

CAPÍTULO 7

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS VIVAS, CORPOS MORTOS E MATERIAL BIOLÓGICO PELO DNA

Paulo Newton Danzi Sálvia

2021

Sumário

Métodos e técnicas de identificação de pessoas e amostras biológicas

Fundamentos e análise de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Erros em DNA

Introdução

Finalidades da identificação

Métodos de identificação judiciária

Identificação Médico Legal

Estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA)

Técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amostras

Processamento - Reação de PCR

Investigação de vínculos biológicos genéticos

Teste da paternidade

Laudos

Métodos

Amplificação das Regiões Polimórficas do DNA (loci)

Caracterização dos alelos dos loci amplificados

Amplificação de DNA

Análise e interpretação dos resultados obtidos

Conclusão

Perícia e Erros Laboratoriais em DNA

Preparação para a perícia

Coleta

No laboratório

Possibilidades de discrepâncias nos testes

Evolução das técnicas

Eventos nos testes que podem interferir nos resultados:

Na Extração

Na amplificação e revelação

Considerações finais sobre a perícia envolvendo DNA

Referências bibliográficas

Métodos e técnicas de identificação de pessoas e amostras biológicas

Fundamentos em análise de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Erros em DNA

Introdução

As técnicas de identificação de pessoas e amostras biológicas se sofisticaram. Entretanto, a metodologia e os princípios fundamentais pouco se alteraram. Um dos pilares desses princípios se baseia na comparação entre os padrões, confrontando-se duas ou mais amostras provenientes de pessoas, animais, quer sejam líquidas ou sólidas, como fragmentos de tecidos moles ou ossos. Outros pilares importantes são: o tempo de existência de cada amostra que está sendo comparada e o ponto no tempo em que é feita a comparação, devido às mudanças que ocorrem nas coisas ao longo do tempo. Este fato foi observado pelo filósofo Heráclito de Éfeso, citado por Crátilo, p.402, A (DK 22 A6), que dizia que “todas as coisas se movem e nada permanece imóvel”; e ao comparar os seres com a corrente de um rio, afirmava que “não poderia entrar duas vezes num mesmo rio”. *Panta rhei*, sua "máxima", significa: "tudo flui", "tudo se move", exceto o próprio movimento. (1) E se as coisas estão em constante movimento, também os padrões de que nos servimos para identificar determinada coisa ou estrutura viva ou morta se movimentam e, conseqüentemente, se modificam, com maior ou menor velocidade.

Os conceitos de identidade utilizados na literatura médico legal brasileira, particularmente nas faculdades de medicina e direito, não fazem menção ao tempo. França apresenta o conceito de identidade como sendo o “conjunto de caracteres que individualizam uma pessoa ou uma coisa, fazendo-a distinta das demais, um elenco de atributos que torna alguém ou alguma coisa igual apenas a si próprio.” E depois faz uma citação a Moraes que a coloca como "a qualidade de ser a mesma coisa e não diversa de si mesma". (2) A compreensão desse conceito parece simples ao senso comum, mas para que uma coisa possua essa qualidade (de ser igual a si mesma e distinta das demais), há que se suspender o tempo, pressupondo-o como uma variável estática. O argumento que fundamenta essa necessidade é que nada pode ser igual a si mesmo se considerarmos os efeitos físicos e biológicos que modificam constantemente as pessoas e as coisas ao longo do tempo. Os vírus, por exemplo, se modificam muito rapidamente, sofrendo mutações em algumas áreas de seu genoma. Por outro lado,

conservam partes que não se alteram ao longo do tempo e são essas áreas que possibilitam aos biólogos sua detecção e identificação. São as chamadas regiões conservadas. No caso dos Papilomavírus Humanos, por exemplo, utiliza-se a região L1, que é conservada, para essa finalidade. Se, ao testarmos a presença de L1 em uma amostra, o teste for positivo, significa que estamos diante de uma amostra que possui o vírus, independente das outras regiões que podem sofrer mutação. Os seres humanos possuímos alguns elementos que se conservam ao longo do tempo como as impressões digitais e os “short tandem repeat” (STRs), regiões do DNA que mostram repetições em suas sequências, usadas como marcadores.

Do ponto de vista da identidade subjetiva, o próprio pensamento pode ser considerado uma região conservada. Destaco fragmento do capítulo 4 do Discurso do Método de Descartes:

“E, enfim, considerando que quaisquer pensamentos que nos ocorrem quando estamos acordados nos podem também ocorrer enquanto dormimos, sem que exista nenhum, nesse caso, que seja correto, decidi fazer de conta que todas as coisas que até então haviam entrado no meu espírito não eram mais corretas do que as ilusões de meus sonhos. Porém, logo em seguida, percebi que, ao mesmo tempo que eu queria pensar que tudo era falso, fazia-se necessário que eu, que pensava, fosse alguma coisa. E, ao notar que esta verdade: eu penso, logo existo, era tão sólida e tão correta que as mais extravagantes suposições dos céticos não seriam capazes de lhe causar abalo, julguei que podia considerá-la, sem escrúpulo algum, o primeiro princípio da filosofia que eu procurava.” (3) Descartes estabeleceu a dúvida como instrumento metodológico, a dúvida hiperbólica, a dúvida levada às últimas consequências e descobriu que a única certeza absoluta era essa: penso, logo existo, ou seja, enquanto penso, existo. O pensamento é o único atributo que certamente conservo desde que passei a existir como ser e continua me tornando um ser existente em um determinado tempo. É a “região conservada” que faz com que eu tenha consciência de minha identidade subjetiva.

Afrânio Peixoto definiu identidade como “conjunto de sinais ou propriedades que caracterizam um indivíduo entre todos, ou entre muitos, e o revelam em determinadas circunstâncias, e estes sinais são específicos e individuais, originários ou adquiridos. (4) Quando trabalhou com essa definição, o que estava implícito era que essas propriedades estavam limitadas a pontos específicos no tempo. Sinais específicos e individuais significam que, por meio deles, poderíamos delimitar um indivíduo dentro de um grupo ou conjunto de vários indivíduos. Os sinais originários acompanhariam o indivíduo desde sua origem, portanto há que se ter um ponto no tempo quando nasce esse indivíduo, um sinal que não se modifique ao longo do tempo; já os adquiridos seriam produtos de modificações ao longo do tempo, como as cicatrizes.

À comparação entre características de dois conjuntos independentes, visando estabelecer se pertencem ao mesmo indivíduo, chamamos de processo de identificação médico legal. É um processo empírico que depende da experiência, portanto deve ser conceituado à luz dos efeitos da experiência, diferentemente da matemática. Nesta, quando dois objetos são comparados, poderão ser considerados idênticos se encontrarmos características, funções ou formas que sejam comuns a ambos, independentemente do tempo. No quesito forma: um triângulo isóscele pode ser considerado idêntico a outro triângulo isósceles, quando possuírem, ambos, lados iguais em comprimento, e ângulos iguais. No quesito função: 2 é idêntico a $1+1$ porque, se substituo qualquer uma dessas expressões em uma sentença matemática, ela não se altera, ou seja, o resultado será o mesmo.

Destaco fragmento extraído do livro “Ensaio sobre o entendimento humano, de David Hume, seção IV, dúvidas céticas sobre as operações do entendimento, primeira parte, pg. 77” (5): *"Todos os objetos da razão ou da investigação humanas podem dividir-se naturalmente em dois gêneros, a saber: relações de ideias e de fatos. Ao primeiro pertencem as ciências da geometria, da álgebra e da aritmética e, numa palavra, toda afirmação que é intuitivamente ou demonstrativamente certa. Que o quadrado da hipotenusa é igual à soma do quadrado dos dois lados, é uma proposição que exprime uma relação entre estas figuras. Que três vezes cinco é igual à metade de trinta exprime uma relação entre estes números. As proposições deste gênero podem descobrir-se pela simples operação do pensamento e não dependem de algo existente em alguma parte do universo. Embora nunca tenha havido na natureza um círculo ou um triângulo, as verdades demonstradas por Euclides conservarão para sempre sua certeza e evidência."*

Em Medicina Legal, quando comparamos as características de dois objetos, não sabemos, a priori, quando elas se originaram, podendo ter ocorrido em tempos diferentes. Poderá, portanto, o objeto mais moderno, ser derivado do mais antigo e ter sofrido ações químico-físico-biológicas ao longo do período que os separa. Dessa forma, ainda que não sejam idênticos, o primeiro é derivado do segundo. Uma pessoa que está em fase de crescimento, tem suas dimensões modificadas pelo tempo e nem por isso deixa de ser a mesma pessoa porque mantém parte de sua estrutura conservada e esse é o nosso ponto fundamental. O conhecimento que possuímos dos objetos dos sentidos, entre eles, dos indivíduos à nossa volta, são empíricos e se modificam, mas há uma estrutura conservada que garante sua identidade. O que nos dá a certeza de que nossa mãe é a mesma mãe de ontem? Sabemos que a água matará a minha sede hoje e o que nos dá essa certeza? Hume investigou essa questão e concluiu que é a força do hábito. Em outro fragmento (pg.78) ele diz: *“Mesmo supondo que as faculdades racionais de*

Adão fossem inteiramente perfeitas desde o primeiro momento, ele não poderia ter inferido da fluidez e da transparência da água, que ela o afogaria, ou da luz e do calor do fogo, que este o consumiria. Nenhum objeto jamais revela, pelas qualidades que aparecem aos sentidos, tanto as causas que o produziram como os efeitos que surgirão dele; nem pode nossa razão, sem o auxílio da experiência, jamais tirar uma inferência acerca da existência real de um fato. A proposição que estabelece que as causas e os efeitos não são descobertos pela razão, mas pela experiência, será prontamente admitida em relação àqueles objetos de que nos recordamos e que certa vez nos foram completamente desconhecidos, porquanto devemos ter consciência de nossa absoluta incapacidade de predizer o que surgiria deles. Apresentai dois pedaços de mármore polidos a um homem sem nenhum conhecimento de filosofia natural; ele jamais descobrirá que eles se aderirão de tal maneira que se requer grande força para separá-los em linha reta, embora ofereçam menor resistência à pressão lateral.” ... Na pg. 33: “Suponde de novo que o mesmo homem tenha adquirido mais experiência e que tenha vivido o suficiente no mundo para observar que os objetos ou eventos familiares estão constantemente ligados; qual é a consequência desta experiência? Imediatamente infere a existência de um objeto pelo aparecimento do outro. Entretanto, não adquiriu, com toda a sua experiência, nenhuma ideia ou conhecimento do poder oculto, mediante o qual um dos objetos produziu o outro; e não será um processo do raciocínio que o obriga a tirar esta inferência. Mas ele se encontra determinado a tirá-la; e mesmo se ele fosse persuadido de que seu entendimento não participa da operação, continuaria pensando o mesmo, porquanto há um outro princípio que o determina a tirar semelhante conclusão. Este princípio é o costume ou o hábito. Visto que todas as vezes a repetição de um ato ou de uma determinada operação produz uma propensão a renovar o mesmo ato ou a mesma operação, sem ser impelida por nenhum raciocínio ou processo do entendimento, dizemos sempre que esta propensão é o efeito do costume. Utilizando este termo, não supomos ter dado a razão última de tal propensão. Indicamos apenas um princípio da natureza humana, que é universalmente reconhecido e bem conhecido por seus efeitos. Talvez não possamos levar nossas investigações mais longe e nem aspiramos dar a causa desta causa; porém, devemos contentar-nos com que o costume é o último princípio que podemos assinalar em todas as nossas conclusões derivadas da experiência. Já é, contudo, satisfação suficiente poder chegar até aqui sem irritar-nos com nossas estreitas faculdades, estreitas porque não nos levam mais adiante. Certamente, temos aqui ao menos uma proposição bem inteligível, senão uma verdade, quando afirmamos que, depois da conjunção constante de dois objetos, por exemplo, calor e chama, peso e solidez, unicamente o costume nos determina a esperar um devido ao aparecimento do outro. Parece que esta

hipótese é a única que explica a dificuldade que temos de, em mil casos, tirar uma conclusão que não somos capazes de tirar de um só caso, que não discrepa em nenhum aspecto dos outros. A razão não é capaz de semelhante variação. As conclusões tiradas por ela, ao considerar um círculo, são as mesmas que formariam examinando todos os círculos do universo. Mas ninguém, tendo visto somente um corpo se mover depois de ter sido impulsionado por outro, poderia inferir que todos os demais corpos se moveriam depois de receberem impulso igual. Portanto, todas as inferências tiradas da experiência são efeitos do costume e não do raciocínio. O costume é, pois, o grande guia da vida humana. E o único princípio que torna útil nossa experiência e nos faz esperar, no futuro, uma série de eventos semelhantes àqueles que apareceram no passado. Sem a influência do costume, ignoraríamos completamente toda questão de fato que está fora do alcance dos dados imediatos da memória e dos sentidos. Nunca poderíamos saber como ajustar os meios em função dos fins, nem como empregar nossas faculdades naturais para a produção de um efeito. Seria, ao mesmo tempo, o fim de toda ação como também de quase toda especulação... Qual é, portanto, a conclusão de toda a questão? É simples; no entanto, deve-se confessar que ela se acha muito distante das teorias filosóficas correntes. Toda crença, em matéria de fato e de existência real, procede unicamente de um objeto presente à memória ou aos sentidos e de uma conjunção costumeira entre esse e algum outro objeto. Ou, em outras palavras, como o espírito tem encontrado em numerosos casos que dois gêneros quaisquer de objetos — a chama e o calor, a neve e o frio — sempre têm estado em conjunção, se, de novo, a chama ou a neve se apresentassem aos sentidos, o espírito é levado pelo costume a esperar calor ou frio, e a acreditar que esta qualidade existe realmente e que se manifestaria se estivesse mais próxima de nós. Esta crença é o resultado necessário de colocar o espírito em determinadas circunstâncias. E uma operação da alma tão inevitável como quando nos encontramos em determinada situação para sentir a paixão do amor quando recebemos benefícios; ou a de ódio quando nos defrontamos com injustiças. Todas estas operações são uma espécie de instinto natural que nenhum raciocínio ou processo do pensamento e do entendimento é capaz de produzir ou de impedir.”

Em medicina legal, quando comparamos duas amostras a fim de estabelecer se são provenientes do mesmo indivíduo, partimos do pressuposto de que esse indivíduo é idêntico a si mesmo ao longo do tempo. Entretanto, não existem objetos que não se modifiquem ao longo do tempo, pelo menos até o presente momento. O que estamos fazendo, portanto, é comparar objetos que estão em constante movimento mas que apresentam algum grau de similaridade que não é absoluta, pois tudo que existe está sofrendo a ação do tempo. Se dois objetos estão ligados entre si por possuírem características semelhantes, e se um desses objetos derivou

verdadeiramente do outro, mesmo que eu não tenha o conhecimento *a priori* disso, posso inferir, pela força da crença, da mesma crença que me faz acreditar que a água matará minha sede, que eles possuem em sua estrutura, regiões semelhantes que se conservam.

O conceito de identidade deve ser revisto e pensado a partir das regiões conservadas. Deve ser probabilístico. Duas coisas, quando comparadas, jamais serão idênticas e sim, provavelmente idênticas de acordo com um grau estatístico ou probabilístico, quando apresentarem características semelhantes em determinadas regiões, que, provavelmente, se mantiveram conservadas ao longo do tempo. O limite de corte, por nós estabelecido, é um número estatístico. Pode-se aceitar que duas coisas serão idênticas quando possuírem um certo grau de similaridades acima de um ponto estatístico por nós estabelecido. A depender desse limite, nossa certeza variará e podemos, inclusive, duvidar de nossa própria identidade. Quando nos referimos à identidade subjetiva, estamos falando sobre a sensação que cada indivíduo tem de que foi, é, e será ele mesmo, ou seja, a consciência da própria identidade.

Entretanto, um dos papéis da medicina legal é **estabelecer a identidade objetiva** que é a afirmação técnica (e probabilística) de que determinada pessoa, mesmo com as alterações impressas pelo tempo, é uma continuação dela mesma, por meio de regiões específicas que se conservaram ao longo do tempo. O processo técnico de comparação entre estruturas separadas pelo tempo, que possuem, em sua constituição, partes que se conservam e outras que sofrem modificações é chamado de **Identificação**. Como vimos, não se pode utilizar, com segurança, uma parte (marcador) que, habitualmente, sofre grandes modificações.

Finalidades da identificação

Ao nascimento, passamos a integrar um corpo social e, como partes desse corpo, recebemos um nome que vai nos acompanhar existência afora. O primeiro documento é chamado de **Declaração de Nascido Vivo** que não precisa ser preenchida por médico, sendo de obrigação dos estabelecimentos de saúde, conforme Lei 8.069, de 13/07/90 do Estatuto da Criança e do Adolescente, Título II, Cap. I, Art.10: Os hospitais e demais estabelecimentos de atenção à saúde de gestantes, públicos e particulares, são obrigados a: IV – Fornecer declaração de nascimento onde constem necessariamente as intercorrências do parto e do nascimento do neonato. O documento último e póstumo é de responsabilidade do médico, chamado de **Declaração de Óbito**. ([link para o capítulo de Atestado de Óbito](#)). Nele, bem como em outros

documentos, deve constar a impressão dactiloscópica (digital) do indivíduo que é uma ferramenta de identificação judiciária.

Métodos de identificação judiciária

Nasceram da necessidade de facilitar a identificação de pessoas por meio de sinais característicos que, em tese, pudessem se manter conservados. Já se usaram métodos como utilização de ferretes, tatuagens, amputações, assinalamento sucinto (tomada de estatura, raça, peso, feita pelos carcereiros), fotografia simples – sinalética (frente e perfil), retrato falado, sistema dermográfico de Bertham que tinha como princípio tatuar ao nascer, sistema antropométrico de Bertillon e o sistema dactiloscópico de Vucetich (1891).

A antropometria, criada em 1879 por Alphonse Bertillon (1853-1914), fundamentava-se em três princípios: 1) fixidez (conservação) absoluta do esqueleto humano a partir de 20 anos de idade; 2) dimensões exatas do corpo humano, variando de indivíduo para indivíduo; e 3) facilidade de medição com precisão relativa de certas dimensões do esqueleto. Foi usada para cadastramento da população carcerária e posterior identificação em casos de recidiva do crime. Registravam-se as medidas em uma ficha de identificação da pessoa que recebia também um número e fotos. Em 1884, Bertillon identificou 241 criminosos reincidentes e após sua demonstração, a “Bertillonage” foi adotada pelas polícias da Grã-Bretanha, Europa e Américas. (6) Um dos problemas era que a identificação de pessoas abaixo de 20 anos ficava prejudicada, pois as pessoas cresciam e, portanto, suas dimensões (marcadores) não se conservavam.

O sistema dactiloscópico criado por Juan Vucetich em 1892 e demonstrado em 1904 se baseia nos padrões deixados pelos sulcos e cristas papilares que existem na superfície da pele dos dedos desde o 6.º mês de vida intrauterina e que permanecem conservados durante toda a vida do indivíduo e após a morte, sendo eliminados pelo fenômeno putrefativo. Quando se comprime uma superfície plana, as cristas e sulcos imprimem desenhos que podem ser observados por diferentes métodos que incluem revelação por técnicas periciais ou captação por dispositivos eletrônicos. Esses desenhos variam entre os 10 dedos das mãos (sistema decadactilar) e entre pessoas, mesmo entre gêmeos univitelinos. São constituídos por linhas que se encontram e apresentam padrões específicos, formando pequenos ângulos ou triângulos denominados de **deltas**. (Fig. 1).



Figura 1. Impressão digital com delta à esquerda

A partir dos deltas, definem-se os sistemas principais de linhas, basal, marginal e nuclear e classificam-se os padrões. (Fig. 2) São 4 padrões encontrados na natureza e cada pessoa, constitucionalmente, possui, em cada dedo, um dos quatro, representados por letras quando se trata do polegar ou números para os demais dedos assim denominados: nenhum delta: **arco** (**A** para polegar ou **1** para os demais dedos), somente um delta à direita (**presilha interna, 2 ou I**), somente um delta à esquerda (**presilha externa, E ou 3**), dois deltas (**verticilo, 4 ou V**) (Tabela 1).

<u>TIPOS FUNDAMENTAIS DE VUCETICH</u>	<u>SÍMBOLOS</u>
•VERTICILO = 2 DELTAS	• V e 4
•PRESILHA EXTERNA = DELTA À ESQUERDA	• E e 3
•PRESILHA INTERNA = DELTA À DIREITA	• I e 2
•ARCO = DELTA AUSENTE	• A e 1

Tabela 1. Representação das formações lineares

Considerando-se as possíveis combinações entre esses padrões, cada dedo é um evento independente, portanto há 1.048.576 formas diferentes. Esse é um parâmetro ou índice polimórfico que nos dá o grau de variabilidade desse sistema e ainda nos permite comparar com outros métodos de identificação. Para o registro, utiliza-se o que se chama de fórmula dactiloscópica que é a representação numérica dos desenhos, observadas tais formações lineares, anotando-se uma sequência específica sob a forma de uma razão onde o numerador representa os padrões dos dedos da mão direita e o denominador da esquerda. (Tabelas 2 e 3).

<p><u>Numerador (série):</u> dedos da mão direita polegar: representado por uma letra demais dedos : por números</p> <p><u>Denominador (secção):</u> dedos da mão esquerda mesma seqüência da mão direita</p> <p>Série Fundamental - Divisão</p> <p>FD = ----- Secção Sub-classificação- Subdivisão</p>
--

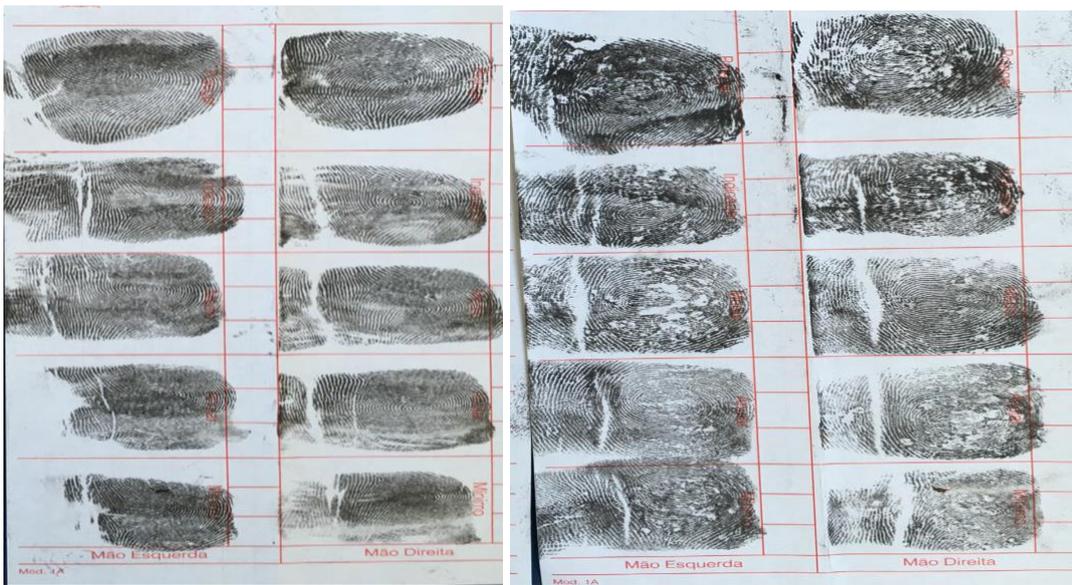
Tabela 2. Fórmula dactiloscópica

FD = A 2341 V 1334
Mão direita (série): polegar = arco indicador = presilha interna médio = presilha externa, anular = verticilo mínimo = presilha interna
Mão esquerda (secção): polegar = verticilo indicador = arco médio = presilha externa, anular = presilha externa mínimo = verticilo

Tabela 3. Exemplo de Fórmula Dactiloscópica de um indivíduo

Além dos padrões fundamentais, observam-se pontos característicos específicos de cada pessoa que são formações individuais (ilhotas, cortadas, bifurcações, forquilhas, encerros), além de cicatrizes, permitindo aumentar o **polimorfismo** desse sistema.

A identificação é realizada por peritos dactiloscopistas observando-se as fichas dactiloscópicas. (Fig. 4 e 5). Uma das aplicações corresponde à identificação do cadáver putrefeito por meio das luvas cadavéricas. (Fig. 4 e 5).



Figuras 2 e 3. Fichas dactiloscópicas. À direita há irregularidades correspondentes a cicatrizes causadas por queimaduras (usuário de crack).



Figuras 4 e 5. Luvas cadavéricas.

Identificação Médico Legal

A identidade é estabelecida por médico legista, que se utiliza de técnicas que julgar seguras e precisas. Já foram utilizadas interposição de imagens, análise de pavilhão auricular, radiografias, superposição crânio–facial por vídeo, registro de voz, palatoscopia, queilosscopia, morfologia do esqueleto, estudo da arcada dentária, estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA).

Aplicam-se à identificação de pessoas vivas ou mortas, restos de pessoas como ossadas, cabelos, amostras biológicas deixadas na cena do crime ou vestígios.

Estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA é uma molécula presente na maior parte dos seres vivos, entre eles, humanos e vírus. Um exemplo de DNA viral é o Papilomavírus Humano, responsável pelo início da cadeia de eventos que origina o câncer do colo uterino nas mulheres, quando parte de seu DNA se incorpora ao DNA do núcleo da célula humana. A célula epitelial pode se transformar e adquirir forma e comportamento atípicos; evoluindo, em alguns casos, para câncer cervical. (Fig. 4)

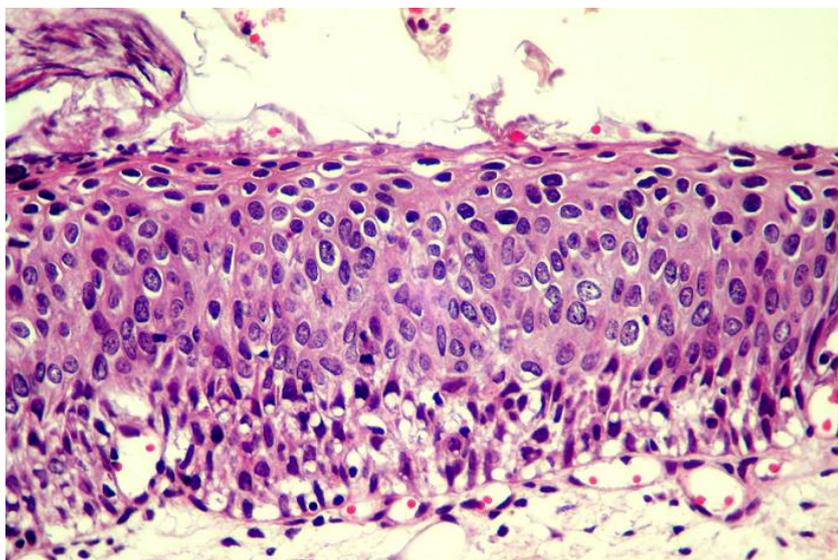


Figura 4. Epitélio cervical atípico, consequência do efeito da infecção pelo DNA viral do HPV no DNA do núcleo celular.

Em seres humanos, o DNA participa da constituição dos cromossomos das células nucleadas. Possui regiões DNA (cerca de 10%) responsáveis pela codificação das proteínas, entretanto a maior parte (90%) parece não exercer função conhecida. É formado por unidades chamadas **nucleotídeos**, constituídos por uma base nitrogenada, um fosfato e um açúcar.

(Fig. 5)

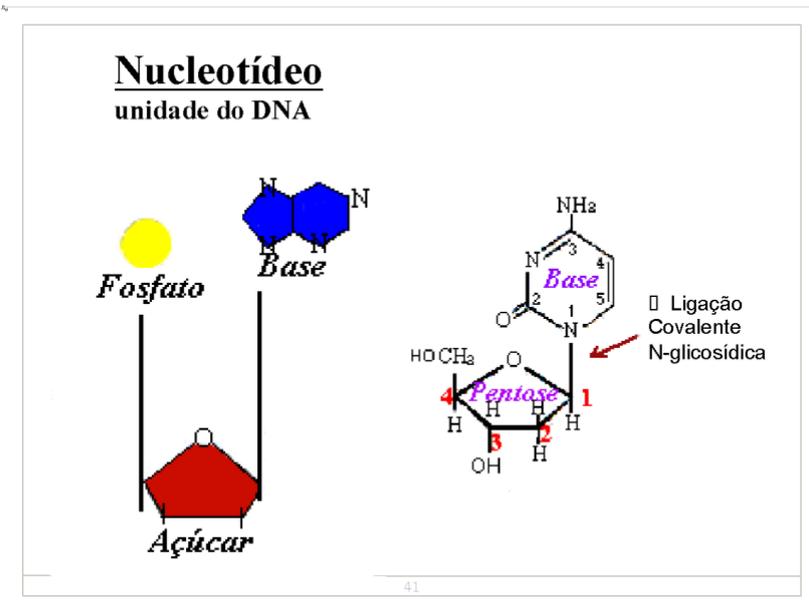


Figura 5. Nucleotídeo

São 4 nucleotídeos observados no DNA: Adenina, Guanina, Citosina e Timina. Os nucleotídeos se unem uns aos outros em sequência, formando uma estrutura linear e helicoidal, tridimensional, em cadeia. (Fig 6, 7 e 8). (Watson e Crick)

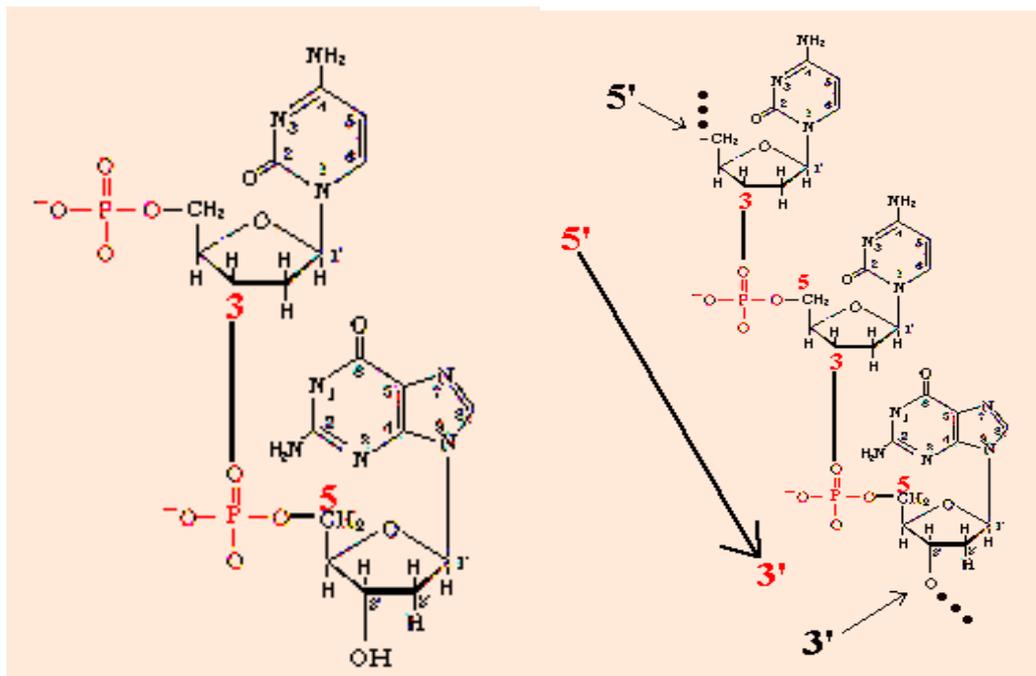
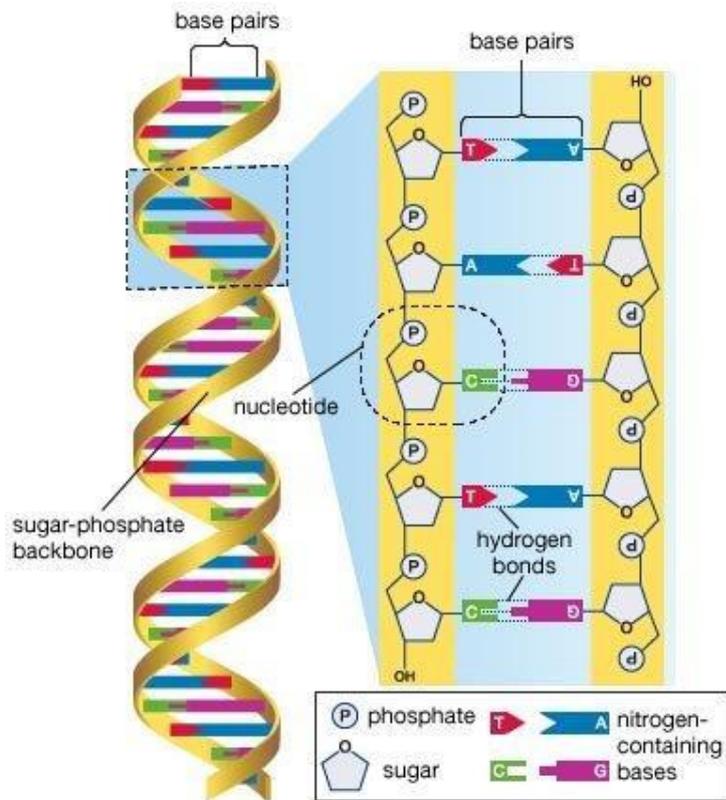


Figura 6. Cadeia de nucleotídeos



Figura 7. Estrutura tridimensional do DNA (<https://publicdomainpictures.net>)



© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figura 8. Encadeamento dos nucleotídeos

As seqüências são simples em 75% do DNA e em 25% dos *loci*, se organizam em repetições que podem ser curtas ou longas, dependendo do número de nucleotídeos que se

repetem. As curtas são chamadas de Short Tandem Repeats (STR). Elas se concentram em regiões do DNA chamadas microssatélites, não codificam para proteínas e apresentam variação entre as pessoas tanto no número de nucleotídeos que se repetem como de repetições dos blocos. Há diferenças no mesmo *locus* (entre os cromossomas homólogos), entre os diferentes *loci* no mesmo indivíduo e de um indivíduo a outro. Quando se observa a mesma quantidade de blocos no mesmo *locus* de cromossomos homólogos, dizemos que os alelos possuem o mesmo tamanho e chamamos essa pessoa de homozigota. Se forem diferentes, heterozigota. (Fig. 9 e 10).

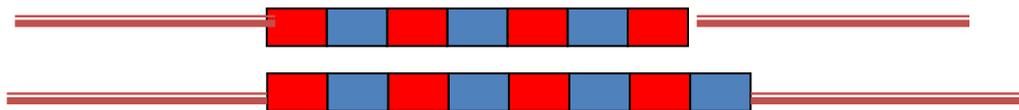


Figura 9. Número de repetições dos blocos de STRs em cromossomos homólogos de uma pessoa heterozigota.

No exemplo da figura 10, extraído do banco de genes, temos 4 nucleotídeos que se repetem e um total de 10 blocos. (Fig. 10).

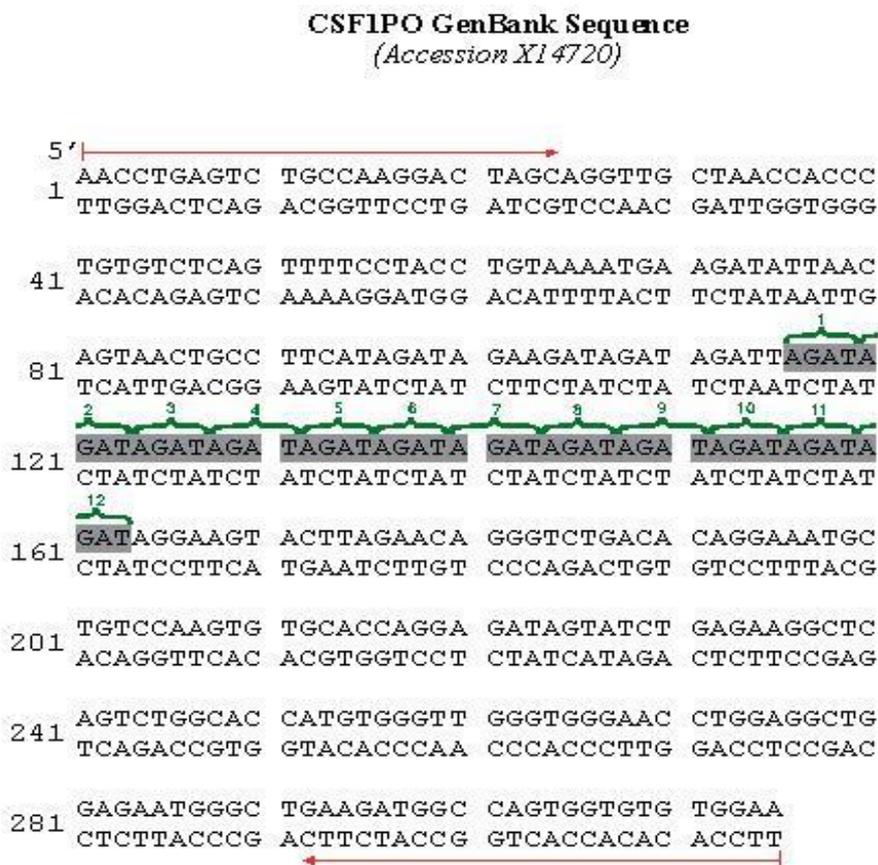


Figura 10. Short Tandem Repeat (STR) (7)

Há uma grande variação na quantidade de blocos ou também denominados **alelos** de um indivíduo a outro na população (Fig. 11). Dizemos que há um grande **polimorfismo**. Essa é a principal característica que permite ao DNA superar todos os outros métodos, trazendo uma grande fonte de informações, permitindo, com elevada segurança, individualizar (identificar) pessoas.

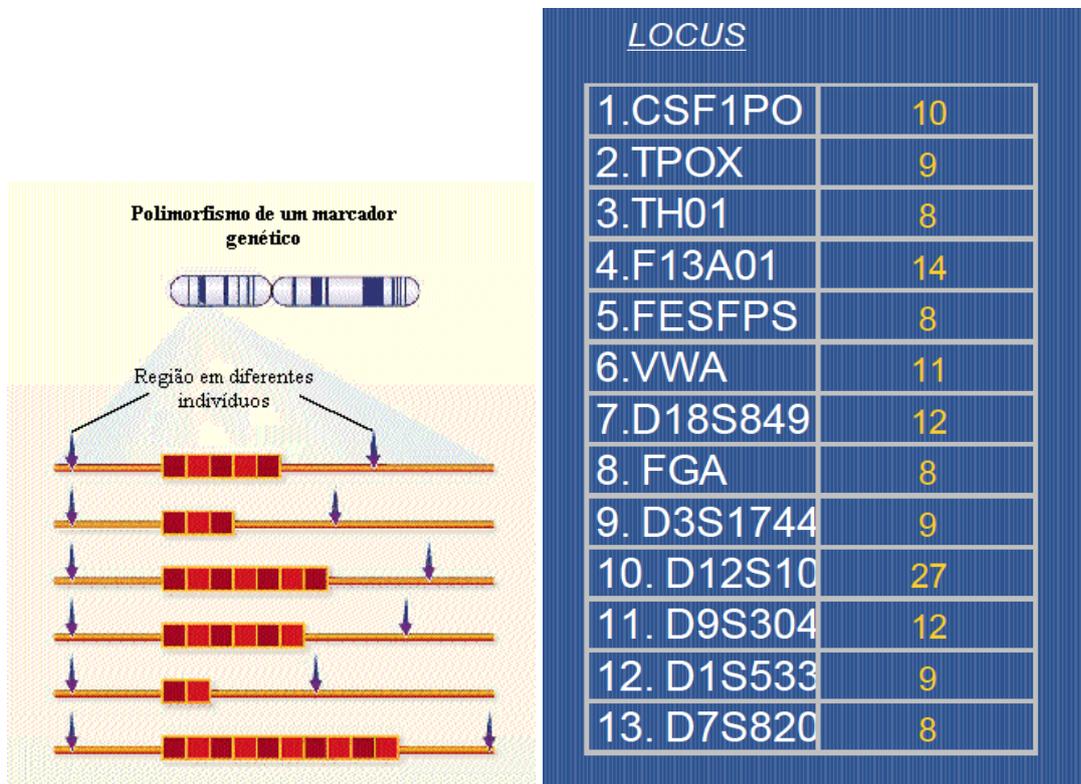


Figura 11. Variações dos alelos na população em cada locus, permitindo poder de discriminação de **1 em 10.000.000.000** de indivíduos.

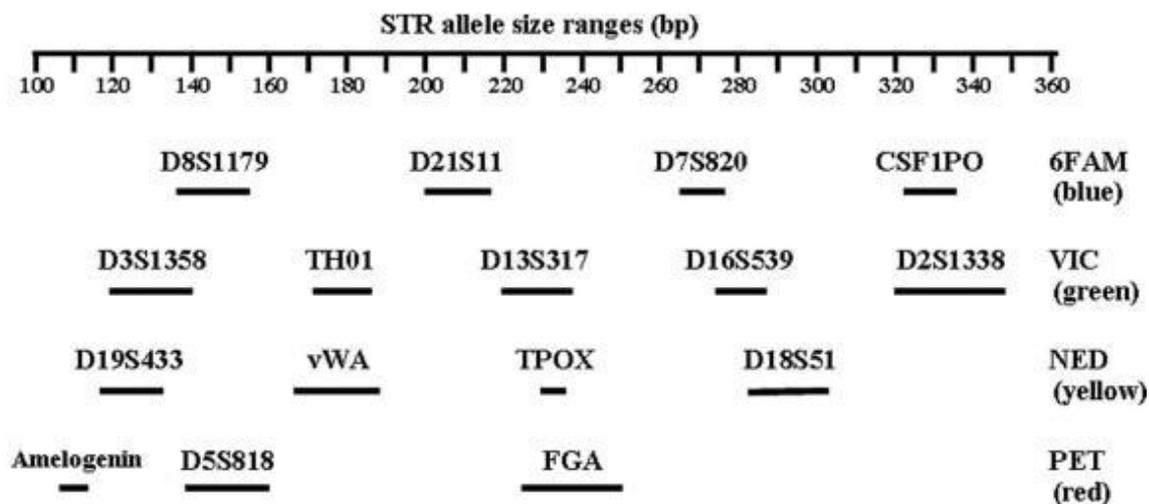
Em resumo, sabemos que:

- ⇒ cada pessoa tem um número diploide de cromossomos;
- ⇒ cada cromossomo possui um local ou *locus* que tem uma sequência polimórfica de nucleotídeos;
- ⇒ essa sequência tem uma distribuição aleatória e não depende do padrão de distribuição das sequências encontradas nos outros *locus*, portanto traz uma informação que não tem relação com a de outros *locus*, podendo ser considerada como um dado estatístico independente ou “eventos independentes”, ou seja, o resultado de uma não interfere no da outra; salvo se esses *locus* estivessem próximos.

No laboratório:

- ⇒ são escolhidos *loci* distantes a fim de evitar interferências;

- ⇒ o número de repetições dos blocos nas sequências de nucleotídeos é específico para cada pessoa e está associado ao tamanho da sequência no DNA;
- ⇒ o tamanho de uma sequência pode ser determinado por meio de técnicas de hibridização ou de amplificação, esta chamada de Polymerase Chain Reaction (PCR) seguida de análise em processadores automáticos ou géis; (8) Essa técnica permite o estudo de sequências pequenas, útil quando se pretende estudar DNAs degenerados, onde as sequências não estão íntegras, apresentando quebras que prejudicam a análise por meio da técnica de hibridização;
- ⇒ amplificam-se fitas de uma região do DNA ou *locus*, verificam-se os tamanhos dos alelos que aparecem nesse *locus* e que representam a quantidade de STRs (blocos que se repetem) e registra-se o resultado;
- ⇒ vários *loci* são estudados ao mesmo tempo por meio de técnicas de multiplex (9) e o que se pretende é descobrir quantos blocos se repetem em cada *locus*. Convencionou-se chamar essa quantidade de blocos de número do alelo no *locus*. Cada *locus* tem um nome e cada pessoa possui, nesse *locus*, um número específico de repetições ou alelo (tabelas 4 e 5);
- ⇒ existe uma correlação entre o número de blocos e o tamanho da sequência: quanto mais blocos, maior o tamanho da sequência;
- ⇒ estudos epidemiológicos da distribuição dos alelos em amostras de determinadas populações mostraram que há um número limitado de variações. Quanto maior o número de variações, mais informativo é o *locus*, dizemos mais **polimórfico**. Essas informações podem ser encontradas em repositórios de dados em tabelas de domínio público, onde estão registrados os perfis de amostras populacionais; (tabela 6). (5);
- ⇒ quando calculados, em conjunto, cerca de 13 *loci* utilizados no banco de dados com registros da população carcerária dos Estados Unidos, chamado Combined DNA Index System (CODIS), permitem um **poder de discriminação** de 1 em 10 bilhões de indivíduos. (Fig. 11). (Compare com o número de possíveis Fórmulas Dactiloscópicas). (6)



<i>Locus</i>	Varição dos tamanhos dos alelos	Alelos
CSF1PO	99-323	8,9,10,11,12,13,14
TH01	179-203	5,6,7,8,9,10,11
TPOX	224-252	6,7,8,9,10,11,12,13
F13A01	283-331	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16

Tabela 4. Acima, variação do tamanho dos alelos de acordo com o *locus*. (9) Abaixo, correspondência entre o tamanho dos alelos encontrados em cada *locus* (nome do locus à esquerda) e o número de repetições de nucleotídeos nos STRs.

<i>Locus</i>	Localização no cromossomo	Sequência que se repete sentido 5'-3'
CSF1PO	5q33.3-34	AGAT
TH01	11p15.1	AATG
TPOX	2p23-2pter	AATG
F13A01	6p24-25	AAAG

Tabela 5. Nome de cada *locus* à esquerda, localização no cromossomo, registro da sequência e número de repetições de nucleotídeos nos STRs.

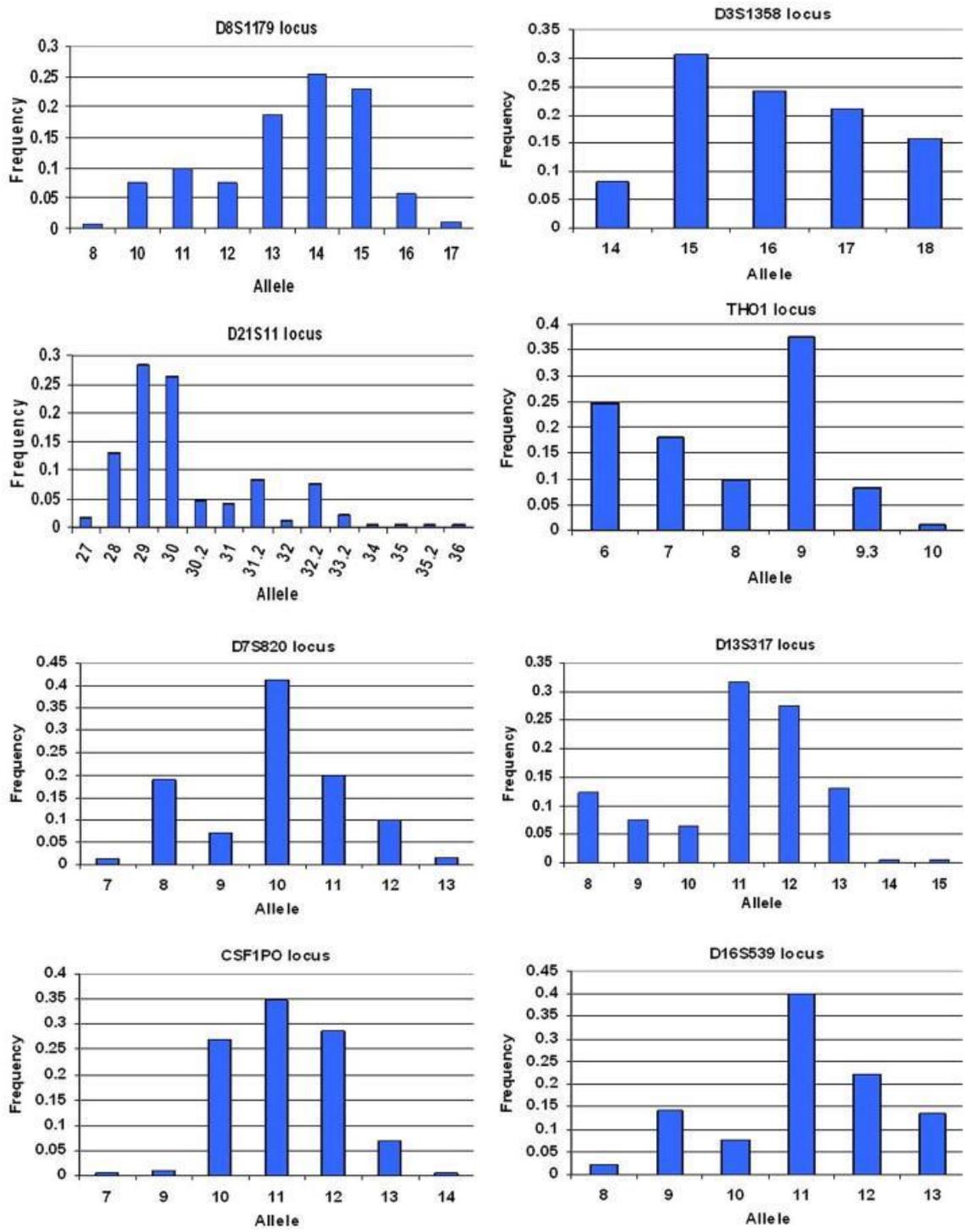


Tabela 6. Frequência de cada alelo em uma amostra de 170 indivíduos da população egípcia nos loci: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317 e D16S539. (5)

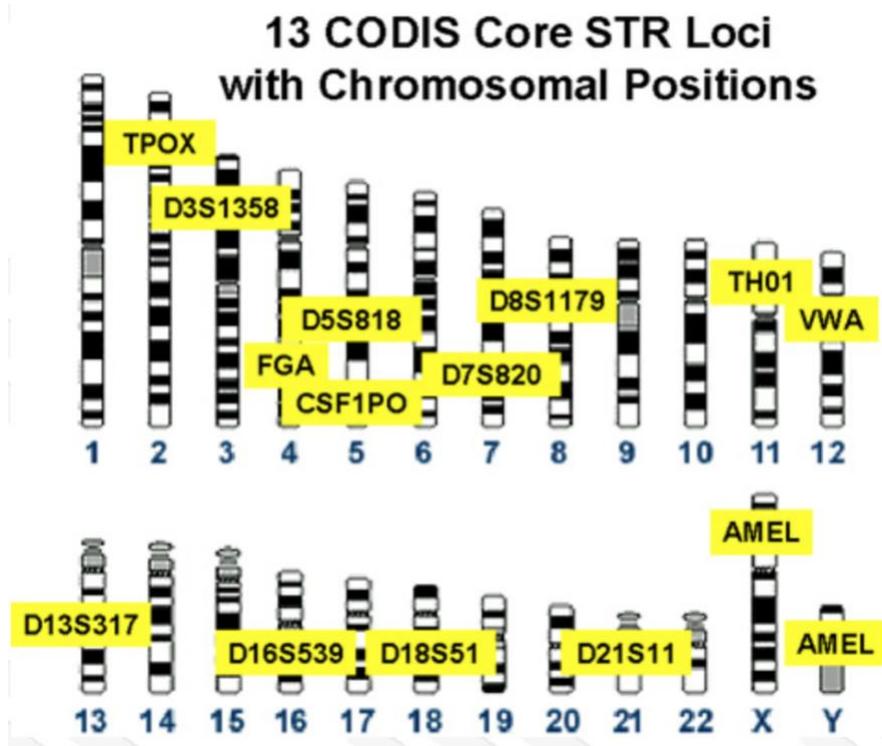


Figura 12. 13 loci utilizados no CODIS, localizados em diferentes cromossomos.

Técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR)

Eleita pela revista Science como o "maior desenvolvimento científico e a taq polimerase, a molécula do ano em 1989", é a técnica consolidada para o estudo dos marcadores. Kary Mullis, o criador desse método recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. Com ela, é possível realizar a síntese de ácidos nucleicos e replicar (ou amplificar) sequências pequenas e específicas do DNA. Por esse motivo, pode ser aplicada amplamente nas ciências forenses com a finalidade de identificar vestígios deixados na cena do crime, constituídos por amostras degeneradas, como manchas de sangue ou de sêmen. Amostras degeneradas significam, na prática, que possuem sequências de DNA fragmentadas, portanto podendo ocorrer resultado falso negativo se forem utilizadas técnicas que dependam da integridade de longas sequências de DNA. Este é o caso da técnica chamada "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) que estuda os "Variable Number of Tandem Repeats" (VNTR) através da hibridização de sondas multilocais ou unilocais. (11) A técnica de PCR resolveu essa dificuldade por permitir que se amplifiquem sequências curtas, os STRs, amplamente utilizados na rotina laboratorial.

Amostras

São de diversas naturezas como secreções (cérvico-vaginal, oral, etc), líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical (para investigação de paternidade), sangue (manchas na cena do crime), tecido fresco, material formolizado, material parafinado, bulbo capilar, ossadas antigas, etc. Podem ser coletadas em locais externos ao laboratório e na cena do crime em casos que envolvem investigação forense. Amostras coletadas de pessoa vivas para finalidade pericial devem ser acompanhadas de termo de autorização de coleta. No Brasil, é constitucional coletar e processar amostras sem que a pessoa autorize. Todo cidadão brasileiro tem o direito de “não produzir provas contra si”. Como disposto na Convenção de Direitos Humanos de 1969, conhecida como Pacto de San José da Costa Rica, da qual somos signatários, em seu artigo 8º, das Garantias Judiciais, “toda pessoa tem “direito de não ser obrigada a depor contra si mesma, nem a confessar-se culpada”. (12)

As amostras devem ser lacradas e numeradas, acondicionadas adequadamente e transportadas ao laboratório por pessoas credenciadas, a fim de se garantir a **cadeia de custódia**. Acompanha a amostra, **requisição** preenchida com os dados referentes ao caso: hora da coleta, local, número do Inquérito Policial, natureza da amostra e outras observações e **autorização de coleta** se for o caso. No laboratório, é entregue protocolada, com registro de data e hora e identificação do estafeta. Concluída essa etapa, internamente é feita a desmontagem do frasco ou suporte, retirada a amostra e conferida a identificação do lacre com a que consta da requisição. Começa, a partir daí, a análise laboratorial.

Processamento - Reação de PCR

As etapas da reação podem ser resumidas em: extração do DNA da amostra, montagem, amplificação e leitura de resultados. Há vários protocolos de extração, dependendo da amostra a ser analisada, que resultam em quantidades diferentes de DNA.

Na montagem, os reagentes necessários são: fita molde de DNA (extraído da amostra), oligonucleotídeos (unidades do DNA), pelo menos um par de primers (pequena seqüência de DNA que inicia a reação) e a Taq DNA polimerase (enzima que liga os nucleotídeos à fita molde).

A amplificação é realizada dentro de um aparelho chamado termociclador que produz ciclos de aumento e diminuição de temperatura, o que produz no interior do frasco as seguintes reações:

⇒ desnaturação do DNA (habitualmente entre 94 e 96 °C);

- ⇒ “annealing” dos primers com as seqüências complementares do DNA molde (habitualmente entre 50 e 65 °C);
- ⇒ extensão realizada pela Taq DNA polimerase a 72 °C, quando os nucleotídeos serão encaixados na fita que está sendo construída.
- ⇒ Essas temperaturas também podem variar de acordo com o protocolo utilizado. A leitura dos resultados pode ser feita por meio da revelação em géis ou de dispositivos que possuem capilares para a leitura de oligonucleotídeos previamente marcados. (Fig. 13) O que procuramos é tamanho das seqüências amplificadas. De acordo com esse tamanho, teremos, por correspondência, o número de repetições de STRs naquele determinado *locus*, portanto, o número do alelo procurado.

Investigação de vínculos biológicos genéticos

Teste da paternidade

Sabemos que os alelos são transmitidos por herança Mendeliana. Nesses casos, deve-se extrair e amplificar DNA das pessoas envolvidas e comparar os perfis. Quando 3 pessoas estão sendo testadas e o objetivo é testar uma delas, habitualmente o homem como suposto pai biológico, considerando-se a mãe como mãe biológica. Verifica-se se o alelo do filho é coincidente com o da mãe em um primeiro momento. Havendo coincidência, compara-se o segundo alelo do filho com o do suposto pai. Esse alelo deve ser proveniente do pai biológico, sendo por isso chamado de **alelo paterno obrigatório**. Se houver coincidência, não se pode excluir esse homem como pai para aquele determinado *locus* que está sendo analisado. (Fig. 13).

Testam-se vários *loci* e, não havendo exclusão, calcula-se o **índice de paternidade combinado** que é a razão entre a chance do homem testado ser o pai biológico sobre a chance de não ser. Resulta do produto dos índices de cada *locus*. Um índice de paternidade de 100 significa:

- 1- o homem acusado tem 100 vezes mais chance de ser o pai biológico da criança em questão do que qualquer outro homem; ou
- 2- os alelos observados na mãe, na criança e no homem acusado são 100 vezes mais frequentes em trios verdadeiros do que em falsos trios; ou
- 3- esse trio formado por essa mulher, criança e homem tem 100 vezes mais chance de ser o trio verdadeiro do qualquer outro trio retirado da população. Em seguida, calcula-se a **probabilidade de paternidade**.

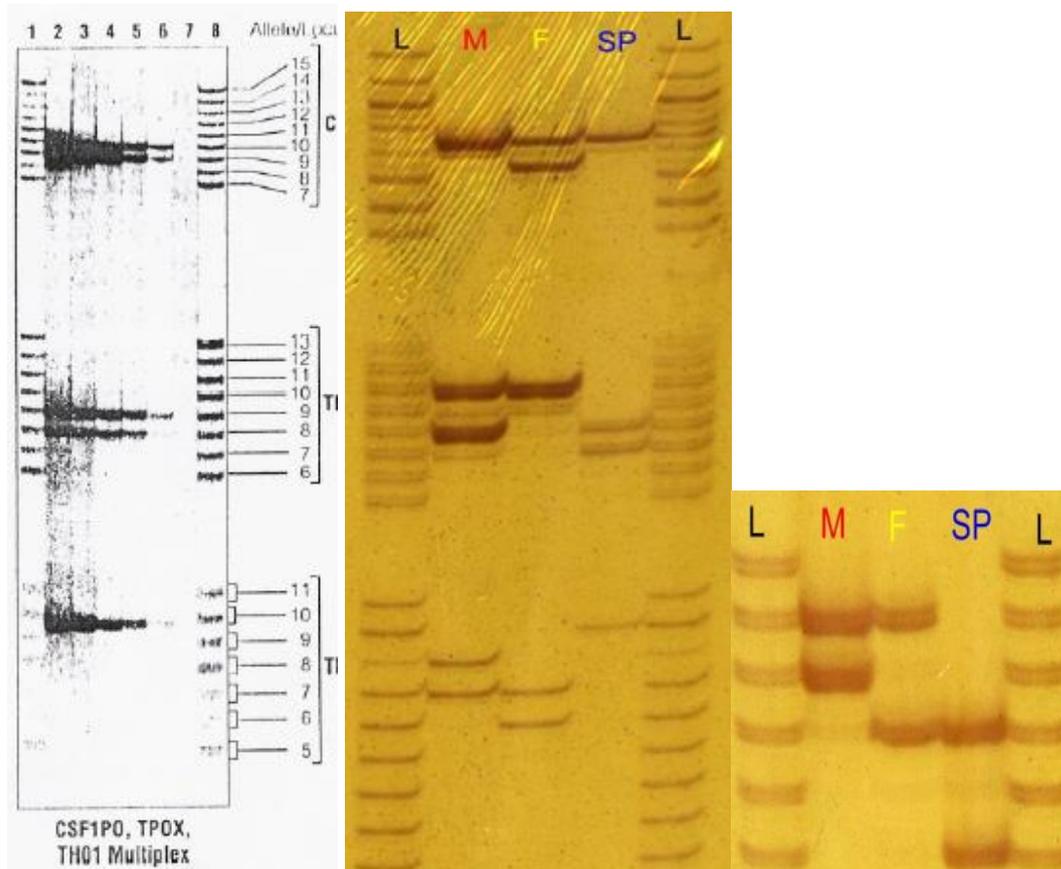


Figura 13. Géis de poliacrilamida utilizados, no passado, para revelação do tamanho da sequência de DNA amplificada na amostra. Na coluna “L” (do inglês ladder), correm-se os padrões previamente conhecidos, que indicam os tamanhos das amostras. O sistema multiplex permite estudar vários *loci* ao mesmo tempo. No gel central há 3 *loci* que excluem o homem testado como pai biológico. No *locus* do gel da direita de outro caso, não se pode excluir pois o alelo paterno obrigatório é coincidente com o do pai.

Laudo

Relatam-se todos os passos, desde a coleta da amostra até a liberação do resultado, incluindo-se os reagentes utilizados, a fim de se preservar a cadeia de custódia e oferecer todas as informações técnicas necessárias. Deve conter informações que possibilitem identificar os profissionais que realizaram a coleta, transporte e entrega da amostra (que deverá estar lacrada), fase pré-analítica e analítica intra-laboratorial e análise dos resultados. Deve conter a natureza e o objetivo do exame.

Exemplo de um laudo, contestação e fundamentos do parecerista. Observe como a defesa tenta tornar o laudo imprestável.

NÚCLEO DE BIOLOGIA E BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE DNA

NATUREZA DO EXAME:

Constatação da presença de sêmen para confronto entre amostras oriundas de caso de **ESTUPRO**, objetivando pesquisa de ocorrência de vínculo genético através da análise de DNA.

OBJETIVO DO EXAME:

O objetivo inicial da perícia é o de constatar a presença de sêmen nas peças recebidas e verificar a possibilidade deste sêmen conter espermatozoides em número suficiente que permita, na sequência da análise, pesquisa comparativa de DNA com material sanguíneo colhido do suspeito.

INFORMAÇÕES PRELIMINARES

A identificação de sêmen segue uma sequência analítica. Preliminarmente, são realizados testes presuntivos. Estes testes detectam substâncias que não são necessariamente únicas para sêmen, mas são, contudo, características deste fluido corporal. As substâncias que podem ser detectadas no sêmen, através de diferentes testes são: espermina, colina e fosfatase ácida, sendo desta última analisado seu caráter qualitativo.

Uma vez detectada uma destas substâncias presentes no material que se está analisando, parte-se, então, para os testes confirmatórios. Basicamente, na atualidade, existem três tipos de testes confirmatórios para a presença de sêmen: os indicativos da presença de espermatozoide, os indicativos para presença de um componente do plasma seminal denominado P30 e os testes quantitativos da fosfatase ácida.

Após a realização de teste confirmatório para sêmen e se o resultado for positivo, faz-se ainda uma avaliação do material para averiguação da possibilidade de ser empregado ou não em exames de DNA, uma vez que a exiguidade de material é fator limitante, ainda que a metodologia empregada seja de grande sensibilidade.

Cada indivíduo possui características genéticas comuns que o incluem como membro da espécie humana, além das individuais exclusivas que diferenciam uma pessoa da outra. A este fenômeno, da-se o nome de “polimorfismo genético”. Os exames de vínculo genético são baseados na análise das características genéticas são baseadas na análise das características genéticas que são próprias e exclusivas de cada indivíduo. Essa análise pode ser realizada pelo estudo de marcadores genéticos utilizando sistemas de amplificação de DNA que revelam com grande precisão as características genéticas, tornando possível avaliar o vínculo genético entre

diferentes vestígios. Isto significa que podemos determinar a existência ou não de verossimilhança entre uma amostra biológica questionada e uma outra referencial analisando regiões específicas do DNA ou Locus genéticos onde ocorrem polimorfismos.

Material recebido e analisado

Data do Recebimento

- a) 01 (um) swab vaginal coletado da vítima
- b) 02 (duas) amostras de sangue de _____, coletadas sob Termo s/número
- c) 02 (duas) amostras de sangue de _____, coletadas sob Termo s/número
- d) 01 (uma) lâmina contendo secreção vaginal de _____ objeto de exame do laudo número _____ do

Métodos

Parte do material contido no swab vaginal (item 3.1.1^a) foi submetida aos seguintes testes:

- a) Presuntivo para sêmen: ensaio qualitativo de fosfatase ácida em fluido seminal, conforme metodologia utilizada no Laboratório de Ciência Forense da Polícia Metropolitana de Londres.
- b) Confirmatório para sêmen: identificação de sêmen pela observação de espermatozoides, pelo emprego de duas diferentes técnicas (Corin-Stockies e Christmans Tree).

Extração de DNA

Os materiais hemáticos da vítima e do suspeito (itens 3.1.1.b e 3.1.1.e) foram submetidos a métodos de extração para retirada de alíquotas de DNA genômico, tendo sido empregada extração salina pelo iodeto de sódio (LOPARLEV et al 1993). O material descrito no item **3.1.1.a** (swab vaginal) sofreu procedimento de extração orgânica diferencial de DNA para esperma, segundo os procedimentos próprios utilizados pelo FBI (*Federal Bureau of Investigation*) norte americano, originais e modificados, ou seja, respectivamente com utilização de etanol (100% e 70%) para precipitação de DNA e através do uso da resina magnética DNA IQTM System (Promega Corporation – Cat, # DC6700 Lot # 139371 – Exp. Date Jun 04), de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante. O material descrito no item 3.1.1.d (lâmina contendo secreção vaginal) não foi utilizado para análises, visto que se apresentava corado e isolado por lamínula, fatos que dificultam demasiadamente a extração de DNA.

Qualificação de DNA

As amostras de DNA total foram quantitativas em gel de agarose 0,7% e coradas com brometo de etídio.

Amplificação das Regiões Polimórficas do DNA (loci)

Após diluição apropriada, quando necessária, as amostras extraídas, contendo DNA, foram submetidas ao processo de amplificação pelo método da PCR, com emprego dos **SISTEMAS MULTIPLEX (fluorescência): - PowerPlex 1.1 System: CSF1PO, TPOX, TH01, vWA, D16S539, D7S820, D13S317 e D5S818** (Promega Corporation – Cut 3 DC6090, Lot 3 131384 – Exp. Date Jan 05) e **AMELOGENINA**, para determinação do sexo (Promega Corporation – Cat # DC5170, Lot # 144226).

Para tal propósito, foi utilizado o termociclador PT-100, fabricado por M.J Research, programado de forma específica, segundo protocolos recomendados pela Promega Corporation.

Caracterização dos alelos dos loci amplificados

Os produtos de amplificação do sistema multiplex (PowerPlex 1.1 System) e da Amelogenina foram caracterizados, após separação eletroforética, em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% e detectados por meio de plataforma de análise fluorescente FMBIO Iie, da Hitachi Genetic System.

Amplificação de DNA

Após a realização das metodologias de extração diferencial para se obter as frações espermática (FE) e não-espermática (FNE) isoladamente a partir do swab vaginal, (item 3.1.1.a), obtivemos sucesso no isolamento somente da fração não-espermática, ou seja, foi possível obter o perfil genético das células epiteliais vaginais da vítima que se encontravam no substrato do swab. A fração espermática, provavelmente pela exiguidade de espermatozoides em relação às células epiteliais vaginais, não pôde ser amplificada isoladamente, mas sim, parcialmente na forma de uma mistura “FE + FNE”. Apesar disto, através da comparação dos perfis genéticos do sangue da vítima (item 3.1.1.b), da fração não espermatozoide (FNE – item 3.1.1.a) e do resultado parcial da mistura das frações espermatozoide e não-espermatozoide (FE+FNE – item 3.1.1.a), é possível, por exclusão, inferirmos o perfil genético de um suposto agressor.

Análise e interpretação dos resultados obtidos

Em relação aos testes presuntivos para sêmen, os resultados obtidos revelaram-se positivos para sêmen nos vários ensaios realizados com o material contido no swab vaginal (item 3.1.1.a).

Nos testes confirmatórios foram confeccionadas lâminas pelas duas técnicas acima citadas, obtendo-se resultados positivos para a presença de espermatozoides.

Quantificação de DNA Humano

Com exceção da fração espermatozoide isolada (FE), obtivemos resultados satisfatórios nos ensaios de quantificação de DNA para todas as outras amostras analisadas.

Assim sendo, todas elas seguiram para a etapa de amplificação pelo emprego da PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, conforme metodologias correntes empregadas para as regiões genômicas analisadas.

Locus do DNA	(a) FE+FNE (mistura)	(a) só FNE	(b)	(c)	Condição de:
CSF1PO	11/ <u>12</u> /13	11/13	11/13	7/10	Exclusão
TPOX	8/11	8/11	8/11	9/12	
TH01	<u>6</u> /9	9	9	7/8	Exclusão
VWA	16/18	16/18	16/18	14/17	
D16S539	11/ <u>12</u> /13	11/13	11/13	11/13	Exclusão
D7S820	10/11	10/11	10/11	9/11	
D13S317	<u>8</u> /9/11	9/11	9/11	11	Exclusão
D5S818	11/ <u>12</u>	11	11	11/13	Exclusão
Amelogenina	X/Y	X/X	X/X	X/Y	

Tabela 1: Perfis alélicos obtidos pelas análises dos loci das células contidas no swab vaginal (“FE+FNE”) e das amostras de sangue da vítima e do averiguado.

Legendas:

- a) Mistura da Fração Espermatozoide (FE) e da Fração não-Espermatozoide (FNE) retiradas do swab vaginal (item 3.1.1.a).
- a) FNE - Fração não-Espermatozoide retirada isoladamente do swab vaginal (item 3.1.1.a)
- b) Sangue da vítima (item 3.1.1.b)
- c) Sangue do indiciado (item 3.1.1.c)

Os dados expostos na Tabela 1 deixam evidente que a fração não espermática (FNE) é totalmente coincidente com o perfil genético da vítima ----- (item 3.1.1.b). Através da análise da mistura “FE+FNE”, pode-se constatar que no mínimo duas (02) pessoas contribuíram para a obtenção de tal perfil. Os alelos são coincidentes com a fração não espermatozoide, ou seja,

aquelas não provenientes de células da vítima e supostamente correspondentes nos espermatozoides do agressor, **não apresentam relação de verossimilhança**, em parte dos Loci analisados, com o perfil alélico do averiguado ----- (ITEM 3.1.1.c)

Conclusão

A partir dos dados anteriormente expressos e justificados é possível concluir que o perfil genético obtido da mistura das frações espermatozoide e não-espermatozoide presentes no swab vaginal coletado da vítima (item 3.1.1.a) **não apresentam relação de verossimilhança**, em parte dos Loci analisados, com o perfil alélico do averiguado (ITEM 3.1.1.c).

Desta forma, fica evidente a **EXCLUSÃO** do averiguado como possível gerador de sêmen.

MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Processo
URGENTE

M.M. Juíz:

Na data de hoje ----, nos autos do processo-crime número: que a Justiça Pública move contra ----- tomei ciência do laudo pericial de fls ----, que originou, inclusive, o relaxamento da ordem de custódia do réu. Todavia, referido exame é nulo e merece ser analisado pelo Dr. ----- Médico-legista, que colheu o material da vítima e solicitou análise da lâmina de secreção vaginal (fls --), pelas seguintes razões:

Com a vinda do exame do IC, o Dr. ----- Delegado de Polícia prematuramente fez a juntada aos autos e não submeteu ao conhecimento e análise do médico-legista, responsável pelo exame de conjunção carnal feito na vítima, e pela colheita do material de secreção vaginal que foi então objeto do referido exame, sem que o próprio soubesse do resultado do exame por ele requerido na lâmina de secreção vaginal, já que foi encaminhado ao I.C.

Acontece que, basta uma simples e atenta leitura, para verificarmos que o exame é nulo, já que contraditório, sendo uma conclusão equivocada.

Conforme consta de fls. --, o objeto do exame “é o de constatar a presença de sêmen nas peças recebidas e verificar a possibilidade deste sêmen conter espermatozoides em número suficiente que permita, na sequência da análise, pesquisa comparativa de DNA com material sanguíneo colhido do suspeito”.

Acontece que, não foi possível obter quantificação de DNA humano da fração espermatozoide (conforme constou a fls. --).

Ainda somente foi possível a amplificação de DNA das frações não-espermáticas. Tanto é assim, que o laudo a fls --, atesta que “obtivemos sucesso no isolamento somente da fração espermática, ou seja, foi possível obter o perfil genético das células epiteliais vaginais da vítima que se encontravam no substrato do swab.

Logo, o exame foi feito pelas amostras de sangue da vítima ---- do réu - ---- e da mistura de frações espermatozoide (onde o exame deixou claro que não foi possível a quantificação de DNA humano) e Não-Espermatozoide e da Fração Espermatozoide retirada isoladamente (conforme fls. --), para concluir que o perfil genético obtido não apresenta relação de verossimilhança com o perfil alélico do averiguado.

Ora, mais é óbvio que não apresentaria relação de verossimilhança, posto que não foi possível da fração espermatozoide a quantificação de DNA humano.

Assim, somente da fração não-espermatozoide não poderia nunca aferir se era do averiguado, posto que SÃO CÉLULAS DA VÍTIMA.

E É EVIDENTE QUE, PELO DNA, SERIA EXCLUÍDO O MATERIAL DE (SUAS CÉLULAS) DO MATERIAL DO AVERIGUADO (SUA MOSTRA DE SANGUE).

PORTANTO, A CONCLUSÃO É CONTRADITÓRIA E OBSCURA, SEM FUNDAMENTAÇÃO PARA FALAR EM “EXCLUSÃO” DO AVERIGUADO COMO “GERADOR DO SÊMEN”.

Ante o exposto, requiro seja o presente laudo pericial submetido a análise do MÉDICO-LEGISTA Dr. ----- da Equipe de Perícias Médico Legais de ----- responsável pela colheita do material (secreção vaginal) e pela feitura do exame de conjunção carnal conforme fls ---, acerca das ponderações do Ministério Público.

Após, requiro, outrossim, seja anulado o presente laudo pericial, devendo ser NOVAMENTE realizado (SEGUNDA PERÍCIA), nos termos do artigo 181, Par. Único, do C. P. P.

Caso não seja este o entendimento de Vossa Excelência, requiro que as Sras. Peritas esclareçam as ponderações do Ministério Público acerca da conclusão do referido laudo.

Termos em que,
P. Deferimento

Convido o leitor a elaborar seu próprio parecer, baseado na fundamentação e no exposto acima.

Observe os fatos que se seguem:

- a. Não foi possível amplificar DNA da fração espermática isoladamente, provavelmente pela exiguidade de material, entretanto, foi possível amplificar e analisar o conjunto composto pelas frações espermática e não espermática, chamado de “mistura”;
- b. Todos os alelos da fração não espermática foram coincidentes com os da amostra de sangue pertencente à vítima, o que confirma que esta amostra representa a fração não espermática, ou seja, material biológico da vítima;
- c. Os alelos encontrados na amostra “mistura, são provenientes da própria vítima e do gerador do sêmen. Considerando-se que cada pessoa possui apenas dois alelos para cada *locus* examinado, esta amostra deverá conter os alelos da vítima (dois se heterozigota, ou um representando dois coincidentes em uma só banda, caso homozigota); mais os alelos do gerador desse sêmen misturado.
- d. Portanto, nos *loci* que apresentam outros alelos que não os da vítima, esses obrigatoriamente pertencem e identificam o gerador de sêmen. Em outras palavras, não são da vítima e serão considerados identificadores da amostra de sêmen gerada pelo autor do crime. Estas situações ocorrem nos loci CSF1PO, TH01, D16S539, D13S317, D5S818. Nota-se que todos os alelos que devem, obrigatoriamente, fazer parte do perfil do gerador da amostra biológica de sêmen, não estão presentes no perfil do averiguado, excluindo-se, portanto, este indivíduo averiguado como possível gerador da amostra.

IDENTIFICAÇÃO DE SUPOSTA AUTORIA DE CRIME BASEADO EM AMOSTRAS COLETADAS NA CASA DO AVERIGUADO: HISTÓRICO, NECRÓPSIA, CONCLUSÃO DO LABORATÓRIO, COMENTÁRIO

Histórico:

Mulher, 17 anos encontrada em um banheiro de um Bosque na cidade de -----, vítima de homicídio por arma branca

Necrópsia:

Reconhecimento: feito pelo pai da vítima.

Exame externo:

- ⇒ 34 ferimentos pérfuro-incisos
- ⇒ Fraturas de dois dentes da arcada superior
- ⇒ Coágulos sanguíneos sob as unhas das mãos e dois ferimentos no dorso da mão direita

Exame Ginecológico:

- ⇒ Hímen: Ruptura completa cicatrizada às 6:00 h. Equimose peri-labial em região de fórnice, equimose peri-himenal.
- ⇒ Ânus: Fissuras agudas e relaxamento esfíncteriano.

Exame Interno:

- ⇒ Ferimentos pérfuro incisos múltiplos
- ⇒ Hemorragia aguda interna
- ⇒ Feto em cavidade uterina medindo 7 cm de diâmetro céfalo-caudal.

Investigação

- ⇒ Múltiplos preservativos no local do crime.
- ⇒ Suspeito: ex-namorado de 17 anos de idade

Encontrados na casa do suspeito:

- ⇒ Múltiplos livros de contos policiais
- ⇒ Um tênis molhado e uma calça com manchas de cor rósea que dizia ser proveniente de um peixe que havia limpado.

Material Encaminhado para exame de DNA:

- ⇒ 1º frasco: Unhas da vítima
- ⇒ 2º frasco: Sangue da vítima
- ⇒ 3º frasco: Útero, placenta e feto
- ⇒ 4º frasco: Lâminas com secreção de vagina e ânus.
- ⇒ 5º frasco: Tênis do suspeito

- ⇒ 6º frasco: Calça do suspeito
- ⇒ 7º frasco: Amostra de sangue do suspeito

Procedimento no laboratório

- ⇒ Realizada extração de DNA da mancha no tênis
- ⇒ Testado e verificado que se tratava de DNA humano e não animal
- ⇒ Testado e verificado que era DNA de uma pessoa do sexo feminino
- ⇒ Extraído DNA de amostra de sangue da vítima
- ⇒ Amplificados os produtos de extração das amostras do tênis do suspeito e da vítima pela técnica de PCR
- ⇒ Comparados os perfis genômicos, concluiu-se que se tratavam de perfis idênticos (examinados 5 *loci*).

COMENTÁRIO: Para se obter um resultado estatístico confiável, deve-se utilizar, no mínimo, 17 marcadores STRs.

Perícia e erros laboratoriais em DNA

Preparação para a perícia

Toda perícia se desenvolve em etapas onde o conjunto de elementos que forma a opinião do perito e permite que chegue a uma conclusão é o resultado de uma somatória de evidências. No caso das identificações de pessoas ou de amostras biológicas, a conclusão final é o resultado da somatória de evidências genéticas e não genéticas – aqui se incluem os resultados dos perfis genéticos obtidos nos testes. As etapas dos testes, em particular, envolvendo a técnica de PCR, devem seguir protocolos estabelecidos e registrados em POP, (Procedimento Operacional Padrão). É recomendável alguns cuidados antes mesmo do recebimento das amostras, que abrange espaço físico adequado para a realização dos exames (pois envolvem manipulação de genes) em setor isolado, preferencialmente contendo os seguintes equipamentos:

- a) Iluminação ultra-violeta – utilizada todos os dias antes de se iniciarem as atividades;
- b) Bancada para extração de DNA;
- c) Capela de fluxo laminar para preparação das amostras que seguirão para a amplificação por meio da técnica de PCR;
- d) Termociclador de primeira linha;
- e) Bancada pós-PCR;
- f) Freezer para armazenamento dos reagentes e outro independente para armazenamento das amostras já amplificadas.

Coleta

As amostras devem ser colhidas observando-se rigorosamente normas técnicas, colhendo-se todas as informações necessárias provenientes da cena ou pessoa de origem, com a devida identificação e assinatura das partes envolvidas e das testemunhas em casos de manipulação de amostras de pessoas como investigação de paternidade, constando do documento assinado a finalidade do exame. Lacram-se os tubos e colhem-se rubricas sobre os mesmos, preservando, dessa forma, a CADEIA DE CUSTÓDIA, fundamento necessário para a correta realização da perícia. Todos os termos de consentimento para o exame devem ser devidamente preenchidos, respeitando-se as normas de coleta estabelecidas, observando-se a legislação vigente no que diz respeito à autorização para manipulação das amostras e normas do Conselho Regional de Medicina. As amostras colhidas devem ser acondicionadas e deve ser

verificado se todos os tubos estão devidamente lacrados e rubricados e todos os documentos de identificação e termos de consentimento devidamente preenchidos.

No laboratório

Quando do recebimento de uma amostra no laboratório para a realização de exame de investigação de paternidade por meio da análise do DNA, os seguintes POP (Procedimentos Operacionais Padrão) são recomendados:

- 1- Tratamento prévio das bancadas com ácido clorídrico à 3% (HCl) e posteriormente com álcool etílico 70%;
- 2- Tratamento do ambiente com luz ultra-violeta por 15 minutos;
- 3- Recebimento das amostras;
- 4- Conferência de frascos e documentação;
- 5- Identificação de frascos e documentação com código interno do laboratório;
- 6- Extração de DNA das amostras;
- 7- Preparação para amplificação;
- 8- Amplificação dos DNAs das amostras por meio da técnica de PCR;
- 9- Visualização do resultado da amplificação;
- 10- Tabulação dos alelos observados;
- 11- Confronto dos perfis genéticos das pessoas envolvidas entre si;
- 12- Elaboração do laudo, após a análise dos resultados obtidos do confronto entre as amostras.

Possibilidades de discrepâncias nos testes

Evolução das técnicas

Houve época em que os exames de paternidade eram feitos por comparação fisionômica, escolhendo-se características como cor dos olhos, estatura e outras para comparação, com resultados pouco seguros. Com a maior compreensão dos padrões de transmissão das características genéticas segundo as Leis de Mendel, o cenário foi ganhando maior rigor científico. O descobrimento do sistema sanguíneo ABO e sua aplicação aos testes de vinculação genética permitiu a exclusão com maior segurança de homens supostos pais biológicos. Entretanto, essa técnica apresentou falhas quando pretendia afirmar a paternidade. Muitos homens não pais, passaram a ser considerados pais de forma equivocada, pois o grau

de certeza de uma exclusão não poderia ser comparado ao mesmo grau de inclusão; a probabilidade de paternidade calculada ainda não permitia estabelecer vínculos genéticos com segurança. Na década de 70, surgiu a técnica baseada no antígeno leucocitário humano (HLA), que passou a ser utilizada de rotina nos exames de paternidade, trazendo maior grau de certeza nos casos de inclusão. Entretanto, assim como o sistema ABO, em que pese ter também revolucionado os exames de paternidade e permitido que erros anteriores fossem corrigidos, não permitia afirmar, com segurança, a paternidade.

Com o surgimento e automação das técnicas de análise do DNA, houve uma nova revolução, permitindo que os erros diminuíssem e se tornassem quase nulos. Entretanto, a possibilidade de discrepâncias que serão descobertas e corrigidas no futuro, existe. Com a finalidade de evitar falhas, os testes de DNA são construídos de acordo com o mapa genômico humano que pode ser acessado nos bancos públicos de genes. (13) Os marcadores genéticos são desenhados previamente, escolhendo-se alelos e loci específicos e distantes uns dos outros. Com isso, pretende-se diminuir a possibilidade de amplificar regiões que sofreram mutações devido a crossing overs, consequentemente não respeitando as leis Mendelianas. A consequência seria interpretar a alteração de um marcador como característica transmitida geneticamente e não produzida por mutação, alterando o resultado final. Para essa construção, a escolha dos marcadores deve seguir alguns princípios. Algumas características são importantes a fim de se evitar falsas interpretações, como: **alta heterozigidade, moderado número de alelos, frequência alélica balanceada e ausência de microvariantes que exijam alta resolução para sua identificação.**

Eventos nos testes que podem interferir nos resultados:

Na Extração

⇒ Presença de DNA de microorganismos que podem contaminar o material extraído da amostra.

Na amplificação e revelação

⇒ **Alelos nulos** devido à ausência da seqüência nucleotídica de pareamento na fita molde, não havendo, portanto, anelização com a seqüência do primer utilizado, impossibilitando a amplificação por PCR;

- ⇒ Pequenas **variações no produto final de amplificação** podem relacionadas a diferentes pares de primers utilizados. Quando se utiliza um determinado par de primers desenhado para amplificar uma determinada região genômica ou *locus*, pode-se obter um resultado de amplificação ligeiramente diferente de outro par de primers sintetizado para amplificar a mesma região;
- ⇒ **Microvariações** de alelos, que se deve a inserções, deleções e/ou à troca de nucleotídeos na sequência a ser amplificada, que leva à produção de microvariantes. O alelo 9.3, por exemplo, difere do alelo 10 pela deleção de uma adenina, e do alelo 9, por possuir mais três bases nucleotídicas;
- ⇒ O “**dropout**” ocorre quando uma das bandas que representa os alelos verdadeiros não aparece em sua região correspondente. (14) Essa situação foi detectada inicialmente pelo FBI americano quando amostras similares foram examinadas por laboratórios diferentes com a finalidade de validar os marcadores. Em alguns laboratórios, observava-se a banda e em outros não. A única maneira de detectar o “dropout” é a análise da mesma amostra por dois laboratórios diferentes.
- ⇒ **Stutters**” onde se observam duas ou mais bandas, sendo uma delas a banda verdadeira mais forte e as outra(s), “sombras” ou amplificações inespecíficas, podem estar relacionados com interferentes do suporte que não foram eliminados completamente e são amplificados juntamente com a amostra, causando distorções nas reações de modo a alterar os resultados.
- ⇒ **Duas bandas** em um único locus podem ser observadas, bandas inespecíficas. Essa situação ocorre devido a diversos fatores, entre os quais, interferentes do suporte, proteínas presentes no suporte de coleta (nesse caso o swab) que acompanham o DNA da amostra, interferindo na amplificação.
- ⇒ A eletroforese em gel de poliacrilamida foi amplamente utilizada como técnica de revelação, quando se fazia a confecção do gel de forma manual utilizando-o como meio para migração dos produtos de PCR. Durante sua manufatura, não raras vezes ocorriam pequenas imperfeições quase imperceptíveis que interferiam na correta migração do DNA, acarretando resultado equivocado após a coloração e revelação das bandas. A análise do resultado era feita sem o uso de qualquer tipo de instrumento, à vista desarmada. Com o advento da automatização, houve redução dos problemas ocasionados por falhas físicas na preparação artesanal do gel e coloração. Os primers

passaram a ser preparados com marcadores fluorescentes que permitem que um feixe de raios laser os identifique quando passam por capilares, com auxílio de um computador que processa e identifica o sinal. Desta forma, previne-se a interpretação equivocada de “stutters” e má migração da amostra.

- ⇒ Outro fator que diminuiu a produção de “stutters” durante a amplificação das amostras está relacionado à utilização de enzimas de melhor qualidade.
- ⇒ Discrepâncias inesperadas foram observadas no locus **D16S539** entre dois laboratórios que usaram o mesmo Kit de fabricação da PROMEGA CORPORATION. (15)
- ⇒ O National Institute of Justice dos EUA através Criminal Justice Reference Service, publicou um artigo intitulado “Convicted by Juries, Exonerated by Science: Case Studies in the Use of DNA Evidence to Establish Innocence After Trial, disponível em (<http://www.ncjrs.gov>), em 2006, discutindo vários casos onde réus declarados culpados com fundamento nos exames sanguíneos foram inocentados após re-análise usando-se técnicas fundamentadas em DNA. (16) Segundo Arthur Conan Doyle nesse artigo, “a única forma de enxergar a ciência é a busca pela verdade e a ciência forense não é exceção.”
- ⇒ Os sistemas sanguíneos e HLA já foram considerados infalíveis, principalmente para a exclusão de paternidade. Historicamente demonstrou-se uma série de falhas hoje reconhecidas.
- ⇒ Nas palavras de Mizrahi, citado por Zulmar Vieira Coutinho: *“Em la actualidad se podría decir que hay acuerdo em la comunidad científica sentido de que las pruebas biológicas, cualquiera que sea el método o sistema que se aplique, no constituyem técnicas infalibles”*. Concordamos com Zulmar quando pergunta e responde: ***“É possível se obter uma falsa e absoluta exclusão de paternidade com o método de DNA? Sim, com certeza absoluta... Nos procedimientos técnicos, aparentemente simples, já detallados no capítulo 2, podem ocorrer problemas técnicos cuja interpretação pode resultar em uma falsa exclusão de paternidade. (pg 40, 41 e 42)...“Em relação à ênfase das sondas unilocais com PCR, para confiabilidade absoluta dos resultados, observa-se discordância por parte de outros autores. A possibilidade de mutações pontuais do cromossomo, desnaturações incompletas, contaminação com DNA transfusional, alterações eletroforéticas podem levar a resultados falsos.” (pg 101 e 102)”*** (17).

Considerações finais sobre a perícia envolvendo DNA

- Todo exame laboratorial está sujeito a resultado falso positivo ou negativo decorrente de vários fatores. Há resultados de HIV, gravidez, sífilis etc., que são corrigidos após novos exames e muitos dissabores das partes envolvidas. Os exames de DNA não são exceção. Portanto, antes de atestar o erro, deve-se verificar a possibilidade de resultados discrepantes decorrentes da técnica.
- Todo exame laboratorial é uma perícia e deve ser realizada por profissional habilitado e capacitado, dentro de suas competências legais, em conformidade com orientações e pareceres emitidos pelos respectivos Conselhos Profissionais;
- Deve-se utilizar os mais elevados padrões de qualidade técnica disponíveis: quanto mais moderna, teoricamente, portanto, menos sujeita a artefatos, motivo plausível para que se considere esse laudo mais preciso que outro cujo resultado é proveniente de técnica mais antiga;
- A descrição de laudo deve ser minuciosa, clara e metódica e todos os resultados devem reproduzir fielmente os dados constantes das tabelas provenientes do perfil dos alelos, seguindo-se rigorosamente a máxima “*visum et repertum*”;
- JAMAIS deve o perito omitir ou inserir no laudo, informação que não conste dos resultados obtidos a partir dos experimentos, bem como JAMAIS omitir ou inserir em qualquer laudo, informação falsa ou diversa da que deveria constar do laudo;
- Recomendado ao perito contato absolutamente necessário e técnico com qualquer pessoa envolvida na perícia, principalmente com os periciandos; que se coloque à disposição para sanar quaisquer dúvidas possíveis sobre o laudo e o desenvolvimento da perícia, fazendo os esclarecimentos que se fizerem necessários, visando, de forma transparente e ética, à luz do conhecimento científico, contribuir para que a Luz da Verdade se estabeleça.

A reflexão sobre a metodologia e as possibilidades de “pedras no meio do caminho” nos leva a colher ensinamentos valiosos e fundamentais para o desenvolvimento de consciência crítica nesta área do conhecimento humano que rompe fronteiras e trás, a cada dia, novos desafios aos julgadores, políticos, legisladores, cientistas e toda sociedade.

Referências bibliográficas

1. Pessanha JAM. Os Pré-Socráticos: Vida e Obra. Os Pré-Socráticos: Fragmentos, Doxografia e Comentários. 1978; 49.
2. de França GV. Medicina legal. 11. ed. Guanabara Koogan; 2017.
3. Descartes R. Discurso do método. Nova Fronteira; 2011.
4. Peixoto A. Medicina legal. 4. ed. RJ : Francisco Alves 1923., editor. Rio de Janeiro; 1923.
5. Hume D. Investigação acerca do entendimento humano. 5a ed. Nova Cultural LTDA. São Paulo: Tradução de Anoar Alex; 1748; 77.
6. Visible Proofs: Forensic Views of the Body: Galleries: Biographies: Alphonse Bertillon (1853–1914).
7. STRBASE [Internet]. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://strbase.nist.gov/images/csflpo.jpg>
8. NCBI. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
9. El-Alfy SH, Abd El-Hafez AF. Paternity testing and forensic DNA typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. J Genet Eng Biotechnol. 2012;1;10(1):101–12.
10. FBI Core STR Loci [Internet]. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://strbase.nist.gov/fbicore.htm>
11. Salvia PNDS. Paternidade. Comparativo entre as técnicas de análise em DNA (PCR-STR x RFLP-VNTR). [Internet]. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://www.citocamp.com.br/paternidade/comparativo.html>
12. Comissão Interamericana dos Direitos Humanos. Convenção Americana Sobre Direitos Humanos (Assinada na Conferência Especializada Interamericana sobre Direitos Humanos, San José, Costa Rica, em 22 de novembro de 1969) [Internet]. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: https://www.cidh.oas.org/basicos/portugues/c.convencao_americana.htm
13. Human Genome Resources at NCBI - NCBI [Internet]. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/index.shtml>
14. Lohmueller KE, Rudin N, Inman K. Analysis of allelic drop-out using the Identifiler 1 and PowerPlex 1 16 forensic STR typing systems. 2014 [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.003>
15. Nelson MS, Levedakou EN, Matthews JR, Early BE, Freeman DA, Kuhn CA, et al. Detection of a Primer-Binding Site Polymorphism for the STR Locus D16S539 Using the Powerplex® 1.1 System and Validation of a Degenerate Primer to Correct for the Polymorphism. J Forensic Sci [Internet]. 2002 [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11908606/>
16. Prieto L; Alonso A; Alves C; Crespillo M; Montesino M; Picornell A; Brehm A; et all. GEP-ISFG Collaborative Exercise on mtDNA: Reflections About Interpretation, Artefacts, and DNA Mixtures 2006. Forensic Science International: Genetics Volume: 2 Ed: 2. 2008. [acesso em 30 jul 2021]. Disponível em: <https://www.ncjrs.gov/App/Publications/abstract.aspx?ID=243966>
17. Coutinho ZV. Exames de DNA, Probabilidades de falsas exclusões ou inclusões: 100%? AB/SC; 2006. p. 79–86.