNA, da enzima DNA polimerase e dos dNTPs.

As ponteiros devem ter filtro protetor, o que evita contaminação por formação de aerossol.

Deve ser utilizado um avental específico para as áreas 1 e 2 (pré-PCR). O avental utilizado na área 3 (pós-PCR) não deve ser usado nas demais áreas.

A área pós-PCR deve estar distante das áreas de preparo de amostra e de pipetagem dos reagentes.

A troca de luvas descartáveis deve ser freqüente e obrigatória quando o analista adentrar a área 1 ou 2, especialmente se estiver vindo da área 3.

O DNA que se quer analisar deve ser adicionado por último na reação, de modo a evitar a transferência de amostras de DNA de um tubo para outro.

Deve sempre ser feito um controle negativo (sem *template* ou DNA molde). O tubo do controle negativo deve ser preparado por último para que seja representativo da manipulação que ocorreu nos demais tubos.

Para que seja evitada a contaminação na fase de eletroforese, as cubas de eletroforese, as bandejas e os pentes devem ser bem lavados em solução de HCl 1 M.

Durante a pipetagem de amostras no gel de eletroforese, uma amostra colocada em um dos poços pode atingir o poço adjacente, acarretando uma mistura de amostras. Isto pode ser evitado deixando-se alternadamente poços vazios ou se colocando as amostras que se quer cotejar em faixas em faixas não adjacentes (NRC, 1996).

Como alerta para que se evite a contaminação *carryover* deve sempre ser lembrada a estimativa de que aproximadamente 100 mL de uma reação de PCR usual, se diluídos em um volume de água equivalente ao de uma piscina olímpica, resultam em 400 moléculas por 100 mL da água da piscina (REBOUÇAS, 2004).

O DNA contaminante pode ser eliminado pelo uso de dUTP nucleotídeo (deoxiuridina trifosfato) no lugar de dTTP, usualmente empregado em todas as reações de PCR. Os produtos da PCR obtidos desta maneira podem ser seletivamente destruídos pela enzima Uracil-DNA-glicosilase (UNG), que causa excisão da dUTP. Da mesma forma,

todas as amostras-problema seriam tratadas com UNG antes da amplificação pela PCR, para destruir a contaminação por reações de PCR anteriores (NRC, 1992).

Rebouças (2004) sugere ainda que no preparo que antecede a extração de DNA da amostra, esta deve ser separada em fragmentos que possam ser testados de forma independente. Sugere também que se utilizem os métodos mais simples de extração, para evitar manipulação e possível contaminação do material. Caso exista quantidade suficiente de DNA ao final extração, deve ser sempre feita a eletroforese de uma pequena alíquota deste material em gel de agarose para que seja verificada a qualidade do DNA extraído, pois o efeito de eventuais contaminantes que poderiam interferir na eficiência da reação pode ser eliminado diluindo-se a amostra, e conseqüentemente, os contaminantes. Isso é possível, visto que 100 moléculas alvo já são suficientes para amplificação.

ÍNDICE REMISSIVO

AABB, 89
 AAFS, 109
 ácidos nucleicos, 26, 67, 159
 AICEF, 109
 alça-D, 31, 40, 65
 amostras mistas, 106
 AmpFLPs, 37, 38, 39, 74
 amplificação de múltiplo deslocamento, 42
 amplificação preferencial, 37
 amplificações simultâneas, 39
 analisadores automáticos, 75, 79
 análise de RNAs mensageiros, 42
annealing, 69, 71, 72
 anomalias genéticas, 87
 aspectos éticos, 13, 61, 129, 141, 144
 ataques terroristas, 41
 auto-radiografia, 35, 36, 39, 103
 banco de dados, 12, 24, 56, 81, 83, 84, 85, 86, 99, 111, 113, 114, 116, 127, 132, 157
 bases nitrogenadas, 27, 28, 69, 160
 cadeia de custódia, 53, 54, 55, 56, 92, 96, 98, 105, 113, 133, 138, 144
 cálculo da frequência de um perfil, 83
 calibração de equipamentos, 104
 catástrofes, 11, 51
 centro de custódia, 54, 127, 138
 chances (*odds*), 87
chelex, 63, 64, 65
 cinética da PCR, 71
 CODIS, 66, 74
 coleta forçada, 59
 combinação de perfis, 11, 88, 120
 caso Enderby, 21
 confiabilidade, 53, 102, 103, 110, 121
 contaminação, 25, 38, 45, 49, 51, 52, 53, 54, 67, 68, 72, 80, 87, 103, 105, 106, 107, 163, 165, 169, 184, 185, 186
 conteúdo de DNA nas amostras, 21
 contraditório, 53, 59, 93, 108, 138, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 144, 145
 contraperícia, 54
 contraprova, 54, 55
 controle externo de qualidade, 95
 controles de qualidade (CQ), 101, 102, 105, 108, 133, 141
 credenciamento, 110, 143
 credibilidade, 55, 90, 110, 134, 136, 138, 139
 cromossomo Y, 39, 40, 68, 74, 126
 cross-examination, 129
 culpabilidade, 59, 129, 133, 145
 “cultura do DNA”, 112, 113, 115, 142
 Daubert v. Merrell Dow Pharmaceuticals, 130
 deposição direta, 44

desastre em massa, 11
 desempenho laboratorial, 101, 104, 111
 desnaturação, 36, 69, 70, 157
 determinação da *causa mortis*, 42
dotblot, 37, 38, 40
 EDNAP, 108
 eletroferograma, 79, 80
 eletroforese, 36, 39, 68, 75, 79, 104, 106, 158, 160, 181, 185, 186
 ENFSI, 73, 74, 109
 enzimas de restrição, 35
 equilíbrio de HW, 82, 83, 85, 87, 90
 equilíbrio de ligação (EL), 83, 87
 erros de manipulação, 51, 101, 104, 105
 erros judiciais, 96, 141
 escada alélica, 76, 77, 80, 87
 estrutura do DNA, 27
 excelência, 14, 51, 101, 103, 104, 111, 133, 134, 139, 145
 extension, 69
 extração diferencial, 65, 66, 106, 168
 extração orgânica, 62, 63, 64, 66, 67, 71, 166, 169, 177
 falácia da defesa, 89
Federal Bureau of Investigation (FBI), 39, 46, 64, 74, 109, 168
 fenótipo, 17, 24, 158, 159
 filtros concentradores de DNA, 64, 177
 fingerprint of DNA, 35
 fluoróforos, 39
 formulação de quesitos, 92, 93, 99, 135, 137
Frye v. Estados Unidos, 130
 garantia de qualidade (GQ), 101, 102, 103, 108, 133, 141
 gel de agarose, 68, 72, 158, 178, 186
 gel de poliacrilamida, 39, 75, 76, 77, 78, 158, 177
 gêmeos idênticos, 18, 81
 gêneros alimentícios, 25
 genética populacional, 83, 84, 132, 133
 genoma mitocondrial, 40
 genótipo, 17, 18, 19, 38, 80, 81, 82, 83, 85, 131, 133, 158, 176
 GITAD, 46, 109, 118
 grupos sangüíneos, 19
Hardy-Weinberg, 82, 83, 85, 87, 79, 158, 160
 heterozigoto, 35, 80, 82, 83, 84, 85, 158
 hibridização, 36, 42, 69
 HLA, 20, 22, 38, 39
 homoplasmia, 40, 158
 homozigoto, 82, 83, 84, 85, 159
 identificação de cadáveres, 39, 51, 89, 91, 97, 117, 118, 119, 120, 124, 126, 128, 144
 identificação nominal, 100, 145
 IMESC, 119
 in dubio pro reo, 136
 incidentes jurisdicionalizados, 138
 incompatibilidade de resultados, 105

índice avuncular, 91
 índice de maternidade, 172, 178, 179, 180
 índice de maternidade cumulativo, 179, 180
 índice de parentesco reverso (IPR), 91, 173
 índice de paternidade (IP), 89, 172
 índice de paternidade cumulativo (IPC), 89
 inibidores da PCR, 37, 65, 66, 121, 122
 Inmetro, 110
 interdisciplinaridade, 137
 ISFG, 46, 108
 justiça cível gratuita, 109
 laboratórios regionais de DNA, 56, 111, 112, 113, 114, 115
 LCN-DNA, 73, 80
 leitura dos alelos, 39, 68, 96, 99, 105
 libertação de prisioneiros, 141
 lise diferencial, 23, 65
loci VNTR, 34, 35, 38, 81, 130, 160
 materiais vegetais, 24
 material animal, 24
 melanócitos, 24
 melting, 69
 microchips, 41, 42
 microssatélites, 21, 34, 35, 72
 minissatélites, 21, 34, 35
 mistura de materiais, 23, 39, 46, 53, 57, 65, 67, 72, 74, 80, 86, 87, 88, 104, 106, 108, 160, 164, 166, 185
 mitocôndrias/mtDNA, 31, 37, 40, 41, 42, 46, 64, 65, 68, 118, 120, 127, 144, 157
 molécula de DNA, 14, 27, 28, 29, 30, 70, 72, 158, 184, 185
 mutações, 24, 41, 80, 87, 91, 158, 159
 National Research Council (NRC), 80, 108
nemo tenetur se detegere, 59
nested-PCR, 72
 NIST, 109
 nova perícia, 54, 58, 92, 100, 136, 179
 o povo v. *Castro*, 131
 padrão da metodologia consistente, 130
 pareamento, 29, 30, 70, 71, 159
 parentesco, 19, 20, 35, 56, 82, 87, 91, 173
 PCR em tempo real, 68
 poder discriminatório, 22, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 73, 74, 88, 101
 polimorfismo, 16, 23, 33, 34, 35, 37, 38, 40, 44, 62, 114, 144, 159, 160, 175
 população randômica, 86
 possíveis contribuintes, 84, 87, 106
 primeira lei de Mendel, 32
primer, 69, 70, 71, 72, 75, 95, 96, 159
 probabilidade condicional, 85, 89
 probabilidade de combinação aleatória, 86
 probabilidade *a posteriori*, 90
 probabilidade *a priori*, 90
 probabilidade de exclusão/(PE), 86, 89, 90, 172

probabilidade de inclusão, 19, 20, 81, 84, 86, 132, 142
probabilidade de maternidade (PM), 179, 180
probabilidade de paternidade (PP), 89, 90
proficiência, 103, 104, 109, 141, 143, 160
Projeto de Implantação de Laboratórios Regionais de DNA, 56, 111, 112, 114, 115, 139
projeto *joão ninguém*, 11
Projeto de Lei, 110, 111, 137
Projeto Inocência, 141
proteínase K, 62, 63, 71, 166, 167, 168, 169, 177
prova de *Coombs*, 19
purificação do DNA, 62, 64, 65, 167, 177
qualidade dos testes, 95
quantidade de material genético, 31
quantificação por fluorescência, 67
quantificação por espectrofotometria, 67
raciocínio analítico, 105
razão de verossimilhança (LR), 85, 86, 87, 89, 90, 99
reagentes feitos *in house*, 95
recombinação gênica, 16, 18, 40, 83
regiões hipervariáveis, 21, 31, 32, 33, 34, 40
regra da multiplicação ou do produto, 32, 83, 90
regras de admissibilidade de provas, 133
repetição de testes, 58, 103, 108, 135
responsável técnico, 95, 100
RFLP, 35, 36, 37, 38, 39, 157, 160
salting out, 63, 64
SBML, 56, 109
segunda geração de multiplex, 73, 74
segunda lei de Mendel, 32
seqüência de Anderson ou de Cambridge, 40
sigilo das informações genéticas, 140, 141
sistema ABO, 16, 19
sistema adversarial, 129
sistema amelogenina, 23, 73, 74, 79, 105, 157, 177
sistema anglo-americano, 129, 133, 134
smear, 72
SNPs, 34, 40, 41, 42, 109, 160
sofisma do promotor, 88
sonda multilocal, 35, 157
sondas para *loci* únicos, 35, 36, 73, 157
sorologia tradicional, 22, 160
southern blotting, 36, 37, 160
stutters, 87
subdivisão populacional, 82, 83
SWGDAM, 109
teorema de Bayes, 89, 90, 91, 179, 180
terrorismo, 11, 41
teste da aceitação, 130
teste *Frye*, 130
testes de aglutinação, 18, 19

testes de paternidade, 89, 90, 109, 118, 119
testes de qualidade, 91, 103, 104, 131
transferência, 44, 45, 55, 62, 104, 185
translocações, 87
trissomias, 87
validação, 39, 67, 112, 114, 126, 127
valor C, 33
Y-STR, 40